









**Universidad Nacional de Córdoba**  
**Facultad de Ciencias Químicas**

Departamento de Química Orgánica  
Instituto de Investigaciones en Fisicoquímica de  
Córdoba (INFIQC), CONICET/UNC.

**Tesis doctoral**

*Desarrollo de metodologías analíticas  
supramoleculares y su aplicación en  
cromatografía líquida de alto rendimiento*

**Qco. Johannes Stevens Ramirez Carvajal**

**2022**



# Tesis presentada para optar al grado de Doctor en Ciencias Químicas

Directora

## **Dra. Alicia V. Veglia**

Instituto de Investigaciones en Físicoquímica de Córdoba (INFIQC), CONICET/UNC, Departamento de Química Orgánica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba–Ciudad Universitaria, Córdoba, C.P. 5000, Argentina.

Comisión evaluadora

## **Dra. Patricia Ortiz**

Profesora Consulta. Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba–Ciudad Universitaria, Córdoba, C.P. 5000, Argentina.

## **Dra. María Verónica Baroni**

Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos Córdoba, CONICET/UNC, Departamento de Química Orgánica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba–Ciudad Universitaria, Córdoba, C.P. 5000, Argentina.

## **Dra. Ariana Zoppi**

Unidad de Investigación y Desarrollo en Tecnología Farmacéutica (UNITEFA), CONICET/UNC, Departamento de Ciencias Farmacéuticas, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba–Ciudad Universitaria, Córdoba, C.P. 5000, Argentina.

Evaluador externo

## **Dra. Cecilia Castells**

Investigadora Principal CONICET/UNLP, Departamento de química, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, Argentina.



*A mi familia por su apoyo incondicional y buenas energías día a día.*

*A mis tres reinas, mis mamás*

*Amanda*

*Miryam*

*Amparo*

*Y en honor a la memoria de mi viejo, mi abuelito, mi padre....*

*Bolívar Ramírez Vargas*

*(Bolo)*

## **AGRADECIMIENTOS**

En primera instancia quiero agradecer a todas las instituciones que permitieron que pudiera llevar a cabo este sueño de realizar mi formación doctoral, al CONICET por otorgarme la beca, a la Facultad de Ciencias Químicas, al Departamento de Química Orgánica y también al Instituto de Investigaciones en Físico-Química de Córdoba (INFIQC-CONICET), por abrirme las puertas de sus instalaciones y laboratorios para poder desarrollar esta tesis. Quiero agradecer muy especialmente a todo su personal de apoyo, que siempre estuvieron dispuestos a darme una mano en temas administrativos y experimentales. Para todos ellos mil y mil gracias.

A mi directora, la Dra. Alicia Veglia, mi Doc por haber creído en mí sin siquiera conocerme, me abrió las puertas de su grupo de investigación, gracias por su acompañamiento y enseñanzas tanto profesionales como personales que sin lugar a duda han hecho de mí una mejor persona. A usted le estaré agradecido eternamente.

A mi comisión asesora y evaluadora, que desde el día uno estuvieron dispuestas a ayudarme, guiarme y plantearme muchas ideas en cada reunión que permitieron complementar el trabajo experimental realizado y hacer que el resultado final fuese el mejor posible.

Al Laboratorio 004, compuesto por personas maravillosas que siempre estarán en mi corazón y que sin duda alguna quiero volver a ver y con quienes estaré infinitamente agradecido, a la Doc, la Naty, el Guille, la Guada, el Santi (te gane el beigel), el Deivid, la Andre, el Huguito, el pedrinchi y sin duda alguna al Rodri (Roro) jajajaja que lo considero mi hermano y le deseo lo mejor del mundo, espero verte pronto amigo, te quiero.

Quiero agradecer de manera especial también al grupo de fútbol de los miércoles, por ahí pasaron muchas personas que me hicieron mucho más

amena mi estancia en Argentina y me permitieron vivir mi pasión de jugar al fútbol. De aquí tantos amigos: en especial Nachito, el Colo, Martin Lopez, el Fabri (barbicio), Luquitas, uff tantos que me es imposible nombrarlos a todos.

Los chicos de padel, la nana, ani, lucas, esteban, Andrés, la peta, giuli, Roxy, gracias por enseñarme un deporte nuevo y que me encantó.

A mis amigos de pandemia, Jhoan y Jhontoto gracias por su amistad y compañía, buenos y malos momentos que fortalecieron esta amistad. Espero que esta amistad perdure por siempre parceritos.

Los chicos del Quindío gracias, definitivamente las juntadas con ustedes fueron una chimba y las extraño tanto como a ustedes, andres, Dary, vivi, rafa, guido, Karen, Jessi, Alejo, Lesli, el viejo Will... todas personas maravillosas y que recuerdo enormemente.

A John Jairo Pazón, Katha, Diana, Erika quienes me recibieron y ayudaron cuando llegue a la Argentina, ustedes claramente rasparon el terreno para que fuera más ameno y fácil para quienes llegamos después en búsqueda de este sueño. Gracias infinitas.

A mi hermosa pareja Luisa, gracias por estar a mi lado durante todo este proceso amor, sin ti hubiese sin aún más difícil llegar a la meta. Te amo.

Por último, pero no por ello menos importante gracias a mi familia, mi motor y por quien día a día lucho para mejorar y crecer, y poder brindarles un mejor futuro. Los amo inmensamente pipe, alejo, camilo, mami Amanda, mami Amparo, mami Miryam, a mi viejo Bolo, mis tíos y primos, gracias de todo corazón por su apoyo.





# ***Resumen***

En la presente tesis se exponen los resultados obtenidos durante cinco años de investigación, y que permitieron desarrollar un método analítico para cuantificar simultáneamente cuatro pesticidas carbamatos como el aminocarb (AC), bendiocarb (BC), carbofuran (CF) y carbaryl (CY) en agua de red aprovechando las ventajas de la química supramolecular y haciendo uso de cromatografía líquida de alto rendimiento y calibración multivariada de primer orden.

De igual forma se reportan los resultados para el método desarrollado para cuantificar la mezcla de melatonina (M) y 3-metilindol (3MI) en matriz de orina mediante fluorescencia sincrónica, calibración multivariada de primer orden y química supramolecular.

Dado el uso común de los pesticidas carbamatos para el control de plagas en el hogar, jardines y la agricultura; es común que estos entren en contacto con las personas por medio de diferentes vías (oral, respiratoria y cutánea). El contacto con altas concentraciones de estos compuestos puede llegar a generar intoxicaciones crónicas en las personas producto de la capacidad que tienen de inhibir la enzima acetilcolinesterasa.

La lixiviación de estas sustancias en grandes extensiones de suelos usados en la industria agrícola puede generar la contaminación de fuentes hídricas que a priori serán usadas para el consumo humano, presentando un gran riesgo para la salud.

Es por esta razón que adquiere un gran interés el desarrollo de una metodología analítica sencilla, robusta, selectiva y sensible que permita detectar y cuantificar pesticidas carbamatos en muestras de agua de red.

En cuanto a los compuestos indólicos como M y 3MI, es conocido que las alteraciones de sus niveles normales en el organismo son respuesta de la posible existencia de patologías asociadas con el trastorno del sueño, tumores cancerígenos y alteraciones del sistema digestivo.

Motivado por lo anterior, se realizó un aporte desde las ciencias básicas al campo de las ciencias médicas, mediante el desarrollo de una metodología analítica para la detección y cuantificación de M y 3MI en muestras complejas de orina humana.

Para el desarrollo de las metodologías propuestas se hizo uso de diferentes estrategias analíticas como son: cromatografía líquida de alto rendimiento, fluorescencia sincrónica, química supramolecular y calibración multivariada de primer orden mediante cuadrados mínimos parciales.

A continuación, se detallan los aspectos más relevantes abordados a lo largo de los VI capítulos que conforman esta tesis.

En el capítulo I. Introducción temática, se recopila todo el marco teórico que se ve involucrado en esta tesis. Se menciona la finalidad de la química analítica, los conceptos fundamentales de química supramolecular, y se aborda la importancia de desarrollar metodologías analíticas para detectar y cuantificar diferentes pesticidas y compuestos indólicos.

En el capítulo II se muestran los resultados, procesamiento y análisis de la interacción entre el AC y la hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina (HP $\beta$ CD) para la determinación de la constante de asociación entre ambas especies.

El capítulo III se evalúa el efecto de la adición poscolumna de la HP $\beta$ CD a las condiciones cromatográficas elegidas para el método analítico sobre los cromatogramas obtenidos por detección fluorescente del AC, BC, CF y CY.

El capítulo IV expone la validación y aplicación en muestras de agua potable del método analítico desarrollado mediante cromatografía líquida de alto rendimiento, química supramolecular y calibración multivariada de primer orden para cuantificar simultáneamente la mezcla de los cuatro pesticidas carbamatos indicados en el resumen del capítulo III.

El capítulo V muestra el desarrollo, validación y aplicación de un método analítico basado en fluorescencia sincrónica, química supramolecular y calibración multivariada de primer orden para cuantificar la mezcla binaria de M y 3MI muestras de orina humana.

En el capítulo VI se pueden observar las conclusiones para el trabajo de investigación que se realizó durante el desarrollo de este estudio doctoral.

Por último, se presentan las proyecciones basadas en los resultados que se obtuvieron en los dos métodos analíticos estudiados y validados.

# ***Tabla de contenido***

<b>CAPÍTULO I</b>	<b>Introducción temática .....</b>	<b>1</b>
1.	Introducción .....	3
1.1.	Química Analítica .....	3
1.2.	Química Supramolecular.....	6
1.2.1.	Sistemas autoensamblados.....	7
1.2.2.	Química huésped-receptor.....	8
1.2.3.	Tipos de interacciones no covalentes.....	9
1.2.3.1.	Interacciones ion-ion.....	9
1.2.3.2.	Interacciones ion-dipolo.....	10
1.2.3.3.	Interacciones dipolo-dipolo.. ..	11
1.2.3.4.	Interacciones catión- $\pi$ .....	12
1.2.3.5.	Interacciones anión- $\pi$ .....	13
1.2.3.6.	Interacciones $\pi$ - $\pi$ stacking.....	13
1.2.3.7.	Fuerzas de Van der Waals.....	14
1.2.3.8.	Interacciones por puente de hidrógeno.....	14
1.2.4.	Reconocimiento molecular .....	15
1.2.4.1.	Mecanismos de reconocimiento molecular.....	16
1.2.4.2.	Tipos de complejos supramoleculares.....	19
1.2.5.	Química huésped-receptor en solución .....	20
1.2.5.1.	Efecto hidrofóbico.....	20
1.2.5.2.	Determinación de constantes de asociación.....	21

1.3. Pesticidas .....	23
1.3.1. Pesticidas en el mundo .....	24
1.3.2. Pesticidas en la República Argentina .....	24
1.3.3. Aspectos toxicológicos de los pesticidas .....	26
1.4. Analitos de interés en este trabajo de tesis.....	27
1.4.1. Pesticidas carbamatos .....	27
1.4.2. Pesticidas carbamatos .....	28
2. Objetivos .....	31
2.1. Objetivo general .....	31
2.2. Objetivos específicos .....	31
3. Bibliografía .....	33

## **CAPÍTULO II Determinación de la constante de asociación entre aminocarb e hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina..... 41**

1. Introducción .....	43
1.1. Ciclodextrinas .....	43
1.1.1. Propiedades fisicoquímicas .....	45
1.1.2. Ciclodextrinas en la ciencia .....	47
1.1.2.1. Ciclodextrinas en farmacia.....	47
1.1.2.2. Ciclodextrinas en nanotecnología.....	48
1.1.2.3. Aplicaciones en biomédica y en biomedicina.....	48
1.1.2.4. Ciclodextrinas en la industria alimentaria.....	48
1.2. Complejos de inclusión entre ciclodextrinas y pesticidas carbamato .....	49
2. Resultados y análisis .....	52
2.1. Espectros de absorción de aminocarb .....	52
2.1.1. Efecto del cambio de acidez en el espectro de absorción de aminocarb .....	52
2.2. Espectros de fluorescencia de aminocarb .....	54
2.2.1. Efecto del cambio de acidez sobre los espectros de fluorescencia de aminocarb .....	55

2.3. Determinación de la constante de acidez en el estado excitado de AC	57
2.3.1. Cálculo de la constante de acidez en el estado excitado mediante ciclo de Förster	58
2.3.2. Cálculo de constante de acidez en el estado excitado mediante curva de calibrado	61
2.3.3. Cálculo de la constante de acidez en el estado excitado mediante el método de titulación	63
2.3.4. Comparación de valores de constantes de acidez en el estado excitado por métodos teóricos y experimentales	64
2.4. Determinación de las constantes de asociación entre aminocarb e hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina	66
2.4.1. Determinación de la constante de asociación a partir de medidas de absorción	67
2.4.1.1. Influencia de la hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina en los espectros de absorción de aminocarb	68
2.4.1.2. Influencia de la hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina en los espectros de absorción de aminocarb en medio ácido	71
2.4.2. Determinación de la constante de asociación a partir de medidas de fluorescencia	72
2.4.2.1. Influencia de la hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina en los espectros de fluorescencia de aminocarb en medio neutro	74
2.4.2.2. Influencia de la hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina en los espectros de fluorescencia de aminocarb en medio ácido	76
2.4.2.2.1. Determinación de la constante de asociación mediante curva de Stern-Völmer	78
2.4.2.3. Relación estequiométrica de los complejos	81
3. Conclusiones	83
4. Parte experimental	85
4.1. Instrumentación	85
4.2. Reactivos y Procedimientos	86

4.2.1.	Efecto de la acidez sobre los espectros de absorbancia y fluorescencia.....	86
4.2.2.	Determinación de la constante de acidez de aminocarb en el estado excitado .....	86
4.2.3.	Determinación de las constantes de asociación entre aminocarb e hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina .....	87
4.2.4.	Determinación de las constantes de asociación entre aminocarb protonado e hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina .....	87
5.	Bibliografía.....	89
<b>CAPÍTULO III Efecto de la adición poscolumna de hidroxipropil-<math>\beta</math>-ciclodextrina en los cromatogramas de N-metilcarbamatos.....</b>		<b>95</b>
1.	Introducción.....	97
1.1.	La cromatografía líquida de alto rendimiento en química analítica.....	97
1.2.	Instrumentación “Cromatografía líquida de alto rendimiento”.....	99
1.3.	Pesticidas y sus efectos nocivos para la salud humana.....	101
1.3.1.	Mecanismo de toxicidad.....	101
1.3.2.	Exposición a pesticidas inhibidores de la acetilcolinesterasa.....	102
1.3.3.	Manifestaciones clínicas.....	103
1.3.3.1.	Intoxicación aguda.....	103
1.3.3.2.	Síndrome intermedio.....	104
1.3.3.3.	Neuropatía retardada.....	105
2.	Resultados y análisis .....	107
2.1.	Evaluación y elección de condiciones cromatográficas para la separación e identificación de los N-metilcarbamatos .....	107
2.2.	Efecto de la adición poscolumna de hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina en la señal fluorescente de los cromatogramas de la mezcla de los pesticidas en estudio .....	111
3.	Conclusiones .....	115
4.	Parte experimental .....	117
4.1.	Instrumentación .....	117
4.2.	Reactivos y Procedimientos .....	117

4.2.1.	Evaluación y elección de condiciones cromatográficas para la separación e identificación de los N-metilcarbamatos en estudio.....	118
4.2.2.	Efecto de la adición poscolumna de hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina en la señal fluorescente de los cromatogramas de la mezcla de los pesticidas en estudio .....	119
5.	Bibliografía .....	121

**CAPÍTULO IV Aplicación analítica: Determinación simultánea de aminocarb, carbofuran, bendiocarb y carbaryl por cromatografía líquida de alto rendimiento con la adición poscolumna de hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina y calibración multivariada de primer orden .....127**

1.	Introducción .....	129
1.1.	Diseño experimental de Taguchi .....	131
1.2.	Cuadrados mínimos parciales .....	134
1.2.1.	Etapas de calibración y predicción .....	138
1.2.2.	Exactitud del método .....	139
1.2.3.	Límites de detección .....	139
2.	Resultados y análisis .....	141
2.1.	Determinación de absorptividades molares .....	141
2.2.	Consideraciones cromatográficas .....	142
2.3.	Soluciones estándar y sets de calibración y predicción .....	142
2.4.	Alineamiento de los perfiles cromatográficos.....	144
2.5.	Selección de variables latentes.....	145
2.6.	Parámetros analíticos y cifras de mérito en ausencia y presencia de hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina en el derivatizador poscolumna .....	147
2.7.	Análisis de la región elíptica de confianza conjunta.....	150
2.8.	Estudio de recuperación en muestras de agua de red.....	151
3.	Conclusiones .....	155
4.	Parte experimental.....	157
4.1.	Instrumentación.....	157
4.2.	Reactivos y Procedimientos .....	157
4.2.1.	Determinación de absorptividades molares .....	157
4.2.2.	Soluciones estándar y sets de calibrado y predicción.....	158



2.4.3. Condiciones cromatográficas.....	158
5. Bibliografía .....	159
<b>CAPÍTULO V Fluorescencia sincrónica, química supramolecular y cuadrados mínimos parciales, un trabajo en conjunto para cuantificar la mezcla binaria de 3–metilindol y melatonina en muestras de orina ...</b>	<b>165</b>
1. Introducción .....	167
1.1. Fluorescencia sincrónica .....	168
1.2. Cuadrados mínimos parciales.....	174
1.3. Química supramolecular de indoles.....	174
2. Resultados y análisis .....	177
2.1. Características fluorescentes de los indoles en estudio.....	177
2.1.1. Espectros de excitación y emisión del 3–metilindol y melatonina .....	177
2.1.2. Selección de desplazamiento de stokes .....	178
2.2. Efecto de hidroxipropil– $\beta$ –ciclodextrina sobre el espectro de fluorescencia sincrónica de la mezcla de 3–metilindol y melatonina .....	181
2.3. Selección de variables latentes.....	182
2.4. Set de calibrado y predicción .....	182
2.5. Parámetros analíticos .....	183
2.6. Análisis de la región elíptica de confianza conjunta .....	187
2.7. Recuperación de 3MI y M en matrices fortificadas de orina humana .	187
2.8. Análisis de la región elíptica de confianza conjunta de 3–metilindol y melatonina en muestra reales .....	189
3. Conclusiones .....	191
4. Parte experimental .....	193
4.1. Instrumentación .....	193
4.2. Reactivos y procedimientos .....	194
4.2.1. Recuperación de 3–metilindol y melatonina en matrices fortificadas de orina humana .....	195
5. Bibliografía .....	197
<b>CAPÍTULO VI. Conclusiones generales.....</b>	<b>203</b>

<b>ANEXO I.....</b>	<b>215</b>
1. Fundamentos de cromatografía líquida de alto rendimiento.....	215
1.1. Naturaleza de la fase móvil.....	215
1.2. Naturaleza de la fase estacionaria.....	216
1.3. Cantidad de muestra aplicada.....	216
1.4. Fenómeno que ocurre dentro de la columna.....	217
1.5. Cromatografía líquida de alto rendimiento en fase reversa.....	218
2. bibliografía.....	221

# Abreviaturas

<b>3MI</b> 3-Metilindol	<b>GFC</b> Cromatografía de filtración por geles
<b>5HIA</b> 5-Hidroxindolilacético	<b>GLC</b> Cromatografía gas líquido
<b>5HT</b> Serotonina	<b>GPC</b> Cromatografía de permeación por geles
<b>5M</b> 5-Metoxi-3-(2-aminoetil) indol	<b>GS</b> Grado de sustitución
<b>AC</b> Aminocarb	<b>GSC</b> Cromatografía gas sólido
<b>AC<sup>+</sup></b> Aminocarb protonado	<b>HP<math>\beta</math>CD</b> Hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina
<b>BC</b> Bendiocarb	<b>HPLC</b> Cromatografía líquida de alto rendimiento
<b>CA</b> Calixarenos	<b>IA</b> Ácido 3 - indolilacético
<b>CB</b> Cucurbiturilos	<b>IR</b> Espectroscopia infrarroja
<b>CD</b> Ciclodextrinas	<b>KA</b> Constante de asociación
<b>CF</b> Carbofuran	<b>LC</b> Cromatografía líquida
<b>CFA</b> Ciclofanos	<b>LLC</b> Cromatografía líquido-líquido
<b>CFo</b> Ciclo de Förster	<b>LOD</b> Límite de detección
<b>CG</b> Cromatografía gaseosa	<b>LOQ</b> Límite de cuantificación
<b>CHL</b> Clorothalonil	<b>LSC</b> Cromatografía líquido sólido
<b>CV</b> Variables latentes	<b>M</b> Melatonina
<b>CY</b> Carbaryl	<b>MCL</b> Niveles máximos de concentración
<b>DAD</b> Detector de arreglo de diodos	<b>MTF</b> Método de titulación fluorimétrica
<b>DPhA</b> Difenilamina	<b>NPhA</b> Nitrosodifenilamina
<b>EJCR</b> Región elíptica de confianza conjunta	<b>NMC</b> N-metilcarbamatos
$\epsilon$ Absortividad molar	<b>NTE</b> Estearasa neurotóxica
<b>F</b> Espectrofotometría de fluorescencia	
<b>FI</b> Intensidad de fluorescencia del fluoróforo	
<b>FS</b> Fluorescencia sincrónica	

**P** Pesticida

**PC** Promecarb

**PCR** Regresión por componentes  
principales

**PBI** Producto bruto interno

**pK<sub>a</sub>\*** pKa en el estado excitado

**PLS** Cuadrados mínimos parciales

**PRESS** Suma cuadrática de errores  
de predicción

**Q** Qüencher

**QS** Química supramolecular

**RA** Resorcinarenos

**REP** Errores relativos de predicción

**RMN** Resonancia magnética  
nuclear

**RMSEP** Error cuadrático medio de  
la predicción

**SEN. Ana** Sensibilidad analítica

**TLC** Cromatografía líquida en capa  
delgada

**UV-Visible** Ultravioleta visible

**$\Delta\lambda$**  Desplazamiento de Stokes en  
nm

**$\Delta\nu$**  Desplazamiento de Stokes en  
 $\text{cm}^{-1}$





# CAPÍTULO I

---

## Introducción temática

---





# **1. Introducción**

## **1.1. Química Analítica**

La química analítica se caracteriza por realizar análisis cualitativo y cuantitativo de gran variedad de muestras mediante uno o un conjunto de métodos, estos últimos son de gran importancia y han sido ampliamente utilizados en el campo de la ciencia y la medicina. La química analítica cualitativa permite revelar la identidad de los elementos y compuestos presentes en una muestra mediante análisis que se fundamentan en la observación de diferentes propiedades de los mismos.<sup>1</sup> Por otro lado la química analítica cuantitativa permite determinar la cantidad de una sustancia de interés en una muestra.<sup>2</sup>

Las mediciones analíticas cuantitativas tienen gran relevancia en muchas de las investigaciones relacionadas con el área de la química, bioquímica, biología, geología, física y otras ciencias. Se ha implementado desde la determinación de las proporciones de componentes para obtener acero con propiedades mecánicas específicas,<sup>3</sup> hasta metodologías eficientes para la cuantificación de carotenoides en gran variedad de alimentos.<sup>4</sup>

En la actualidad las investigaciones en química analítica se centran en desarrollar métodos sensibles, selectivos, precisos y exactos para la detección y cuantificación de un analito de interés en gran variedad de matrices complejas mediante procedimientos de bajo costo y de sencilla ejecución. El acelerado avance técnico e instrumental en química analítica desde principios del siglo XX, ha permitido aprovechar las propiedades físicas de los analitos, tales como conductividad, potencial de electrodo, absorción o emisión de luz, relación masa carga, entre otras, para resolver

problemas analíticos, facilitando el estudio de componentes en concentraciones cada vez menores.<sup>5</sup>

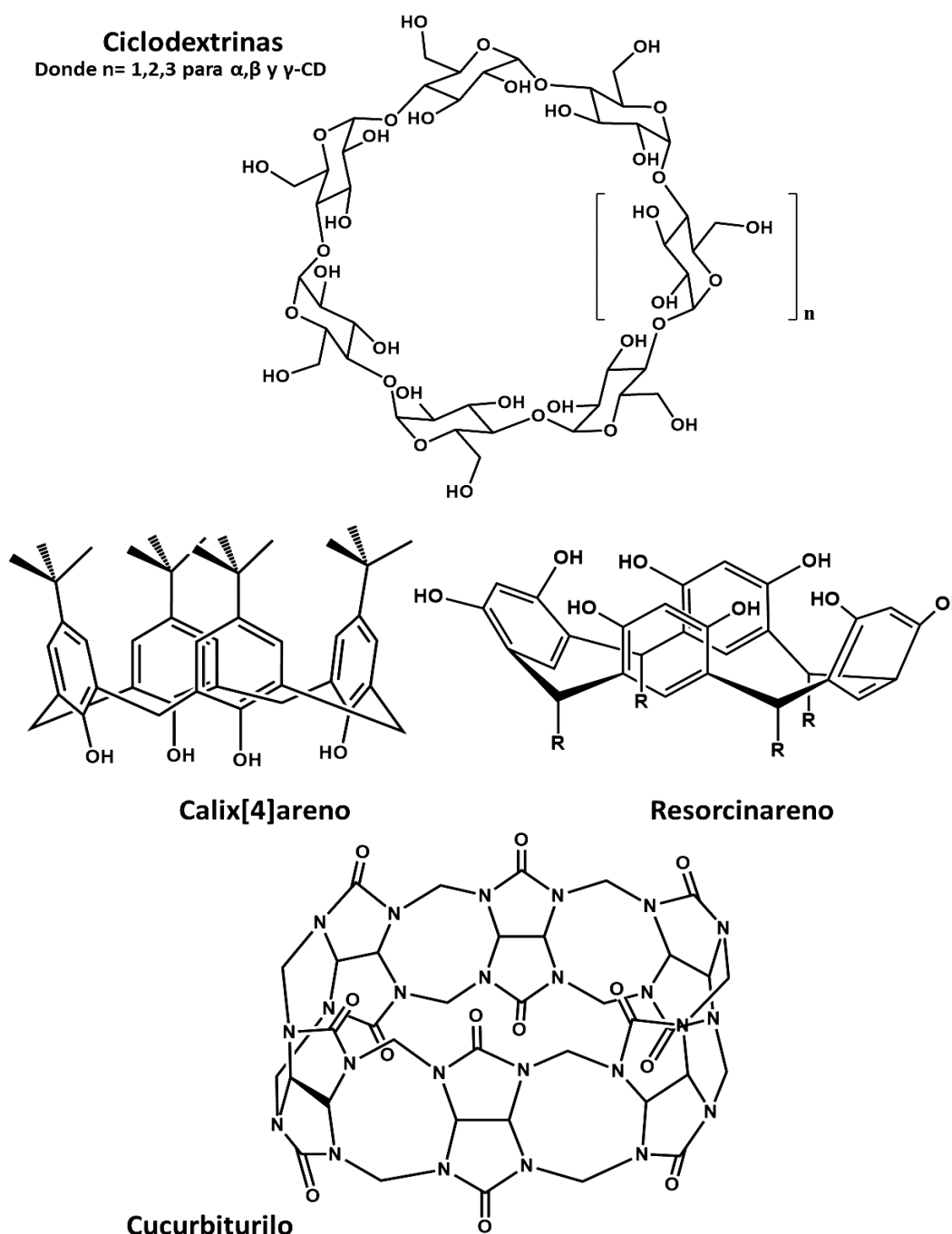
El análisis de muestras cuyos componentes se encuentran en niveles traza se dificulta por la baja sensibilidad analítica,<sup>5</sup> adicionalmente su determinación mediante técnicas más sensibles y matrices complejas se dificulta por el efecto matriz y la superposición de las señales relacionadas con el componente de interés y los interferentes de la muestra.<sup>6,7,8,9</sup> Lo expuesto anteriormente cobra gran relevancia si analizamos normativas que determinan las concentraciones mínimas permitidas de algunos contaminantes en el ámbito ambiental y agrícola, las cuales suelen estar indicadas en el orden de ppm.<sup>10</sup>

Así, la búsqueda continua de sensores moleculares que permitan mayor sensibilidad y selectividad se ha incrementado, encontrando dentro de estos sensores sistemas orgánicos, inorgánicos e híbridos tales como polímeros, nanopartículas metálicas recubiertas de ligandos orgánicos, óxidos como las zeolitas y oligómeros orgánicos cíclicos, usualmente denominados macrociclos.

En la química supramolecular, las interacciones entre los sensores y los analitos son del tipo no-covalentes. Estos sistemas organizados se clasifican en dos tipos principales; uno de estos se basa en la formación de agregados moleculares integrados por micelas, vesículas, monocapas y sistemas relacionados; por otra lado encontramos compuestos polimoleculares tales como polisilicatos del tipo de las zeolitas, poliazúcares como ciclodextrinas, poliéteres tales como crown éteres o éteres corona, entre otros.<sup>11,12</sup>

Dentro de los sensores polimoleculares encontramos sistemas macrocíclicos que presentan cavidades denominados cavitandos, entre los más comunes se encuentran las ciclodextrinas (**CD**),<sup>13</sup> los cucurbiturilos (**CB**),<sup>14</sup> los ciclofanos (**CFA**) dentro de los que se destacan los resorcinarenos (**RA**),<sup>15</sup> y los calixarenos (**CA**).<sup>16</sup> Las estructuras químicas de estos macrociclos se muestran en la figura I.1. Estos compuestos pueden interaccionar con diferentes sustratos formando complejos, también

denominados supramolécula. La formación de estas especies puede alterar diferentes propiedades fisicoquímicas de los sustratos involucrados, por lo cual la química huésped-receptor ha sido empleada para: reconocimiento selectivo de diferentes especies tanto orgánicas como inorgánicas, estudio de sistemas bioquímicos, separación de especies orgánicas, estabilidad de fármacos, aumentar la solubilidad de moléculas orgánicas en agua, entre otros.<sup>12,17,18</sup>



*Figura 1.1. Estructuras macrocíclicas con cavidades (Cavitandos).*

Un sensor puede reconocer (interaccionar) en menor o mayor medida a un analito específico dependiendo de la naturaleza de las fuerzas que los mantienen asociados, contemplando desde factores geométricos como la forma, el tamaño y la conformación; pasando por afinidades químicas como la hidrofobicidad e hidrofiliidad de las moléculas, hasta interacciones puente de hidrógeno, electrostáticas entre otras.<sup>19</sup>

Con base en lo anterior, se puede modificar la afinidad de un sensor con un analito específico modificando sintéticamente la estructura del sensor, intensificando las interacciones supramoleculares que estabilizan el complejo entre las dos especies, ejemplo: se puede mejorar la complementariedad química. De esta manera, el aumento en las fuerzas con las que interaccionan las dos especies puede verse reflejado en el cambio de la señal analítica colectada, y por consiguiente de una mayor selectividad del sensor al analito.<sup>19</sup>

Como se comentó anteriormente la química analítica se basa en el desarrollo y la aplicación de estrategias experimentales e instrumentales, en nuevos métodos de análisis o en mejorar métodos ya establecidos.<sup>20</sup> Siguiendo estos lineamientos se han desarrollado desde ya hace unos años métodos de análisis que tienen como fundamento la interacción molecular no covalente, reconocimiento molecular y/o auto-ensamblado bajo el calificativo de “química analítica supramolecular”, la cual se basa en la aplicación de sistemas organizados supramoleculares a diversas técnicas analíticas.<sup>21</sup>

## **1.2. Química Supramolecular**

Durante muchos años el termino supramolecular fue atribuido a estructuras biológicas complejas, estructuras que llevan consigo una característica de gran relevancia, como lo son las “reacciones con sistemas organizados”. No obstante Jean M. Lehn, quien fuera premio nobel de química en 1987, dio al termino supramolecular un valor agregado al plantear que la “química supramolecular” estudiaba las interacciones a nivel

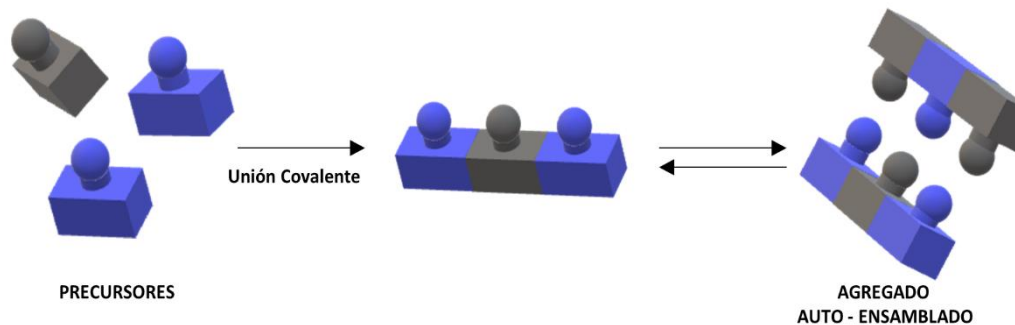
molecular, llamándola también “la química después de las moléculas” o “la química del enlace intermolecular”, promoviendo así el aumento exponencial del estudio, desarrollo y aplicación de la química supramolecular en el campo científico.<sup>19,11</sup>

En la terminología empleada por la química supramolecular es habitual encontrar los términos “receptor” y “huésped”, siendo este último el sustrato o analito de interés. Estos términos son utilizados para diferenciar los sistemas biológicos como los complejos enzima–sustrato de los sintéticos, puesto que presentan grandes similitudes en sus principio de interacción.<sup>22</sup>

A continuación, se plasman algunas características a tener en cuenta en los sistemas huésped–receptor.

### **1.2.1.Sistemas auto–ensamblados**

Un sistema denominado como supramolecular comprende la asociación de dos o más especies que forman un agregado de mayor tamaño y de arquitectura más compleja. Los bloques que conforman estos agregados son moléculas simples enlazadas covalentemente, y algunas o todas las moléculas simples pueden contener grupos funcionales que actúen como sitios de unión. Estos sitios de unión son los encargados de interaccionar no covalentemente con los sitios de unión complementarios en los otros bloques que conforman el agregado supramolecular. La elección adecuada de las moléculas precursoras es conocido como preorganización, y busca favorecer las interacciones entre los bloques, formando así estructuras definidas y estabilizadas como se muestra en la figura I.2.



*Figura 1.2. Representación de un sistema auto-ensamblado.*

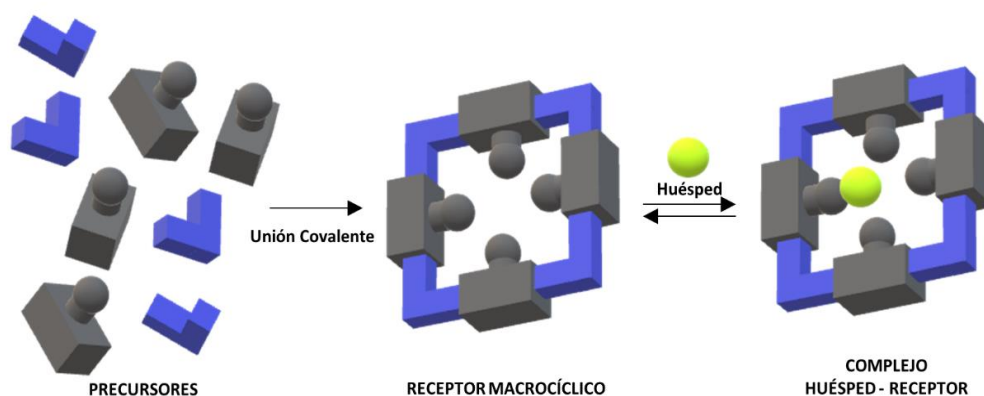
### 1.2.2. Química huésped-receptor

La química huésped-receptor se rige tanto por la complementariedad de los sitios de unión, como por la complementariedad de tamaño y forma de la cavidad del receptor con las dimensiones de la molécula huésped, como es conocido con los sistemas enzima-sustrato,<sup>23</sup> y una preorganización espacial de los sitios de unión favorece la eficiencia del proceso de reconocimiento.

En los sistemas huésped-receptor, los receptores tienen como característica una estructura que forma cavidades, estas cavidades son formadas por la unión covalente de moléculas sencillas. Los sitios de unión en estos receptores se encuentran preorganizados de tal forma que convergen entre sí como se muestra en la figura 1.3.<sup>19</sup> Si bien la interacción entre las especies puede darse de formas diferentes como se verá más adelante, es necesario que la cavidad sea relativamente más grande que el huésped para que este último pueda ser albergado por el receptor.

Una adecuada elección de los precursores, y la disposición espacial de los sitios de unión puede reducir el número de huéspedes que pueden ocupar el espacio que define la cavidad del receptor, favoreciendo la complementariedad de las especies, y por consiguiente la selectividad del sistema será mayor, y es por esta razón que los receptores más comunes

se caracterizan por tener una estructura cíclica, dando así su nombre genérico de macrociclo. La entidad formada por la interacción supramolecular de estas especies se conoce como “complejo huésped–receptor”, y su disposición se muestra en la figura I.3.<sup>19,24</sup>



*Figura I.3. Representación de un complejo huésped–receptor.*

### 1.2.3. Tipos de interacciones no covalentes

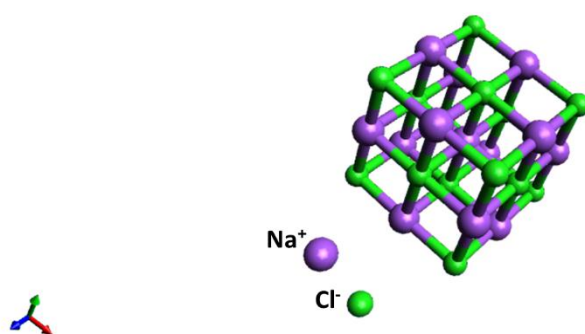
Como se indicó anteriormente, las fuerzas de unión que estabilizan los agregados auto–ensamblados y los complejos huésped–receptor son interacciones no covalentes, cuya energía de unión varía entre los 2 kJ/mol y los 350 kJ/mol. Si bien existen algunos tipos de interacción con energías equivalentes a las de un enlace covalente, estas últimas van desde los 150 kJ/mol hasta los 450 kJ/mol,<sup>19,25</sup> y son mayores a las que presentan las interacciones no covalentes más comunes.

#### 1.2.3.1. Interacciones ion–ion

Las interacciones que involucran especies con carga son conocidas como interacciones ion–ion, este tipo de interacción posee energías entre 100 kJ/mol y 350 kJ/mol, haciéndola comparable con la energía de un enlace covalente.<sup>19</sup> Estas interacciones se basan en la atracción coulombica entre especies que posean cargas opuestas y que se encuentren cercanas entre

sí. Un buen ejemplo de lo anteriormente indicado se puede observar en la estructura cubica del NaCl, donde el  $\text{Na}^+$  se encuentra rodeados de hasta seis aniones  $\text{Cl}^-$ .

Una característica importante en este tipo de interacciones es que no son direccionales, lo que significa que las especies no deben estar en posiciones específicas para atraerse. Una representación de las interacciones ion-ion se observa en la figura I.4.



*Figura I.4. Estructura cristalina del NaCl estabilizada por interacciones ion-ion.*

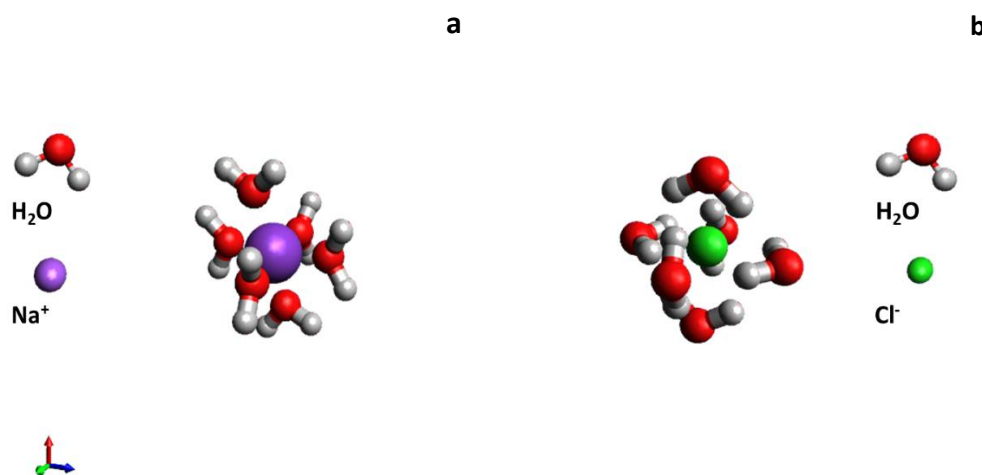
### **1.2.3.2. Interacciones ion-dipolo**

En las interacciones ion-dipolo se ven involucradas una especie iónica y otra especie con carácter polar. Un ejemplo claro de este tipo de interacción es la solvatación del  $\text{Na}^+$  por  $\text{H}_2\text{O}$ , donde el catión es rodeado por las moléculas de agua posicionadas de tal forma que el oxígeno con densidad de carga negativa queda más cerca al  $\text{Na}^+$  como se muestra en la figura I.5.a.

La necesidad de que la densidad de carga de la especie polar este posicionada de una forma determinada hace que se considere como una interacción direccional, cuya energía de atracción va de los 50 kJ/mol a los 200 kJ/mol. <sup>19</sup>



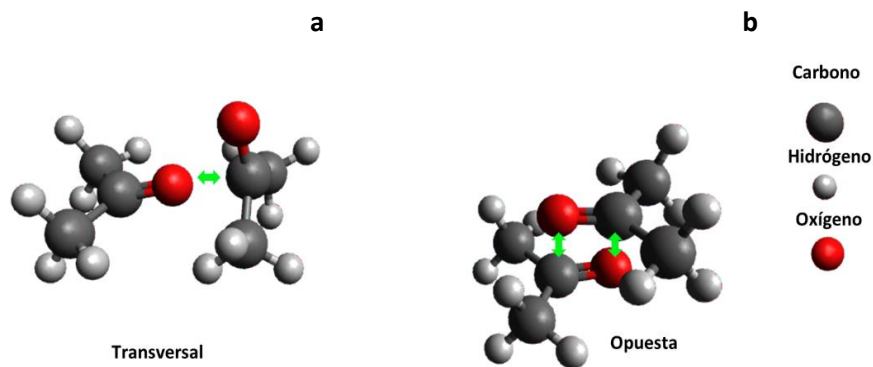
Una representación de las interacciones ion–dipolo en la química supramolecular, es el complejo formado por un catión metálico y un éter corona, el cual es un tipo de macrociclo. El complejo se puede observar en la figura I.5.b.



*Figura I.5. Ejemplos de interacciones ion–dipolo. a. catión–dipolo b. anión-dipolo.*

### 1.2.3.3. Interacciones dipolo–dipolo

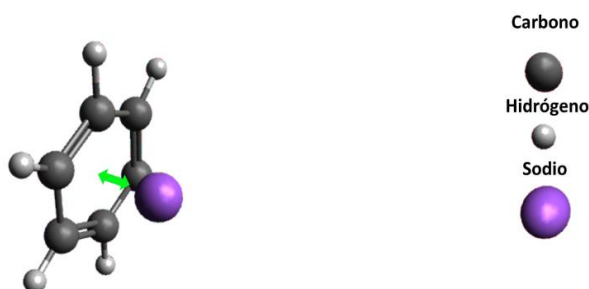
Es un tipo de interacción direccional que se basa en la atracción de especies polares, la adecuada orientación de los dipolos que interactúan es de gran importancia en la estabilidad y la eficiencia de los agregados o complejos formados. La energía de una interacción dipolo–dipolo varía entre los 5 kJ/mol y los 50 kJ/mol.<sup>19</sup> En la figura I.6.a y b se muestran las orientaciones posibles en que los dipolos pueden interactuar, siendo la estructura más eficiente la presente de la figura I.6.a.



**Figura I.6.a.** Interacciones dipolo–dipolo transversal. **b.** Interacciones dipolo–dipolo opuestas.

### 1.2.3.4. Interacciones catión– $\pi$

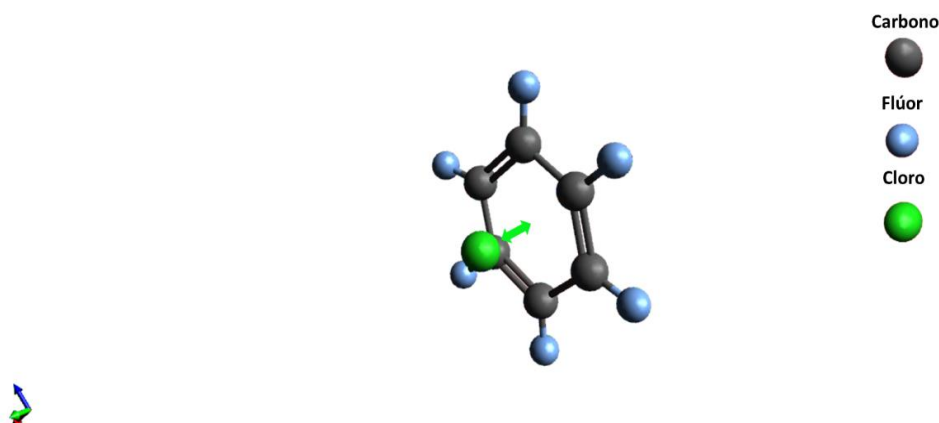
Para hablar de este tipo de interacciones vale mencionar como ejemplo metales de transición como el  $\text{Fe}^{2+}$  y  $\text{Pt}^{2+}$  que forman complejos con hidrocarburos olefínicos y aromáticos como se muestra en la figura I.7, y cuya energía varía entre los 5 kJ/mol y los 80 kJ/mol. Esta interacción se da entre los orbitales  $d$  parcialmente ocupados del metal con la densidad de carga negativa de los dobles enlaces de las olefinas.<sup>19</sup> Otro ejemplo es la interacción de la acetilcolina catiónica y una sección del triptófano del receptor de la acetilcolina.<sup>26</sup>



**Figura I.7.** Interacciones catión– $\pi$ .

### 1.2.3.5. Interacciones anión- $\pi$

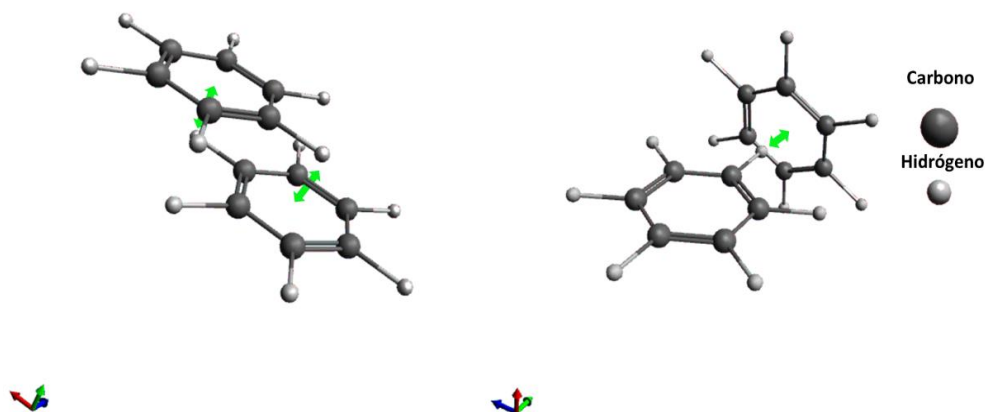
Este tipo de interacciones se caracterizan por la inversión de la carga relativa del sistema  $\pi$  mediante la presencia de grupos fuertemente electronegativos enlazados al sistema de dobles enlaces. Esto permite que se pueden atraer especies aniónicas por parte del receptor, que en este caso tendría la densidad de carga invertida como se puede observar en la figura I.8.<sup>19</sup>



*Figura I.8. Interacciones anión- $\pi$ .*

### 1.2.3.6. Interacciones $\pi$ - $\pi$ stacking

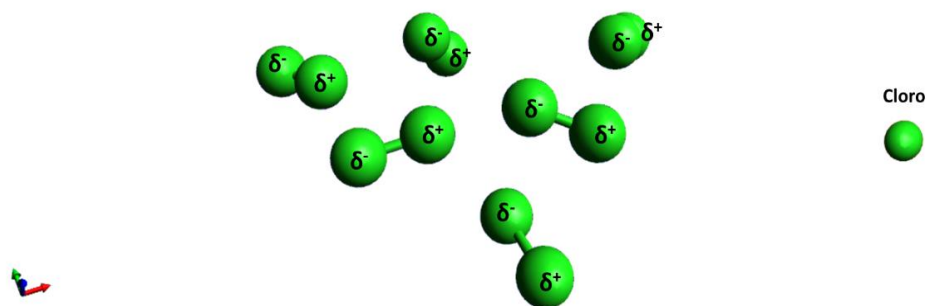
Este tipo de interacción electrostática es bastante débil, teniendo energías de atracción entre los 0 kJ/mol y los 50 kJ/mol. La atracción de las especies se da entre las diferencias de carga relativa de los anillos aromáticos. La disposición de los anillos es de gran importancia en este tipo de interacción como se puede observar en la figura I.9.<sup>19</sup>



*Figura I.9. Interacciones  $\pi$ - $\pi$  stacking.*

### 1.2.3.7. Fuerzas de Van der Waals

Las fuerzas de Van der Waals son interacciones no direccionales débiles cuya energía es  $< 5$  kJ/mol, existe una atracción electrostática producto de la polarización de la nube electrónica de dos moléculas adyacentes. Un ejemplo de estos complejos se observa en la figura I.10.

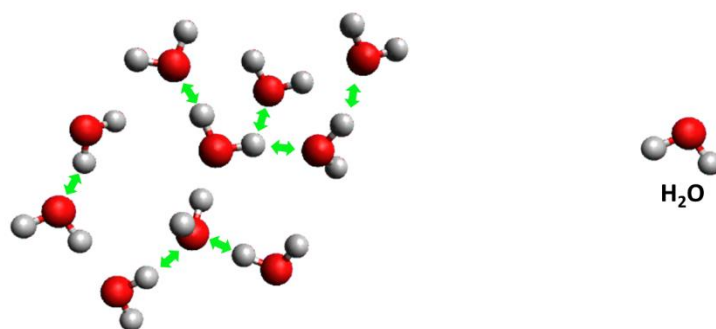


*Figura I.10. Interacciones mediante fuerzas de Van der Waals.*

### 1.2.3.8. Interacciones por puente de hidrógeno

Son las interacciones más comunes, son ampliamente conocidas y forman parte de las interacciones dipolo-dipolo, presenta energías de unión

de 4 kJ/mol hasta 120 kJ/mol,<sup>19</sup> y se pueden encontrar en diferentes campos de la química. Un ejemplo son las interacciones por puentes de hidrógeno entre la adenina y timina que estabilizan la doble hélice del ADN, o son los encargados de mantener unidas las proteínas con un ligando determinado<sup>27</sup> Una representación de los puentes de hidrógeno se puede observar en la figura I.11.



*Figura I.11. Interacciones mediante puentes de hidrógeno.*

#### **1.2.4. Reconocimiento molecular**

Los sistemas supramoleculares tienen como principio fundamental el reconocimiento selectivo entre especies, lo que hace que el reconocimiento molecular constituya los pilares sobre los cuales la química supramolecular se soporta. Un receptor debe tener compromiso entre la rigidez y la flexibilidad de su estructura puesto que estas características juegan un rol relevante en la selectividad y la estabilidad de los complejos huésped-receptor formados.<sup>19,28</sup>

Un receptor flexible permite que su estructura se ajuste a la forma de un sustrato determinado, aumentando la estabilidad del complejo formado. Esta característica en conjunto con principios como la complementariedad electrónica y espacial entre los sitios de unión del huésped y el receptor, así como la preorganización conformacional del receptor para recibir el

huésped, son factores fundamentales en la selectividad de un sistema supramolecular.<sup>28,29,30</sup>

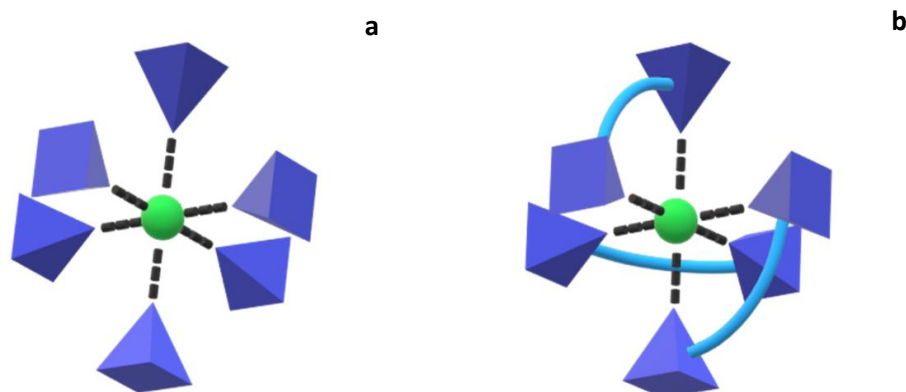
Los aspectos anteriormente mencionados son los evaluados a la hora de seleccionar un receptor que sea selectivo a un huésped determinado, estos sistemas supramoleculares han encontrado gran variedad de aplicación en diferentes campos de la ciencia; se han realizado estudios del efecto que puede generar la presencia de estos macrociclos en el organismos,<sup>31</sup> esto ha impulsado estudios de transporte y liberación de fármacos.<sup>32,33</sup> De igual forma se registran estudios en la determinación de diferentes compuestos de interés biológico y ambiental en diferentes matrices.<sup>34,35</sup>

#### **1.2.4.1. Mecanismos de reconocimiento molecular**

Los sistemas supramoleculares pueden ser categorizados en dos clases principales: complejo y sencillo. El primero consiste en la formación de complejos donde los precursores actúan como sitios de unión, actuando como ligandos monodentados que en presencia de un sustrato adecuado tienden a posicionarse alrededor del mismo recubriendo la mayor superficie posible y aislándolo del medio como se muestra en la figura I.12.a. Estas entidades aumentan su estabilidad mientras más ligandos estén interactuando con el sustrato, esto genera que se forme menor cantidad de especies supramoleculares, lo que es entrópicamente desfavorable para el sistema.

Sin embargo, si evaluamos ligandos bidentados de dos especies precursoras enlazadas covalentemente entre sí y que sigue actuando como sitio de unión, se puede equilibrar el balance termodinámico de la especie supramolecular formada. Esta característica es de gran relevancia a la hora de estudiar un posible efecto quelato, donde un ligando bidentado desplaza a uno monodentado. Este efecto ayuda en la estabilidad entre el ligando y el sustrato,<sup>36</sup> puesto que la unión del primer ligando bidentado favorece la cinética de unión de los ligandos subyacentes, esto es conocido como efecto

cooperativo.<sup>37</sup> Una representación de un complejo entre un ligando bidentado y un sustrato se observa en la figura I.12.b.

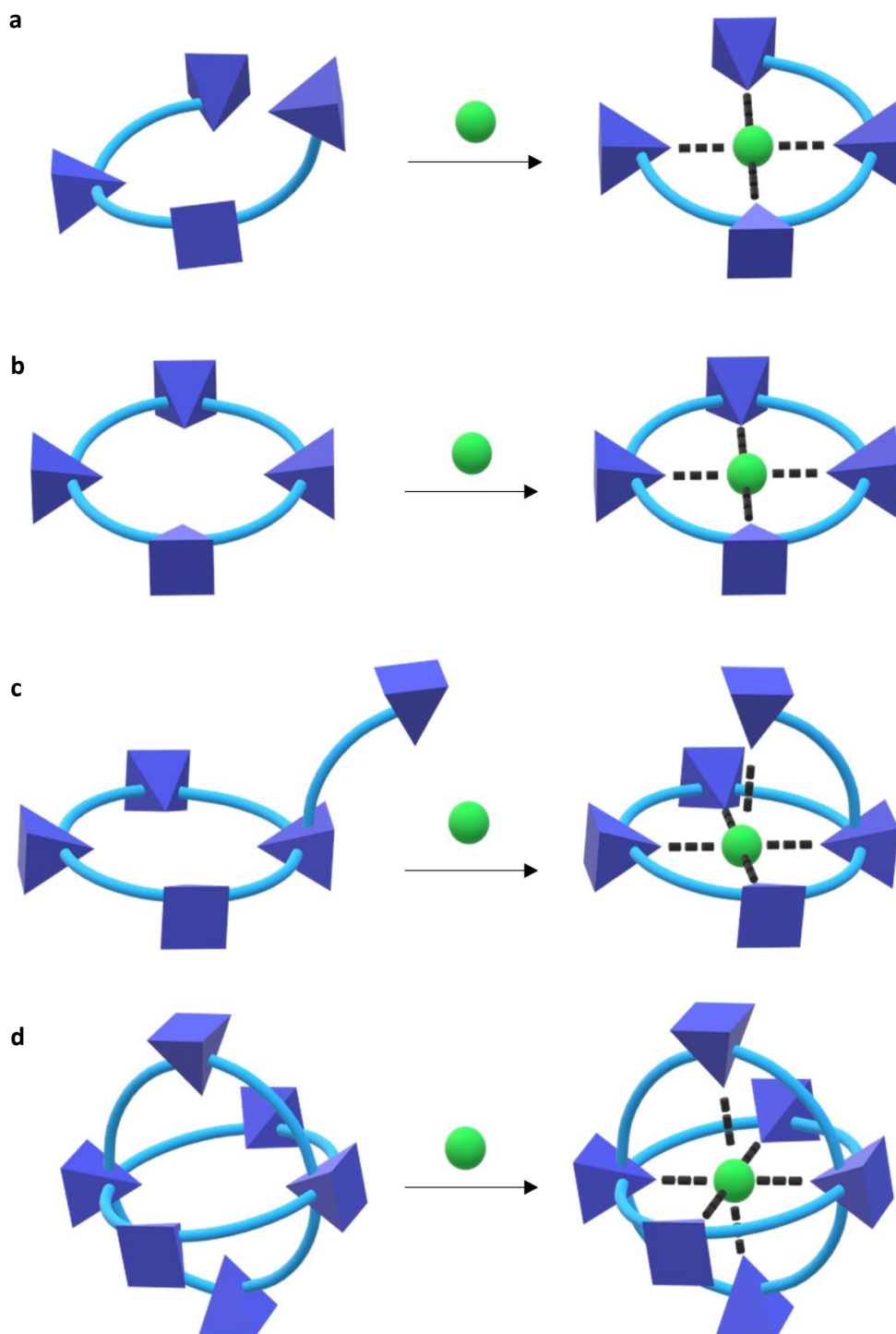


**Figura I.12.** Complejos de inclusión mediante efecto quelato entre un sustrato y un **a.** ligando monodentado **b.** ligando bidentado.

Los sistemas supramoleculares sencillos o simples constan de un receptor cuyos sitios de unión están presentes en todos o alguno de los precursores, que a su vez están unidos covalentemente y convergen hacia el huésped. Se pueden distinguir dos tipos de receptores, los acíclicos y los macrocíclicos. Los primeros forman complejos entre un receptor como el descrito y un sustrato determinado, estos son llamados podando. Su interacción con el sustrato requiera de cambios conformacionales del receptor que se ven favorecidos cinéticamente luego que las primeras interacciones entre los sitios de unión de ambas especies se formen.<sup>19</sup> La figura I.13.a muestra una representación de un complejo con receptor de tipo podando.

Otra clase de receptores son los denominados macrocíclicos, en estos los precursores se enlazan covalentemente formando una estructura cíclica fijando espacialmente los sitios de unión. Esta predisposición de los sitios para la interacción con el sustrato, genera que el cambio conformacional de la estructura sea mínimo, lo que se traduce en complejos más estables; y esto es lo que se conoce como efecto macrocíclico, efecto que se ha demostrado es capaz de modificar incluso las propiedades fisicoquímicas de

los monómeros precursores del receptor.<sup>19,38</sup> Una representación de un receptor macrocíclico interactuando con un sustrato se puede observar en la figura I.13.b.



**Figura I.13.** Preorganización de sitios de unión en receptores. *a.* podandos. *b.* macrociclos bidimensionales. *c.* macrociclo tridimensional semiesférico *d.* macrociclo tridimensional esférico.



La unión covalente de un macrociclo bidimensional con una estructura lineal que posea sitios activos de unión permite plantear la síntesis de receptores tridimensionales con geometrías semiesféricas como la que se muestra en la figura I.13.c, o esféricas como la representada en la figura I.13.d.

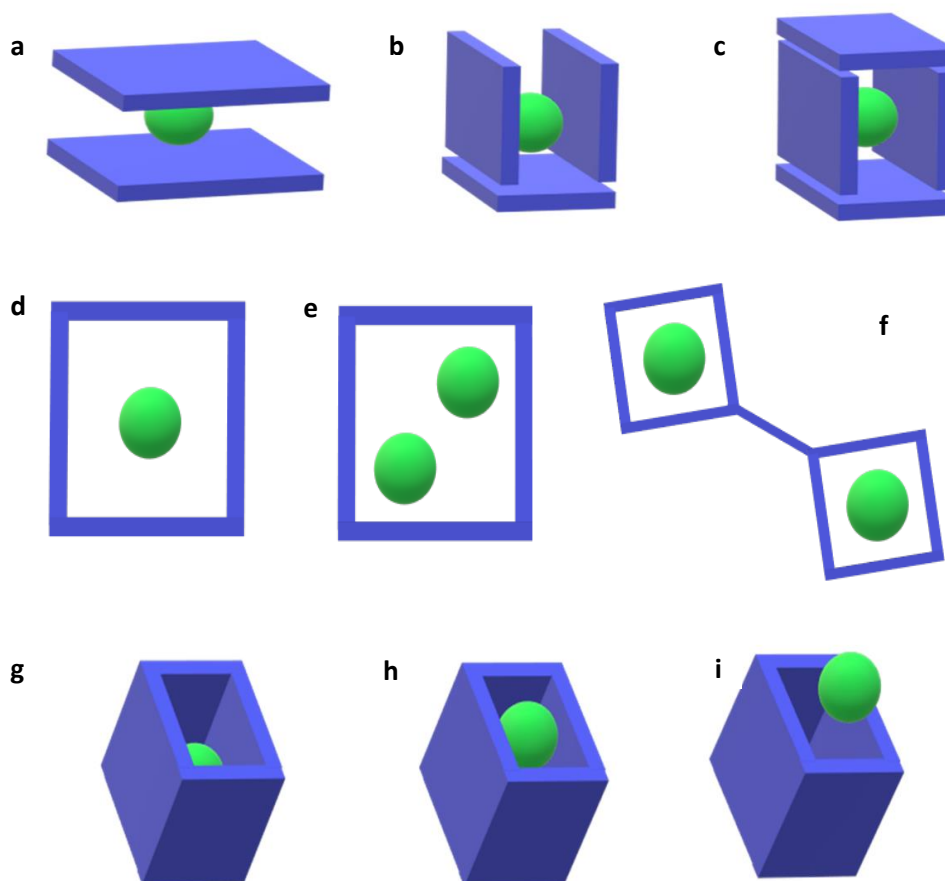
### **1.2.4.2. Tipos de complejos supramoleculares**

Como se mencionó anteriormente los sistemas supramoleculares pueden ser auto-ensamblados o complejos huésped-receptor, pero la asociación de las especies dependerá de la naturaleza del reconocimiento químico y la complementariedad espacial y química, por lo que esto determinará la estequiometría del complejo formado. Es posible obtener complejos 1:1 con una molécula de receptor y otra de sustrato, 2:1 con dos moléculas de receptor y una de sustrato, 1:2 con una molécula de receptor y dos de sustrato, o incluso estequiometrías mayores.<sup>39</sup>

En la formación de auto-ensamblados, si el receptor presenta sitios de unión con disposiciones divergentes se pueden formar complejos tipo sándwich como se muestra en la figura I.14.a. Otra disposición de los receptores puede dar lugar a la formación de cavidades auto-ensambladas no covalentes como se muestran en las figuras I.14.b y c.

En cuanto a los sistemas huésped-receptor, pueden formarse estructuras donde un huésped de menor tamaño se posiciona en la cavidad de un receptor bidimensional como se muestra en las figuras I.14.d-f.

Los receptores macrocíclicos tridimensionales pueden interactuar con el huésped de tal forma que este último se incluya completa o parcialmente en la cavidad como lo muestran las figuras I.14.g y h respectivamente. Otra disposición posible puede darse con el analito posicionándose en la parte externa del portal tridimensional formado por el receptor, como se muestra en la figura I.14.i.<sup>19</sup>



**Figura I.14.** Representación de tipos de complejos auto-ensamblados y huésped-receptor.

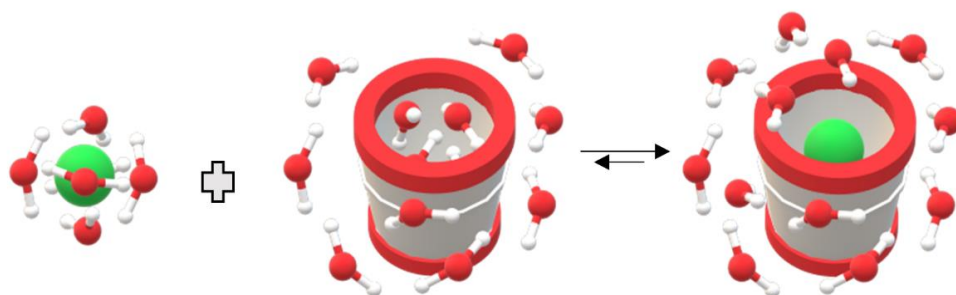
## 1.2.5. Química huésped-receptor en solución

### 1.2.5.1. Efecto hidrofóbico

El efecto hidrofóbico es de gran relevancia en la formación de los complejos huésped-receptor, por lo que conocer la polaridad de las especies involucradas en el sistema, permite inferir cuál sería el solvente más adecuado a la hora de plantear un sistema supramolecular.<sup>40</sup> Las cavidades de los receptores macrocíclicos suelen poseer un ambiente químico de baja polaridad,<sup>41</sup> y en solución contienen moléculas del solvente.

Idealmente la polaridad de la cavidad y del solvente deben diferir, esto permitirá que un sustrato de polaridad complementaria desplace al solvente, generándose un proceso de desolvatación, favoreciendo la entropía del

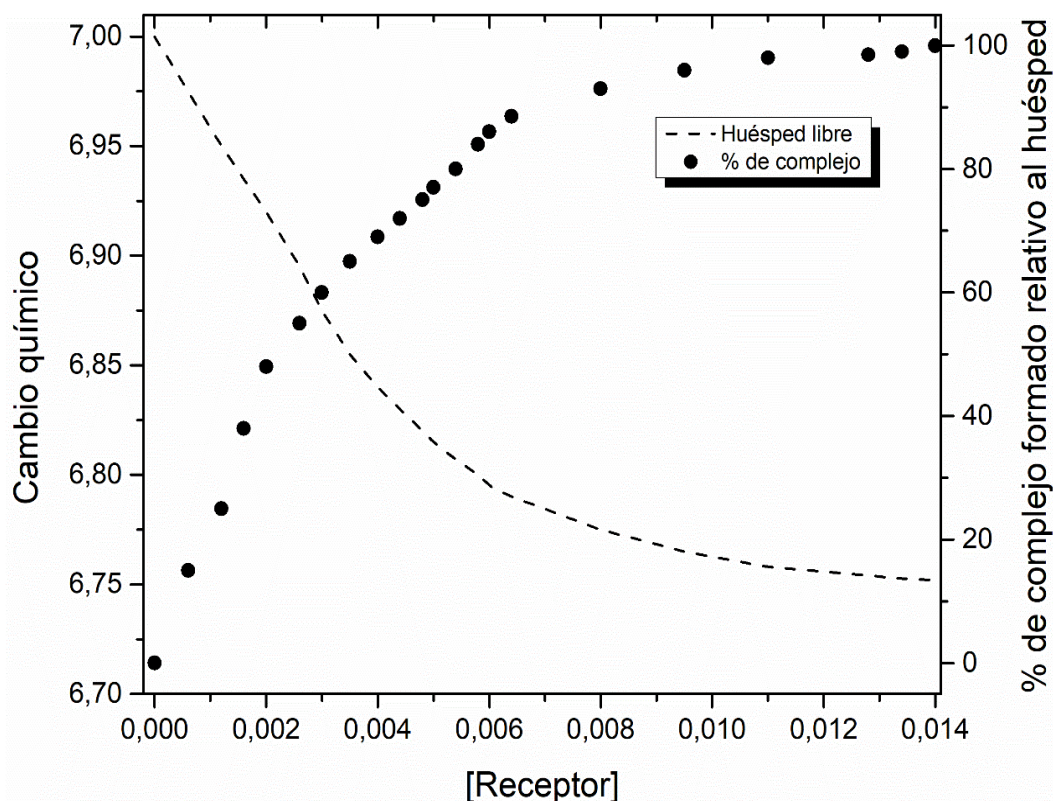
sistema, y en consecuencia la estabilidad del mismo.<sup>42</sup> Un esquema del efecto hidrofóbico en la formación de complejos huésped-receptor se observa en la figura I.15.



*Figura I.15. Representación del efecto hidrofóbico en la formación de un complejo huésped-receptor.*

### **1.2.5.2. Determinación de constantes de asociación**

La interacción entre una molécula huésped con otra molécula receptora se lleva a cabo mediante un equilibrio gobernado por una constante de asociación ( $K_A$ ), este valor puede ser determinado por diferentes técnicas donde se evalúa alguna propiedad intrínseca de una de las especies a medida que se aumenta la concentración de la otra, promoviendo la formación del complejo.<sup>43,44,45</sup> En la figura I.16 se observa como la formación de un complejo puede ser seguida mediante alguna técnica analítica. Un sistema adecuado permite apreciar la disminución de la señal del huésped libre y mostrar la aparición de señales propias del complejo huésped-receptor a diferentes concentraciones de receptor. Se considera que la formación de complejo es máxima cuando la señal no varía significativamente o se mantiene constante, no obstante, existen sistemas donde no es posible alcanzar este equilibrio.<sup>38,46</sup>



**Figura 1.16.** Análisis cuantitativo de especies involucradas en la formación de un sistema supramolecular.

La elección de la técnica más adecuada para la determinación de la  $K_A$  de un complejo huésped–receptor, dependerá de las propiedades intrínsecas de las especies involucradas, y si la propiedad evaluada es sensible o no a la formación del complejo. Por ejemplo, si el huésped es fluorescente, y la intensidad de la fluorescencia es alterada por la formación del complejo, la técnica adecuada para determinar la  $K_A$  será la espectroscopia de fluorescencia.<sup>35,47</sup>

Existen técnicas que presentan ventajas al momento de la determinación de una  $K_A$ , estas ventajas se basan principalmente en la sensibilidad a la hora de registrar las señales, estas técnicas son principalmente la espectrofotometría ultravioleta visible (UV-visible) y/o la espectrofotometría de fluorescencia (F).<sup>43,48</sup> El principal problema de estas mediciones son las usuales superposición de señales, que impiden asignar el cambio espectroscópico a una única especie en el medio.<sup>49</sup> Técnicas más selectivas pero menos sensibles como la espectroscopia infrarroja (IR) o la resonancia magnética nuclear (RMN), también son útiles a la hora de determinar las  $K_A$

cuando se presentan dificultades como las anteriormente mencionadas, estas técnicas brindan información con respecto al entorno de algún sitio de unión, permitiendo obtener adicionalmente información estructural del complejo.<sup>50,45</sup>

### **1.3. Pesticidas**

Se conoce como pesticida a cualquier sustancia destinada a prevenir, destruir, atraer, repeler o combatir cualquier plaga, incluidas las especies indeseadas de plantas o animales, durante la producción, almacenamiento, transporte, distribución y elaboración de alimentos de consumo humano, productos agrícolas o alimentos para animales. En este término se incluye las sustancias destinadas a regular el crecimiento de plantas, defoliantes, desecantes, agentes para reducir la densidad de fruta o inhibidores de la germinación, y las sustancias aplicadas a los cultivos antes o después de la cosecha para proteger el producto de deterioro durante el almacenamiento y transporte. El término no incluye normalmente los fertilizantes, nutrientes de origen vegetal o animal, aditivos alimentarios ni medicamentos para animales.<sup>51</sup>

Los pesticidas se clasifican según su uso, como se puede inferir de la definición anteriormente dada. Dentro de los usos más comunes los encontramos como insecticidas, herbicidas y fungicidas, y dentro de estas categorías se encuentran clasificados por sus diferentes orígenes y familias químicas. Así, entre los insecticidas encontramos un grupo de pesticidas orgánicos denominados carbamatos. Los cuales se detallan más adelante.<sup>52</sup>

El uso de pesticidas en la agricultura con diferentes fines, puede generar que se acumulen residuos de estas sustancias en alimentos de consumo humano, productos agrícolas, alimentos para animales, suelos, fuentes hídricas superficiales y/o subterráneas.<sup>53,54</sup> Esta situación representa una gran problemática puesto que la presencia de estos compuestos en el organismo resulta altamente peligroso debido a su toxicidad.

### **1.3.1. Pesticidas en el mundo**

Varios pesticidas de origen agrícola y otros contaminantes orgánicos han causado estragos en la humanidad debido a sus propiedades de bioacumulación y a su elevada toxicidad. Se sabe que estos compuestos dificultan el funcionamiento normal de los sistemas endocrino y reproductor de los organismos vivos. Algunos plaguicidas como el dicloro-difenil-tricloroetano, el clordano, la aldrina, la endrina, el heptacloro y el hexaclorobenceno tienen efectos nocivos para la salud humana y el ambiente.<sup>55</sup>

Para el 2019 en todo el mundo se utilizaron aproximadamente 2 millones de toneladas de plaguicidas, de los cuales el 47,5 % son herbicidas, el 29,5 % son insecticidas, el 17,5 % son fungicidas y el 5,5 % son otros plaguicidas. Los diez países que más plaguicidas consumen en el mundo son China, Estados Unidos, Argentina, Tailandia, Brasil, Italia, Francia, Canadá, Japón e India. Además, se calculaba que para el año 2020 el uso mundial de plaguicidas aumentaría hasta los 3,5 millones de toneladas.<sup>55</sup>

### **1.3.2. Pesticidas en la República Argentina**

La producción agropecuaria de la Argentina representa más del 30 % de su producto bruto interno (PBI), el 60% de las exportaciones y el 90% de los alimentos que se producen en el país.<sup>52</sup>

Las características climáticas y variedad de suelos de la Argentina favorecen las actividades productivas en el campo. La baja necesidad de uso de fertilizantes sugiere una gran ventaja a nivel de costos y la calidad de productos obtenidos, razón por la cual, la producción agropecuaria hace parte fundamental en la economía de la Argentina.

La creciente demanda de alimentos a lo largo de los últimos años ha generado un aumento de alrededor del 68 % en la superficie de cultivos extensivos, cultivos industriales, frutales y hortalizas. Esta mayor cantidad

de tierra cultivable han generado que la producción agrícola aumente en un 189 %.<sup>56</sup>

Para brindar un contexto de la importancia del desarrollo científico relacionado con los pesticidas, es importante entender la actualidad de la producción agropecuaria en la Argentina. En la campaña 2017/18 se sembraron alrededor de 5,4 millones de hectáreas de maíz, con una producción entre los 33 y 34 millones de toneladas.<sup>57</sup> La siembra de maíz ha alcanzado más de 6,9 millones de hectáreas en la campaña 2019/20, marcando un nuevo hito en la historia del país. En la campaña 2020/21 se sembraron aproximadamente 6,7 millones de hectáreas con una producción de 17,6 millones de toneladas del cereal, un 12 % menos que la campaña anterior.<sup>58</sup>

La expansión de los cultivos de trigo, maíz, caña de azúcar y/o arboles exóticos, junto con la dificultad para mantener ciclos continuos de producción, disminuyendo la rotación de los productos cultivados; ha llevado a la necesidad de industrializar los procesos, generando un aumento considerable en el uso de fertilizantes y pesticidas.

En la Argentina se ha aumentado el uso de pesticidas tanto en las actividades extensivas como en las intensivas. Este uso elevado de pesticidas genera una serie de problemas socio ambientales entre los que se encuentran contaminación del suelo, el aire, el agua y vegetación. También ha generado la desaparición de especies de insectos benéficos beneficiosos para el ecosistema, la creación de resistencia de algunas plagas a los pesticidas y por último se han presentado casos de intoxicación e incluso muerte de personas.<sup>59</sup>

Entre 2014 y 2016 fueron importados a la Argentina aproximadamente 0,84 millones de toneladas de pesticidas,<sup>57</sup> mientras que en los 3 años siguientes entre 2017 y 2019, la importación de pesticidas fue aproximadamente 1,42 millones de toneladas, presentando un aumento del 69 %.<sup>51</sup>

### 1.3.3. Aspectos toxicológicos de los pesticidas

A pesar de su importancia en actividades de saneamiento y en el control de diferentes plagas en la agricultura, el efecto tóxico de los pesticidas en los seres humanos es innegable. La biodisponibilidad de estos compuestos en los organismos está regida por la tóxico-cinética: la absorción, distribución, mecanismo metabólico y su eliminación son aspectos de gran relevancia a la hora de evaluar la toxicidad de un compuesto determinado.

Las propiedades químicas de los pesticidas y su vía de ingreso van ligadas directamente con la absorción y las cantidades que ingresan al organismo. Esta vía de ingreso en el caso de los agricultores suele darse a través de la piel o de la inhalación del ambiente contaminado o spray a la hora de esparcir la formulación en los campos. En cuanto a las personas que no hacen parte del campo laboral de la agricultura, se ha vuelto común como vía de ingreso al organismo, la ingesta inconsciente de alimentos o agua contaminada con pesticidas.<sup>60</sup>

Los pesticidas se distribuyen por el organismo por medio del torrente sanguíneo, y de acuerdo con su solubilidad pueden adherirse a lipoproteínas (liposolubles), proteínas plasmáticas (hidrosolubles) o mantenerse diluidas en la sangre. Estos compuestos suelen tener gran afinidad con el tejido nervioso y adiposos, al igual que con el hígado y los riñones.

Estos compuestos pueden metabolizarse mediante dos rutas, una de ellas consiste en la oxidación o reducción para una hidrólisis final, este proceso suele ser catalizado por enzimas del hígado. Otra forma de metabolizarlos es mediante conjugación y síntesis, donde pueden transformarse en metabolitos inactivos como en el caso del dimetoato, o metabolitos activos como el paratión o el paraoxón que es mutagénico.<sup>60,61</sup>

La eliminación de estos compuestos del organismo se da mediante orina, heces fecales y el aire exhalado. Por la orina se eliminan las sustancias hidrosolubles sin ningún cambio, la bilis facilita la eliminación de compuestos liposolubles a través de las heces, y finalmente las sustancias que ingresan

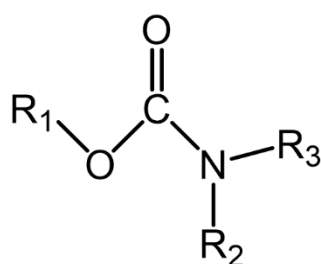


al organismo como vapor por el aire inspirado, son eliminadas por la misma vía.<sup>60,61,62</sup>

## 1.4. Analitos de interés en este trabajo de tesis

### 1.4.1. Pesticidas carbamatos

Dentro de los pesticidas carbamatos algunos son ésteres derivados de ácidos N-metil o dimetilcarbámico, tienen propiedades óxido reductoras y suelen ser empleados como nematocidas, herbicidas y fungicidas. Pueden formar compuestos mutagénicos potentes, como los N-nitrosocarbamatos. Se caracterizan por ser productos liposolubles, de toxicidad variable en humanos, que ingresan al organismo principalmente por vía respiratoria y digestiva, otras veces por vía cutánea. Inhiben la acetilcolinesterasa, enzima que degrada la acetilcolina, la cual actúa como neurotransmisor en mamíferos e insectos.<sup>63</sup> Sin embargo, no se acumulan en el organismo por poseer una vida media corta.<sup>64</sup> En la figura I.17 se observa la estructura general del grupo funcional carbamato.



*Figura I. 17. Grupo funcional carbamato.*

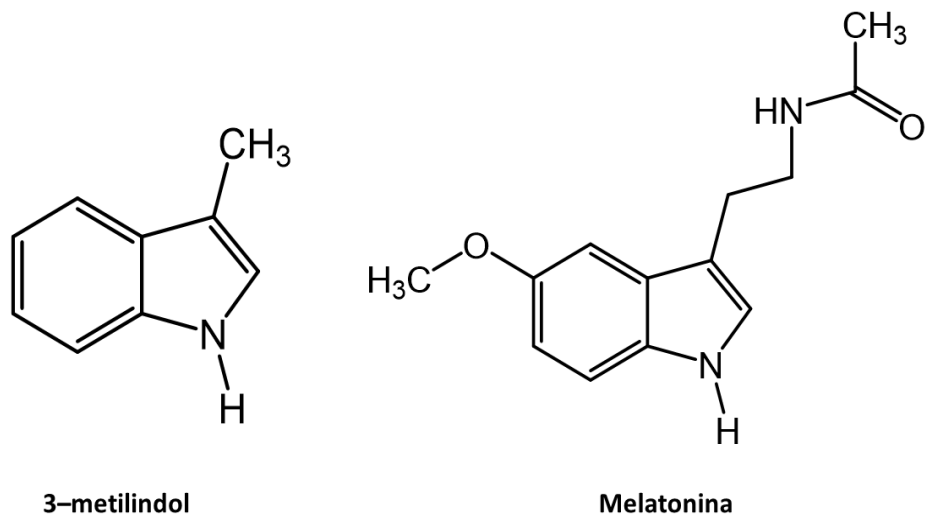
### 1.4.2. Compuestos indólicos

El indol es el compuesto madre del cual se generan gran cantidad de derivados con importantes propiedades biológicas. El indol y los alquil-

indoles simples son sólidos cristalinos incoloros con una gama de olores que van desde el naftaleno en el caso del propio indol hasta el fecal como es el caso del 3-metilindol (3MI).<sup>65</sup> El triptófano o (ácido 2-amino-3-(3'-indolil) propiónico) es uno de los aminoácidos esenciales naturales, y su metabolización en el organismo humano por parte de las bacterias del aparato digestivo genera gran cantidad de derivados, entre los que se encuentra la serotonina, la cual es un vaso constrictor que interviene en la conducción de impulsos cerebrales,<sup>66</sup> y la melatonina (M) es una hormona reguladora del ritmo circadiano y por ende regula muchas de las funciones fisiológicas en el organismo. Estos son claros ejemplos de cómo estos compuestos pueden ser aprovechados como bioindicadores.

El 3MI y M son derivados indólicos de gran importancia biológica, ya que su cuantificación se utiliza para diagnosticar patologías altamente complejas, especialmente oncológicas.<sup>67,68</sup> Poseen varias funciones biológicas; entre las que destacan sus efectos antioxidantes,<sup>69,70</sup> y están involucrados en la regulación del sueño.<sup>71</sup>

Estos indoles son productos de la metabolización del L-triptófano, el 3MI es producido en el intestino y el control de los niveles de este se puede usar como estudio de la capacidad metabólica del hígado y asociarlo con las diferentes patologías que este órgano presenta.<sup>67</sup> La M está asociada directamente con la regulación del sueño, y por ende se encuentra directamente relacionada con el insomnio, y este a su vez se relaciona con desordenes neuronales como el estrés, depresión, entre otras.<sup>71,72</sup>



*Figura I.18. Estructura química del 3-metilindol y melatonina.*



## 2. Objetivos

### 2.1. Objetivo general

- ✚ Desarrollar métodos analíticos supramoleculares para separar y cuantificar simultáneamente analitos en muestras complejas.

### 2.2. Objetivos específicos

- ✚ Determinar la interacción de un N–metilcarbamato protonable como el aminocarb y la hidroxipropil– $\beta$ –ciclodextrina (HP $\beta$ CD) mediante técnicas estacionarias como Uv–Visible y/o fluorescencia a diferentes pH. Comparar los resultados obtenidos con estudios previamente desarrollados con pesticidas de carácter neutro y que hacen parte de esta familia.
- ✚ Desarrollar una metodología supramolecular por cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) para la separación y cuantificación de aminocarb, carbofuran, bendiocarb y carbaryl.
- ✚ Validar el sistema supramolecular desarrollado y optimizado, como método para la detección y cuantificación simultánea de N–metilcarbamatos.
- ✚ Desarrollar y validar una metodología analítica para la cuantificación simultánea de melatonina y 3-metilindol mediante fluorescencia.



### 3. Bibliografía

1. Burriel Marti F, Arribas Jimeno S, Jesús HM, Lucena Conde F. *Química Analítica Cualitativa*. 18.a. (Paraninfo, ed.); 2002. <https://es.scribd.com/document/384222340/Quimica-Analitica-Cualitativa-Burriel>
2. Skoog DA, West DM, James Holler F, Crouch SR. *Fundamentos de Química Analítica*. 8th ed. (Pérez Bonilla JT, ed.). Thomson; 2005.
3. Sun J, Yang C, Guo S, et al. A novel process to obtain lamella structured low-carbon steel with bimodal grain size distribution for potentially improving mechanical property. *Mater Sci Eng A*. 2020;785:139339.
4. Turpin W, Renaud C, Avallone S, Hammoumi A, Guyot JP, Humblot C. PCR of crtNM combined with analytical biochemistry: An efficient way to identify carotenoid producing lactic acid bacteria. *Syst Appl Microbiol*. 2016;39(2):115-121.
5. Skoog DA, James Holler F, Crouch SR. *Principios de Análisis Instrumental*. 6.a. (Learning C, ed.); 2008.
6. Mao X, Wan Y, Yan A, Shen M, Wei Y. Simultaneous determination of organophosphorus, organochlorine, pyrethriod and carbamate pesticides in Radix astragali by microwave-assisted extraction/dispersive-solid phase extraction coupled with GC-MS. *Talanta*. 2012;97:131-141.
7. Bustillo J, Achdjian H, Arciniegas A, Blanc L. Simultaneous determination of wave velocity and thickness on overlapped signals using Forward Backward algorithm. *NDT E Int*. 2017;86:100-105.
8. Martínez K, Ariño C, Díaz-Cruz JM, Serrano N, Esteban M. Multivariate standard addition for the analysis of overlapping voltammetric signals in

- the presence of matrix effects: Application to the simultaneous determination of hydroquinone and catechol. *Chemom Intell Lab Syst.* 2018;178:32-38.
9. Dubrovkin J. Evaluation of undetectable perturbations of peak parameters estimated by the least square curve fitting of analytical signal consisting of overlapping peaks. *Chemom Intell Lab Syst.* 2016;153:9-21.
  10. Milne Chairperson M, Harintharanon T, Atisook K, Other. *PESTICIDE RESIDUES: National Bureau of Agricultural Commodity and Food Standards.* Vol 131; 2008.
  11. Cragg PJ. *A Practical Guide to Supramolecular Chemistry*; 2005.
  12. Grabuleda X, Jaime C. Maquinas moleculares. *An Quim RSEQ.* Published online 2001.
  13. Navarro-Orcajada S, Conesa I, Matencio A, Rodríguez-Bonilla P, García-Carmona F, López-Nicolás JM. The use of cyclodextrins as solubility enhancers in the ORAC method may cause interference in the measurement of antioxidant activity. *Talanta.* 2022;243.
  14. Lagona J, Mukhopadhyay P, Chakrabarti S, Isaacs L. The Cucurbit[n]uril Family. *Angew Chemie Int Ed.* 2005;44(31):4844-4870.
  15. Mansikkamäki H, Nissinen M, Rissanen K. Noncovalent  $\pi\cdots\pi$ -stacked exo-functional nanotubes: Subtle control of resorcinarene self-assembly. *Angew Chemie - Int Ed.* 2004;43(10):1243-1246.
  16. Carranza ME, Elero HM, Veglia A V. Aqueous on/off fluorescent switches based on systems of quinoline / quinoline-macrocycle. *J Photochem Photobiol A Chem.* 2020;390:112253.
  17. Bazzicalupi C, Bianchi A, García-España E, Delgado-Pinar E. Metals in supramolecular chemistry. *Inorganica Chim Acta.* 2014;417:3-26.
  18. Li N, Harrison RG, Lamb JD. Application of resorcinarene derivatives in chemical separations. *J Incl Phenom Macrocycl Chem.* 2014;78(1-4):39-



60.

19. Steed JW, Atwood JL. *Supramolecular Chemistry*. 2nd edition; 2009.
20. Murray RW. Analytical chemistry is still the science of chemical measurements. *Anal Chem*. 2007;79(5):1765.
21. Anslyn E V. Supramolecular analytical chemistry. *J Org Chem*. 2007;72(3):687-699.
22. Lampel A. Biology-Inspired Supramolecular Peptide Systems. *Chem*. 2020;(6):1222-1236.
23. Bettelheim FA, Brown WH, Campbell MK, Farrell SO. *Introduction to General, Organic, and Biochemistry*. Vol 53. 7.a edition; 2019.
24. Cherfi M, Harit T, Malek F. Synthesis of new tetrapyrazolic macrocycle and examination of its complexation properties. *Mater Today Proc*. Published online 2020:4-6.
25. Chang R, College W. *Quimica General*. 7.a edition; 2002.
26. Beene DL, Brandt GS, Zhong W, Zacharias NM, Lester HA, Dougherty DA. Cation- $\pi$  interactions in ligand recognition by serotonergic (5-HT<sub>3A</sub>) and nicotinic acetylcholine receptors: The anomalous binding properties of nicotine. *Biochemistry*. 2002;41(32):10262-10269.
27. Zhou W, Yan H, Hao Q. Analysis of surface structures of hydrogen bonding in protein-ligand interactions using the alpha shape model. *Chem Phys Lett*. 2012;545:125-131.
28. Schneider HJ, Yatsimirsky AK. Selectivity in supramolecular host-guest complexes. *Chem Soc Rev*. 2008;37(2):263-277.
29. Mallick S, Cao L, Chen X, et al. Mediation of Electron Transfer by Quadrupolar Interactions: The Constitutional, Electronic, and Energetic Complementarities in Supramolecular Chemistry. *iScience*. 2019;22:269-287.

30. Li P, Chen Y, Liu Y. Calixarene/pillararene-based supramolecular selective binding and molecular assembly. *Chinese Chem Lett.* 2019;30(6):1190-1197.
31. Collazos N, García G, Malagón A, Caicedo O, Vargas EF. Binding interactions of a series of sulfonated water-soluble resorcinarenes with bovine liver catalase. *Int J Biol Macromol.* 2019;139:75-84.
32. Hu XY, Gao J, Chen FY, Guo DS. A host-guest drug delivery nanosystem for supramolecular chemotherapy. *J Control Release.* 2020;324:124-133.
33. Li S, Gao Y, Ding Y, Xu A, Tan H. Supramolecular nano drug delivery systems mediated via host-guest chemistry of cucurbit[n]uril (n = 6 and 7). *Chinese Chem Lett.* 2020;(2019).
34. Pacioni NL, Veglia A V. Determination of carbaryl and carbofuran in fruits and tap water by  $\beta$ -cyclodextrin enhanced fluorimetric method. *Anal Chim Acta.* 2003;488(2):193-202.
35. Bracamonte AG, Veglia A V. Spectrofluorimetric determination of serotonin and 5-hydroxyindoleacetic acid in urine with different cyclodextrin media. *Talanta.* 2011;83(3):1006-1013.
36. Carvalho I da S, Silva AJS, Nascimento PAM, Moulton BJA, Rezende MV do. S. The effect of different chelating agent on the lattice stabilization, structural and luminescent properties of  $Gd_3Al_5O_{12}:Eu^{+3}$  phosphors. *Opt Mater (Amst).* 2019;98:109449.
37. Escudero D, Estarellas C, Frontera A, Quiñonero D, Deyà PM. Cooperativity effects between non-covalent interactions: Are they important for Z-DNA stability? *Chem Phys Lett.* 2010;485(1-3):221-225.
38. Salas SD, Baumgartner MT, Veglia A V. Alkyl chain length and metallic cation effects on the acid-base properties of C-alkylresorcin[4]arenes in aqueous media. *J Mol Liq.* 2019;277:769-775.
39. Suthari P, Hemant Kumar P, Doddi S, Bangal PR. Investigation of supramolecular stoichiometry and dynamic for inclusion complex of water

- soluble porphyrin with cucurbit[7]uril by fluorescence correlation spectroscopy. *J Photochem Photobiol A Chem.* 2014;284:1-9.
40. Riela S, Lazzara G, Lo P, Guernelli S, Anna FD, Milioto S. Microwave-assisted synthesis of novel cyclodextrin – cucurbituril complexes. 2011;23(12):819-828.
  41. Isihimaru Y, Kojo Y, Masuda T, Saito S, Yue Y, Fujisaki Y. Design on head-to-tail directly linked homogeneous and heterogeneous cyclodextrin dimers and their evaluation of hydrophobic cavity. *Tetrahedron Lett.* 2014;55(15):2438-2441.
  42. Boonyarattanakalin K, Viernstein H, Wolschann P, Lawtrakul L. Influence of ethanol as a Co-Solvent in cyclodextrin inclusion complexation: A Molecular Dynamics Study. *Sci Pharm.* 2015;83(2):387-399.
  43. Meenakshi C, Jayabal P, Ramakrishnan V. Determination of association constant of host-guest supramolecular complex (molecular recognition of carbamazepine, antiseizure drug, with calix(4)arene). *Spectrochim Acta - Part A Mol Biomol Spectrosc.* 2015;151:707-711.
  44. Giri NG, Chauhan SMS. Spectroscopic and spectrometric studies of anion recognition with calix[4]pyrroles in different reaction conditions. *Spectrochim Acta - Part A Mol Biomol Spectrosc.* 2009;74(1):297-304.
  45. Kadam SA, Haav K, Toom L, Haljasorg T, Leito I. NMR method for simultaneous host-guest binding constant measurement. *J Org Chem.* 2014;79(6):2501-2513.
  46. Schalley CA. *Analytical Methods in Supramolecular Chemistry.* 2.a edition; (Schalley CA, ed.); 2012.
  47. Galian RE, Bracamonte AG, Veglia A V. Hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin effect on the fluorescence of auxin and skatole and on the simultaneous determination of binary mixtures of indole compounds in urine by first derivative spectrofluorimetry. *Anal Chim Acta.* 2005;540(2):393-401.
  48. Bracamonte AG, Miñambres GG, Veglia A V. Supramolecular analytical

- chemistry: Spectrofluorimetric determination of 6-hydroxymelatonin with hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin. *Arkivoc*. 2011;2011(7):439-4449.
49. Albelda MT, Frías JC, García-España E, Schneider HJ. Supramolecular complexation for environmental control. *Chem Soc Rev*. 2012;41(10):3859-3877.
  50. Nissink JWM, Boerrigter H, Verboom W, Reinhoudt DN, Van Der Maas JH. Determination of the association constant of strongly bonded host-guest systems by multivariate regression of infrared spectroscopic data. *J Chem Soc Perkin Trans 2*. 1998;(7):1671-1675.
  51. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Definiciones para los fines del CODEX alimentarius. Accessed July 22, 2020. <http://www.fao.org/3/w5975s/w5975s08.htm#>
  52. Porfido OD, Butler E, Titto E De, Issaly P, Benitez R. *Los Plaguicidas En La República Argentina*. 1ra editio. (Issaly EBE de TP, Benítez R, eds.). Ministerio de Salud de la Nación; 2014.
  53. Girones L, Oliva AL, Marcovecchio JE, Arias AH. Spatial distribution and ecological risk assessment of residual organochlorine pesticides (OCPs) in south american marine environments. *Curr Environ Heal reports*. 2020;7(2):147-160.
  54. Khazaal S, El Darra N, Kobeissi A, Jammoul R, Jammoul A. Risk assessment of pesticide residues from foods of plant origin in Lebanon. *Food Chem*. 2022;374:131676.
  55. Sharma A, Kumar V, Shahzad B, et al. Worldwide pesticide usage and its impacts on ecosystem. *SN Appl Sci*. 2019;1(11):1-16.
  56. Pacheco RM, Barbona EI. *Manual de Uso Seguro y Responsable de Agroquímicos En Cultivos Frutihortícolas*; 2017.
  57. Souza Casadinho J. *Informe Sobre Los Plaguicidas Altamente Peligrosos En La Argentina*; 2019.

58. Estimaciones Agrícolas. Accessed March 3, 2022. <http://datosestimaciones.magyp.gob.ar/reportes.php?reporte=Estimaciones>
59. Souza Casadinho J. El proceso de artificialización de la naturaleza y el desarrollo de la agroecología en la Argentina. *Rev Cult Económica*. Published online 2018:43-76.
60. Smith GJ. *Pesticide Use and Toxicology in Relation to Wildlife: Organophosphorus and Carbamate Compounds*. Vol 170; 1987.
61. Ramírez J, Lacasaña M. Plaguicidas: clasificación, uso, toxicología y medición de la exposición. *Arch prev riesgos labor*; 2001;4(2):67-75.
62. Snodgrass WR. Diagnosis and Treatment of Poisoning Due to Pesticides. *Hayes' Handb Pestic Toxicol*. 2010;Volume 2:1295-1311.
63. Moretto A. Pesticide Residues: organophosphates and carbamates. *Encycl Food Saf*. 2014;3:19-22.
64. Khodadoust S, Hadjmohammadi M. Determination of N-methylcarbamate insecticides in water samples using dispersive liquid-liquid microextraction and HPLC with the aid of experimental design and desirability function. *Anal Chim Acta*. 2011;699(1):113-119.
65. Kaushik NK, Kaushik N, Attri P, et al. Biomedical importance of indoles. *Molecules*. 2013;18(6):6620-6662.
66. Nelson M, Muniyasamy H, Kubendran AM, Balasubramaniam A, Sepperumal M, Ayyanar S. Carbazole based fluorescent chemosensor for the meticulous detection of tryptamine in aqueous medium and its efficacy in cell-imaging and molecular logic gate. *J Mol Liq*. 2021;337:116445.
67. Brunius C, Vidanarachchi JK, Tomankova J, Lundström K, Andersson K, Zamaratskaia G. Skatole metabolites in urine as a biological marker of pigs with enhanced hepatic metabolism. *Animal*. 2016;10(10):1734-1740.
68. Ma Q, Li Y, Meng N, Wang J. Occurrence, impacts, and microbial

transformation of 3-methylindole (skatole): A critical review. *Nano Energy*.  
Published online 2020:105526.

69. Wolrab D, Frühauf P, Gerner C. Quantification of the neurotransmitters melatonin and N-acetyl-serotonin in human serum by supercritical fluid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *Anal Chim Acta*. 2016;937:168-174.
70. Anisimov VN, Popovich IG, Zabezhinski MA, Anisimov S V., Vesnushkin GM, Vinogradova IA. Melatonin as antioxidant, geroprotector and anticarcinogen. *Biochim Biophys Acta - Bioenerg*. 2006;1757(5-6):573-589.
71. Malow B, Adkins KW, McGrew SG, et al. Melatonin for sleep in children with autism: A controlled trial examining dose, tolerability, and outcomes. *J Autism Dev Disord*. 2012;42(8):1729-1737.
72. Freitas RC, Orzari LO, Ferreira LMC, et al. Electrochemical determination of melatonin using disposable self-adhesive inked paper electrode. *J Electroanal Chem*. 2021;897:115550.

# CAPÍTULO II

---

**Determinación de la constante de asociación  
entre aminocarb e hidroxipropil- $\beta$ -  
ciclodextrina**

---





# 1. Introducción

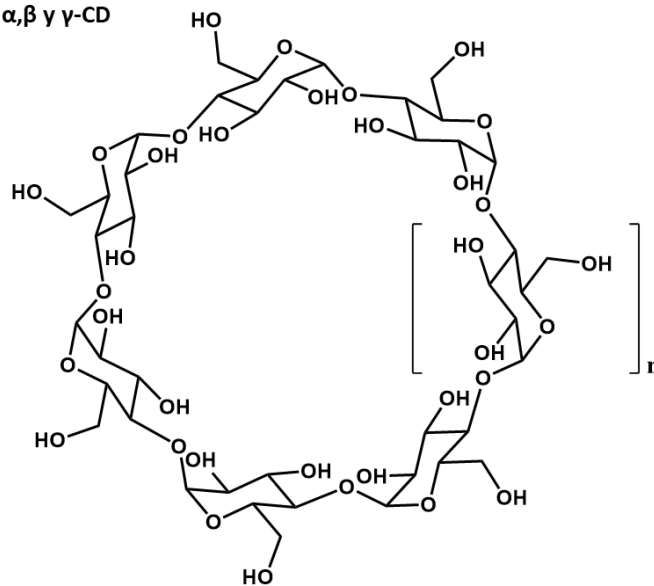
El desarrollo de este estudio se fundamenta en la química supramolecular, donde se aprovecha los cambios espectroscópicos de la interacción de pesticidas N-metilcarbamatos con un macrociclo de tipo cavitando como lo es la hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina (HP $\beta$ CD).

A continuación, se detallarán algunas de las características más relevantes de las ciclodextrinas (CD).

## 1.1. Ciclodextrinas

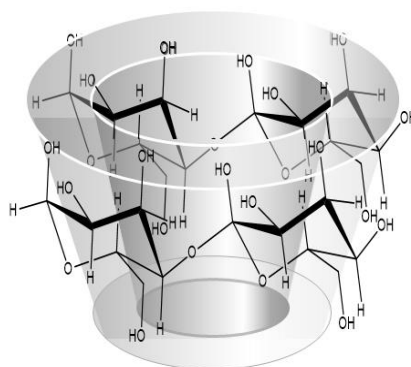
Las ciclodextrinas (CD) también llamadas cicloglucanos o cicloamilosas son productos de la degradación enzimática del almidón por parte del *Bacillus macerans*.<sup>1</sup> Las CD forman una familia de oligosacáridos cíclicos compuestos por  $\alpha$ -D-glucopiranosas unidos por enlaces glicosídicos. Las CD más conocidas, estudiadas y producidas industrialmente son aquellas formadas por 6, 7 y 8 unidades de  $\alpha$ -D-glucopiranosas,<sup>1</sup> las cuales son denominadas con las letras griegas  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  como se muestra en la figura II.1

**Ciclodextrinas**  
Donde  $n = 1, 2, 3$  para  $\alpha, \beta$  y  $\gamma$ -CD



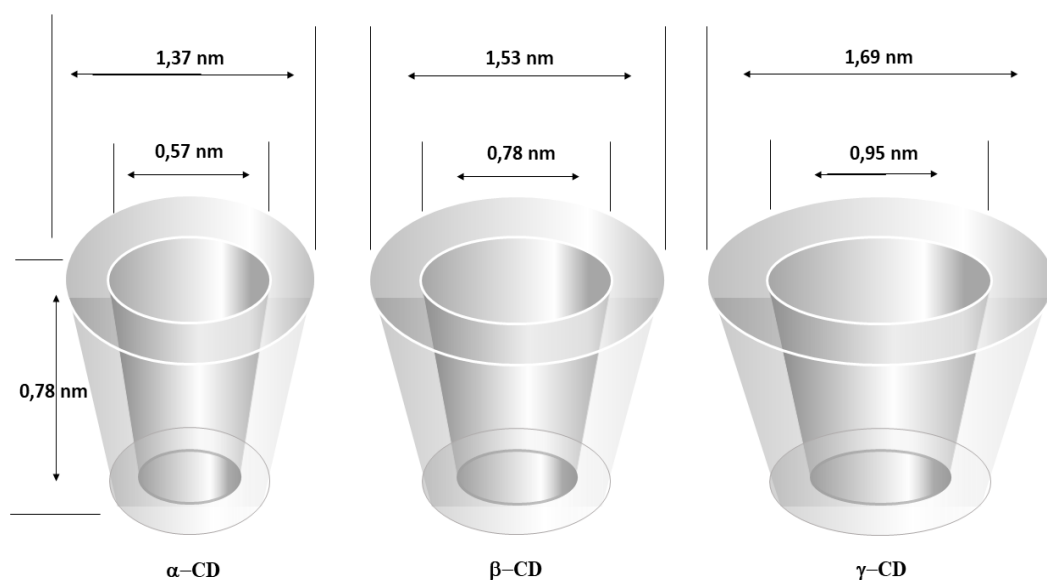
*Figura II.1. Estructura química de las ciclodextrinas nativas.*

La estructura tridimensional de las CD se asemeja a la de un cono truncado, donde la apertura de mayor tamaño está delimitada por los hidroxilos secundarios de la estructura del precursor, mientras que la apertura de menor tamaño está delimitada por los hidroxilos primarios, tal y como se muestra en la figura II.2.



*Figura II.2. Representación esquemática de la estructura en forma de cono de las ciclodextrinas.*

El interior de la estructura de las CD es de carácter hidrofóbico, esta cavidad puede interactuar y encapsular diferentes moléculas. Como se mencionó en el capítulo anterior, la complementariedad del tamaño entre especies involucradas en la formación de un complejo huésped–receptor juega un papel fundamental, y por esto es de vital importancia saber cuáles son los tamaños intrínsecos de cada CD nativa, puesto que estas varían dependiendo del número de unidades de  $\alpha$ -D–glucopiranosas que conforman cada una de las tres CD antes mencionadas. Los valores aproximados de las dimensiones de la  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  CD se muestran en la figura II.3.<sup>1,2,3,4</sup>



**Figura II.3.** Dimensiones aproximadas de la  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  CD.

### 1.1.1. Propiedades fisicoquímicas

Las unidades de  $\alpha$ -D–glucopiranosas que conforman el macrociclo presentan una conformación en forma de silla, y se estabilizan por medio de interacciones puente de hidrogeno que le confiere a las CD nativas ( $\alpha$ -CD,  $\beta$ -CD y  $\gamma$ -CD), una baja solubilidad en agua. Como resultado de estas características, los pares electrónicos libres del enlace glicosídico se encuentran posicionados hacia el interior de la cavidad macrocíclica, esto

genera una alta densidad electrónica que les confiere un comportamiento típico de una base de Lewis.<sup>5</sup>

Es conocido que en soluciones no mayores a pH = 12 las CD no se ven alteradas estructuralmente, y, a pH ácido son susceptibles a hidrolizarse, generando como productos glucosa y una serie de malto sacáridos acíclicos. No obstante, en condiciones normales de trabajo como  $3,5 < \text{pH} < 12$  y  $T < 60,0 \text{ }^\circ\text{C}$  son estables.<sup>6</sup>

Dadas estas características estructurales de las CD, presentan algunas propiedades fisicoquímicas únicas, las mismas se reportan en la tabla II.1.<sup>2,7</sup>

**Tabla II.1.** Propiedades físicas y químicas de las ciclodextrinas

<i>Propiedades</i>	<i><math>\alpha</math>-CD</i>	<i><math>\beta</math>-CD</i>	<i><math>\gamma</math>-CD</i>
<i>N° de glucopiranosas</i>	6	7	8
<i>Masa molar (g/mol)</i>	972	1135	1297
<i>Solubilidad en agua (% p/v), 25 °C</i>	14,5	1,85	23,2
<i>Diámetro cavidad interna (nm)</i>	0,47 - 0,53	0,60 – 0,65	0,75 – 0,83
<i>Diámetro cavidad externa (nm)</i>	1,46	1,54	1,75
<i>Altura de la cavidad (nm)</i>	0,79	0,79	0,79
<i>Volumen de la cavidad (nm<sup>3</sup>)</i>	0,174	0,262	0,472
<i>Contenido de agua en el cristal (%P/P)</i>	10,2	13,2 – 14,5	8,13 – 17,7
<i>Moléculas de agua en la cavidad</i>	6	11	17

Además de las CD nativas, encontramos CD modificadas o derivatizadas, cada unidad de glucopiranososa que conforma una CD nativa posee tres grupos hidroxilos que difieren en su reactividad y que son potencialmente modificables mediante la sustitución del H o el grupo –OH

por una gran variedad de grupos sustituyentes.<sup>5</sup> El objetivo principal de modificar una CD nativa es aumentar su solubilidad en agua, un ejemplo de ello es la HP $\beta$ CD que posee una solubilidad de 55 g/mL a diferencia de la  $\beta$ CD cuya solubilidad es de 1,85 g/mL.<sup>8</sup>

Otra de las razones por las cuales las CD nativas suelen ser modificadas, es para mejorar su afinidad por una especie determinada, dependiendo del sustrato o huésped objetivo se pueden adicionar especies químicas complementarias que permitan una mejor interacción entre el huésped y el receptor.<sup>5,9</sup>

El grado de sustitución (GS) representa la cantidad de -H o grupos -OH sustituidos, y se puede reportar como el número promedio de -OH que se sustituyeron por unidad de  $\alpha$ -D-glucopiranosas, por lo que se representa con un valor que va entre 0 y 3. Otra forma de expresarlo es por unidad de CD, así el valor de GS varía entre 0 y 21.<sup>5</sup>

## **1.1.2. Ciclodextrinas en la ciencia**

A continuación, se habla de las diferentes áreas en las cuales las CD hacen importantes aportes.

### **1.1.2.1. Ciclodextrinas en farmacia**

Una de las áreas de la ciencia que hace un empleo importante de las CD es la farmacología, la cual emplea este macrociclo en diferentes formulaciones, teniéndolo como excipiente en más de 40 productos.<sup>1,10,11</sup> No obstante la CD como excipiente en la industria farmacéutica es considerado como nuevo, por lo cual las investigaciones que estudian el comportamiento de estos macrociclos, generan de igual forma un amplio espectro de líneas de investigación que buscan aprovechar sus propiedades intrínsecas.<sup>12</sup>

### **1.1.2.2. Ciclodextrinas en nanotecnología**

Las CD se han empleado ampliamente en el desarrollo exitoso de nuevos nano–materiales. Se han reportado arquitecturas supramoleculares que contienen diferentes CD, entre estas estructuras encontramos nano–partículas, nano–esponjas, nano–micelas, nano–vesículas, etc.<sup>13,14</sup>

Estos nano–materiales han encontrado importantes aplicaciones en formulaciones farmacéuticas como se comentó anteriormente, o en el ensamble de plataformas funcionales para el transporte y liberación de fármacos.<sup>15,16</sup>

### **1.1.2.3. Aplicaciones en biomedicina**

El desarrollo tecnológico en biomedicina está estrechamente ligado a la capacidad que tienen las CD de formar complejos de inclusión con diferentes compuestos. Un ejemplo bastante relevante es el uso de una  $\gamma$ –CD modificada, la cual es utilizada en anestesiología.<sup>17</sup>

Otro uso actual e interesante se refiere al desarrollo de vacunas para la protección contra la difteria, el tétanos y la tos ferina o convulsa, aprovechando la capacidad que tiene la dimetil– $\beta$ –CD para formar complejos de inclusión.<sup>17</sup>

### **1.1.2.4. Ciclodextrinas en la industria alimentaria**

En los últimos años la industria de los alimentos funcionales ha aumentado exponencialmente, esto ha hecho que las investigaciones en búsqueda de compuestos con alto valor agregado nutricional y que puedan ser usados en la fortificación de productos tradicionales también haya aumentado. Dentro de estos estudios se han desarrollado complejos huésped–receptor entre compuestos antioxidantes y CD nativas o modificadas que mejoran la biodisponibilidad del antioxidante, y además se indicó que las CD actúan como antioxidante secundario, mejorando la

capacidad de antioxidantes tradicionales en la prevención del pardeamiento o envejecimiento enzimático en diferentes alimentos.<sup>18</sup>

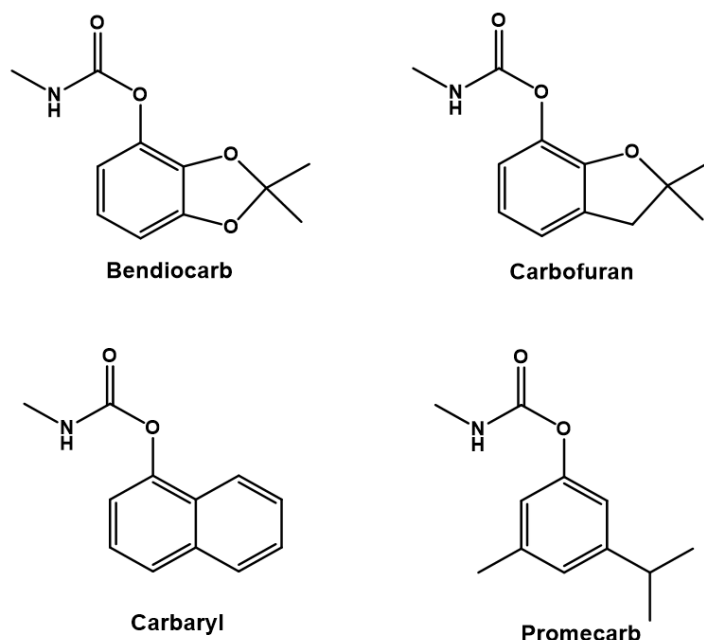
## **1.2. Complejos de inclusión entre ciclodextrinas y pesticidas carbamato**

Como ya se mencionó anteriormente, las CD poseen la capacidad de formar complejos de inclusión con gran variedad de compuestos orgánicos; algunos de estos compuestos son los pesticidas carbamatos, ampliamente usados en la República Argentina para el control de plagas en el campo.

En el área de química orgánica analítica de la FCQ-UNC se han desarrollado importantes estudios de la interacción de estos analitos con diferentes CD. Estos estudios permitieron desarrollar métodos analíticos basados en química supramolecular para la detección y cuantificación individual de estos contaminantes.<sup>19</sup>

En estos estudios se evaluaron las interacciones entre diferentes pesticidas carbamatos y receptores macrocíclicos como la  $\beta$ CD y la HP $\beta$ CD. Los resultados reportados en estos desarrollos permitieron conocer las  $K_A$  de los complejos formados. Estos valores de  $K_A$  se reportan en la tabla II.2.<sup>19</sup>

Adicionalmente en estos estudios se desarrollaron métodos analíticos supramoleculares para la detección y cuantificación individual por medio de fluorescencia molecular de carbofuran (CF), carbaryl (BC), carbaryl (CY) y promecarb (PC) en matrices reales como agua de red y pulpas de frutas de banana y naranja.<sup>19</sup> Los métodos allí propuestos reportaron valores de límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ) del mismo orden o mejores a los reportados en literatura. Las estructuras de estos pesticidas se muestran en la figura II.4.<sup>19, 20</sup>



**Figura II.4.** Estructuras químicas de los pesticidas carbamatos estudiados previamente en el laboratorio.

Estos estudios son la base de partida para plantear uno de los objetivos de este trabajo de tesis, el cual busca aprovechar los cambios espectroscópicos de los pesticidas producto de la interacción con la HP $\beta$ CD, y articularlo con la técnica de cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) para desarrollar un método capaz de detectar y cuantificar simultáneamente cuatro pesticidas carbamatos en agua de red. La importancia de estudiar una matriz como el agua se indicó anteriormente. No obstante, es oportuno recordar que esta es una de las vías de intoxicación con pesticidas más comunes que existe.

**Tabla II.2.** Constantes de asociación y relaciones de rendimientos cuánticos de fluorescencia para N-metilcarbamatos a pH=6,994 y 25 °C.

Pesticida	$\beta$ CD		HP $\beta$ CD	
	$K_A, 10^2 M^{-1}$	$\varnothing^{P:\beta CD} / \varnothing^P$	$K_A, 10^2 M^{-1}$	$\varnothing^{P@HP\beta CD} / \varnothing^P$
<b>BC</b>	$6 \pm 2^a$	$1,81 \pm 0,06^a$	$2,3 \pm 0,3^a$	$3,8 \pm 0,2^a$
<b>PC</b>	$19 \pm 2^a$	$1,74 \pm 0,02^a$	$21 \pm 2^a$	$2,40 \pm 0,02^a$
<b>CY</b>	$3,5 \pm 0,5^b$	$1,24 \pm 0,01^b$	$6,4 \pm 0,5^b$	$1,310 \pm 0,007^b$
<b>CF</b>	$1,9 \pm 0,1^b$	$7,0 \pm 0,1^b$	$1,23 \pm 0,07^b$	$9,3 \pm 0,4^b$

a. Referencia <sup>21</sup> b. Referencia <sup>19</sup>



Como se detalla más adelante en esta tesis, se hizo necesario excluir del sistema de mezcla a PC, y en su reemplazo se eligió un pesticida protonable como el aminocarb (AC). Dado que se desconocía el comportamiento de AC en presencia de la HP $\beta$ CD, el presente capítulo muestra los resultados de la interacción entre ambas especies a diferentes valores de pH, esto con el fin de ampliar el espectro de analitos estudiados en el grupo y poder desarrollar un método más completo.

## **2. Resultados y análisis**

En esta sección se presentan los resultados para la determinación las absorptividades molares ( $\epsilon$ ) de los cuatro analitos que se utilizaron en el desarrollo analítico, estos compuestos son AC, BC, CF y CY. Estos valores se reportan en las proporciones de agua metanol que se utilizaron en la fase móvil del sistema cromatografía y se utilizaron para controlar las concentraciones de las soluciones stock.

Se realizó una caracterización espectroscópica de AC mediante sus espectros de absorción y fluorescencia a diferente pH, y se informan los cálculos para la determinación del pKa de AC en el estado excitado. Por último, se evaluó el efecto de la HP $\beta$ CD en los espectros UV–visible y de fluorescencia de la especie neutra y ácida de AC, y se calcularon las  $K_A$  de los complejos formados.

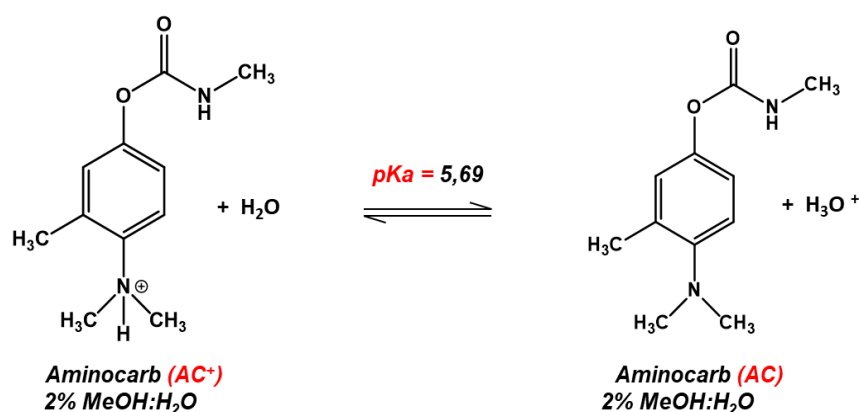
Es importante aclarar que los valores de  $K_A$  de BC, CF y CY con la HP $\beta$ CD fueron determinados anteriormente en nuestro laboratorio, razón por la cual en esta tesis solo se reporta el estudio de la interacción de la especie neutra y ácida de AC con la HP $\beta$ CD.

### **2.1. Espectros de absorción de aminocarb**

#### **2.1.1. Efecto del cambio de acidez en el espectro de absorción de aminocarb**

El AC tiene una estructura química con un grupo amino protonable y presenta un  $pK_a = 5,69 \pm 0,06$  que fue determinado potenciométricamente en nuestro laboratorio en un trabajo anterior.<sup>22</sup> En medio acuoso a pH =

4,500 el AC se encuentra predominantemente la especie ácida ( $AC^+$ ), y a  $pH = 6,994$  se tiene predominantemente la especie neutra AC. En la figura II.5 se muestra el equilibrio ácido–base de AC y sus respectivas estructuras.

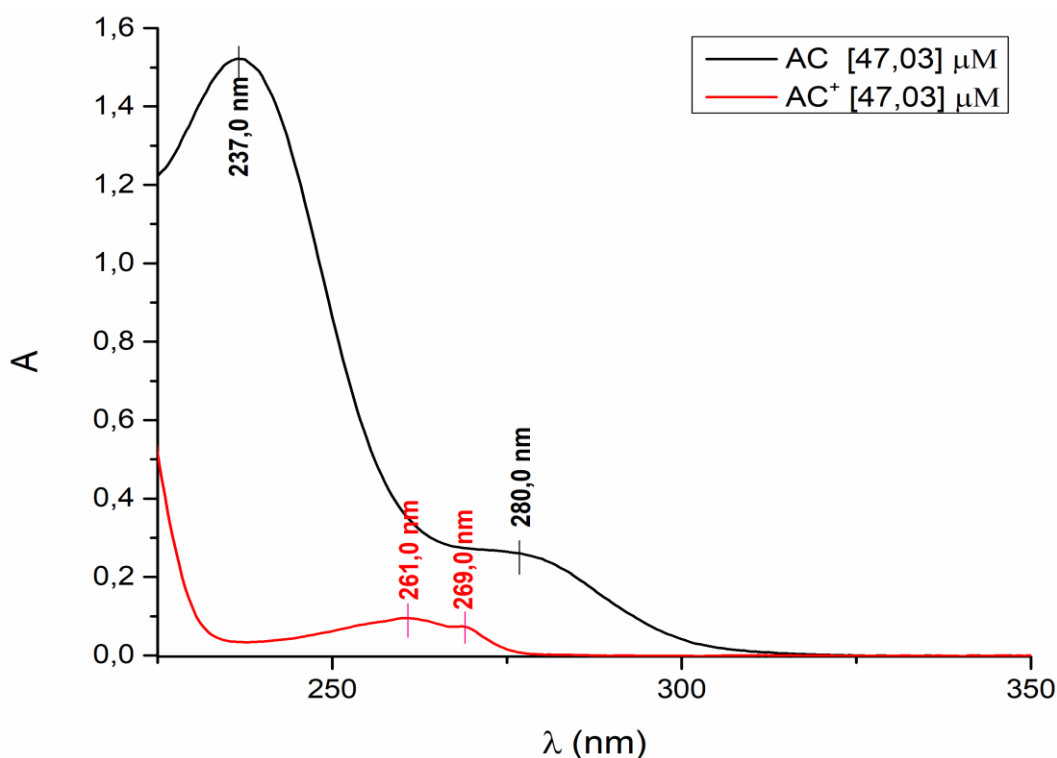


*Figura II.5. Equilibrio ácido base de aminocarb.*

El espectro de absorción de AC se realizó en una solución acuosa al 2% v/v de metanol–agua, el  $pH = 6,994$  fue regulado con buffer fosfatos. En cuanto al espectro de absorbancia de la especie ácida  $AC^+$  se realizó de igual forma en medio acuoso al 2 % v/v metanol–agua y el  $pH = 1,720$  fue regulado con HCl.

Los perfiles espectrales de absorbancia de AC y  $AC^+$  se muestran en la figura II.6; la especie neutra del pesticida en estudio se encuentra presente en soluciones a  $pH = 6,994$ , su espectro UV–visible presenta un máximo de absorbancia a 247,0 nm y un hombro a 280,0 nm. El perfil espectral de la especie ácida presenta un cambio significativo en su espectro de absorción con relación a AC, este cambio es atribuible a la protonación del grupo amino en la estructura del pesticida. Bajo estas condiciones  $AC^+$  presenta un máximo de absorción a 261,0 nm y un hombro a 269,0 nm, de igual forma y basados en las concentraciones de las soluciones se puede inferir que  $AC^+$  posee un  $\epsilon$  menor al de AC.

Los otros N-metilcarbamatos que serán parte del estudio por HPLC, presentan máximos de absorbancia a 280,0 nm para CY, 276,0 nm para CF y 279,0 nm para BC, todos los espectros fueron tomados al 2 % v/v metanol-agua, y fueron determinados en estudios previos en el laboratorio.<sup>19</sup> Los tres pesticidas mencionados anteriormente no tienen en su estructura grupos protonables, razón por la cual el cambio de pH no genera una alteración en su perfil espectral; a menos que se analicen a pH superior a 12 donde se observarían sus productos de hidrólisis.<sup>23</sup>



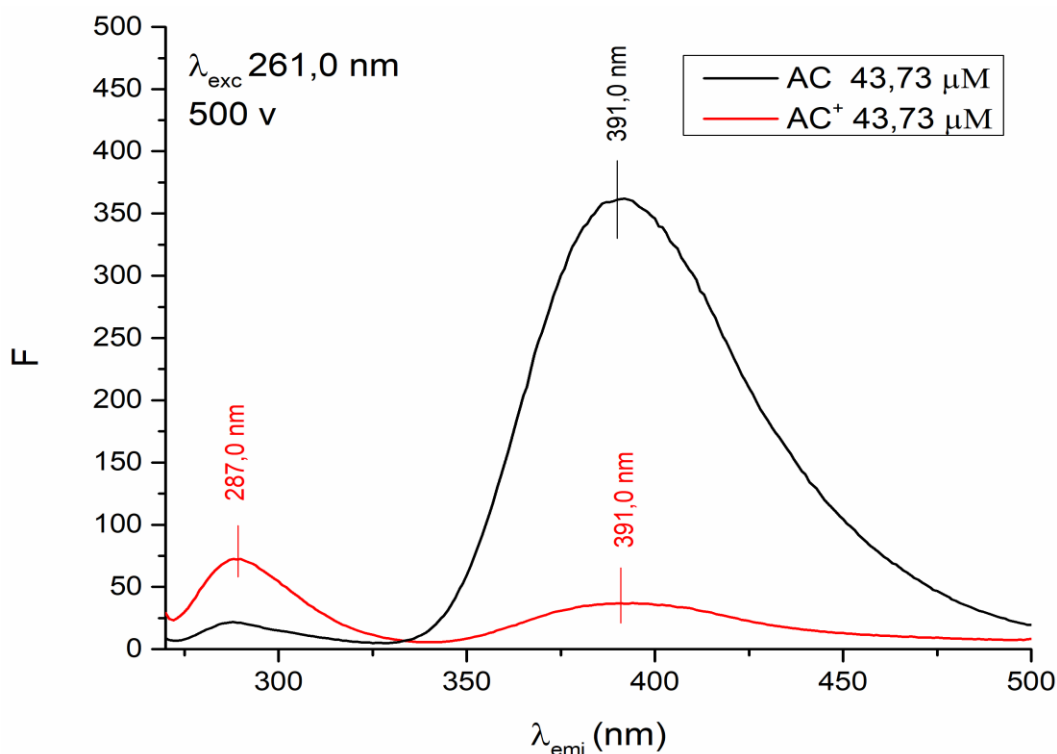
**Figura II.6.** Espectros UV-visible de AC<sup>+</sup> a pH= 1,720 (—) y AC a pH= 6,994 (—). b= 4 cm

## 2.2. Espectros de fluorescencia de aminocarb

La siguiente sección muestra los resultados obtenidos al realizar los espectros de fluorescencia a pH ácido y neutro, esto con la finalidad de estudiar el efecto de la carga sobre las propiedades fluorescentes de este analito.

### 2.2.1. Efecto del cambio de acidez sobre los espectros de fluorescencia de aminocarb

Los espectros de fluorescencia de AC fueron tomados en una solución acuosa al 2 % v/v de metanol-agua, el pH = 6,994 fue regulado con buffer fosfatos. El espectro de AC<sup>+</sup> fue tomado a una  $\lambda_{exc}$  de 261,0 nm, este valor corresponde a la  $\lambda_{max}$  de absorción de esta especie, AC fue excitado igualmente a 261,0 nm, este valor fue elegido ya que su  $\lambda_{max}$  de absorción es 237,0 nm y es recomendable obtener espectros de fluorescencia excitados a  $\lambda_{exc} > 250,0$  nm, con el fin de no aplicar altas energías que puedan promover procesos no deseados al sistema estudiado.<sup>24</sup>

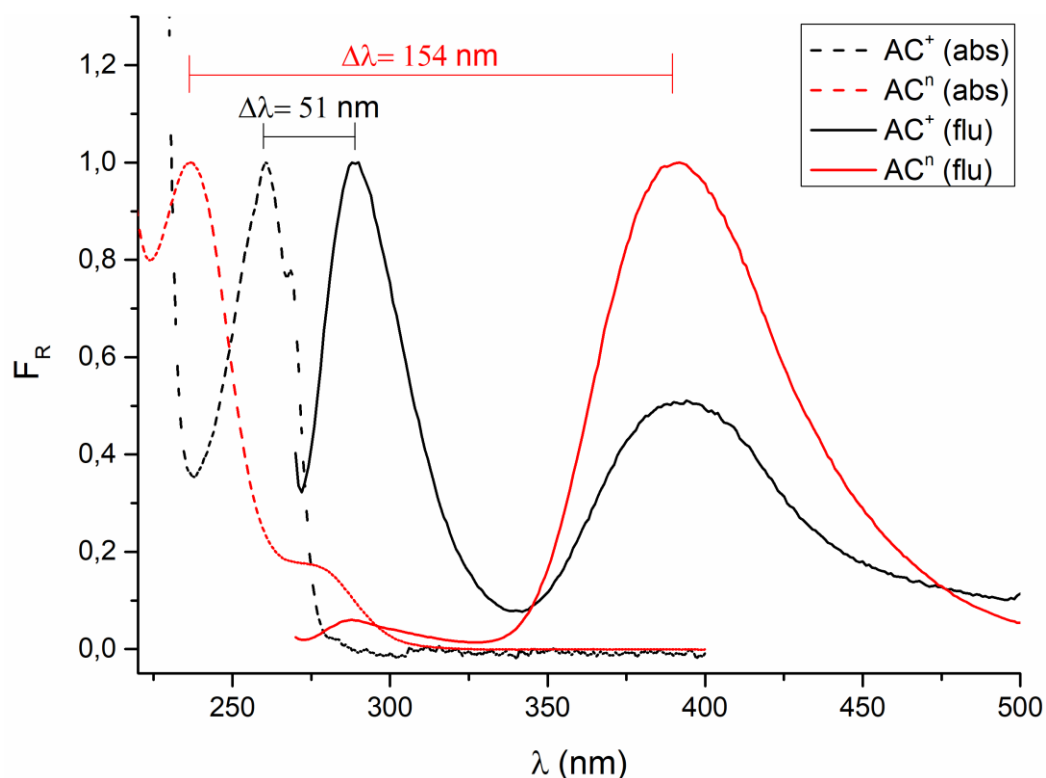


**Figura II.7.** Espectros de fluorescencia de AC<sup>+</sup> a pH = 1.720 (—) y AC a pH = 6.994 (—), 2 % v/v de metanol-agua. T. 25.0 °C.

Los espectros de fluorescencia de AC que se muestran en la figura II.7 evidenciaron que su perfil espectral es altamente dependiente del pH del medio. El espectro fluorescente de AC excitado a 261,0 nm presenta una longitud de onda de emisión máxima ( $\lambda_{max}^{em}$ ) a 391,0 nm. En cuanto al

espectro de  $AC^+$  presenta dos  $\lambda_{max}^{em}$  importantes, la primera a 287,0 nm se asocia directamente con  $AC^+$ , la segunda banda de fluorescencia con  $\lambda_{max}^{em}$  a 391,0 nm es propia de AC, la presencia de esta señal en un medio considerablemente más ácido que el valor de  $pK_a = 5,69$  reportado para el AC, nos indica que este pesticida presenta un cambio de  $pK_a$  en el estado excitado ( $pK_a^*$ ). En la sección 2.3 se muestran los resultados para el cálculo del  $pK_a^*$  de AC en el estado excitado.

La figura II.8 muestra la superposición de los espectros de absorción y emisión de fluorescencia de AC a  $pH = 6,994$  y  $pH = 1,720$ ; la diferencia entre la  $\lambda_{max}$  de absorción y la  $\lambda$  de emisión de menor energía se denomina desplazamiento de Stokes ( $\Delta\bar{\nu}$ ) en  $cm^{-1}$  o ( $\Delta\lambda$ ) en nm.



**Figura II. 8.** Espectros de absorción y emisión de fluorescencia relativos de  $AC^+$  y AC para determinar los desplazamientos de Stokes

Este desplazamiento en ambas especies de AC es significativo, al igual que lo es para los otros tres pesticidas en estudio; sus valores  $\Delta\lambda$  se muestran de forma comparativa en la Tabla II.4. Un desplazamiento

grande ayuda a que las moléculas presenten espectros de fluorescencia con una baja autoabsorción.<sup>19,20</sup>

**Tabla II.4.** Desplazamientos de Stokes para los *N*-metilcarbamatos estudiados en solución acuosa y 25,0 °C

<i>Pesticida</i>	<i>BC</i>	<i>CF</i>	<i>CY</i>	<i>AC</i>	<i>AC<sup>+</sup></i>
$\Delta\lambda$ (nm)	67,0	34,0	56,0	111,0	51,0

### 2.3. Determinación de la constante de acidez en el estado excitado de AC en el estado excitado

En base al pK<sub>a</sub> en el estado basal (5,69), se espera que el espectro de fluorescencia de AC a pH = 1,720 muestre únicamente la señal de la especie protonada AC<sup>+</sup>; no obstante, como se observó en la figura II.6 se pueden identificar dos señales, cuyas  $\lambda_{max}^{em}$  se presentan a 278,0 nm atribuible a la especie ácida y otra a 391,0 nm que corresponde a la señal de la especie deprotonada, esto indica que el pK<sub>a</sub><sup>\*</sup> en el estado excitado difiere del pK<sub>a</sub> en el estado basal.

Este fenómeno fue tratado por Förster, al observar el cambio de las propiedades radiativas de diferentes compuestos orgánicos en el estado excitado.<sup>25</sup>

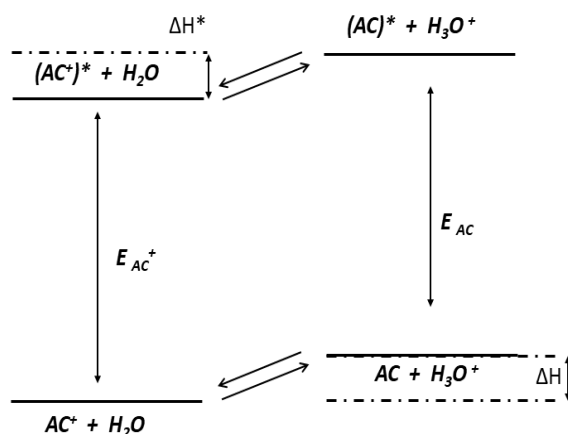
Diferentes estudios donde se evalúan los cambios de pK<sub>a</sub> en el estado basal y excitado han sido publicados, estos han abarcado gran cantidad de compuestos orgánicos tales como fenoles y  $\beta$ -carbolinas como: harmano, harmina, norharmano y 2-metil-harmina. Se han publicado estudios donde se evalúa el efecto de diferentes sustituyentes, o la posición de estos en el pK<sub>a</sub><sup>\*</sup> del naftol. También se ha reportado el pK<sub>a</sub><sup>\*</sup> de diferentes derivados indólicos, y muchos otros compuestos orgánicos con grupos funcionales protonables.<sup>25,26,27,28</sup>

### 2.3.1. Cálculo de la constante de acidez en el estado excitado mediante ciclo de Förster

El equilibrio ácido base de AC está representado en la figura II.5, donde  $K_a$  es la constante de acidez, que puede ser calculada mediante la ecuación de Herdenson-Hasselbach (ecuación.II.2).

$$pK_a = pH - \log \frac{[AC]}{[AC^+]} \quad \text{ec II.2}$$

El ciclo de Förster (CFo) que representa el sistema ácido base aquí propuesto se denomina ciclo protolítico y se muestra en la figura II.9.



**Figura II.9.** Ciclo protolítico de Förster para el sistema  $AC^+ \rightleftharpoons AC + H^+$

El ciclo de Förster permite igualar los  $\Delta H$  con las respectivas energías de excitación de ambas especies como se muestra en la ecuación II.3.

$$E_{AC^+} + \Delta H^* = E_{AC} + \Delta H \quad \text{ec II.3}$$



A partir de la anterior igualdad, se puede obtener una ecuación que permite calcular el valor de  $pK_a^*$ . A continuación, se presenta el desarrollo matemático con las respectivas consideraciones que permiten llegar a la definición de  $pK_a^*$ .

Reordenando la ecuación II.3 tenemos que:

$$E_{AC^+} - E_{AC} = \Delta H - \Delta H^* \quad \text{ec II.4}$$

Ahora haciendo uso de la ecuación de Gibbs, y remplazándola en ecuación II.4.

$$E_{AC^+} - E_{AC} = (\Delta G + T\Delta S) - (\Delta G + T\Delta S)^* \quad \text{ec II.5}$$

Asumiendo que los cambios de entropía son similares en ambos estados, la ecuación II.5 es simplificada a:

$$E_{AC^+} - E_{AC} = (\Delta G) - (\Delta G)^* \quad \text{ec II.6}$$

Si asociamos el valor de  $\Delta G$  con el  $pK_a$  tendremos como resultado la ecuación II.7.

$$\frac{\Delta E_{AC^i}}{2,303RT} = ((-\log K_a) - (-\log K_a^*)) \quad \text{ec II.7}$$

Donde R es la constante universal de los gases  $8,314 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$  y T la temperatura en K;  $\Delta E_{AC^i}$  representa la diferencia de energía entre el estado electrónico basal y el excitado de menor energía entre la especie ácida y neutra. Estas energías se calculan mediante la ecuación II.8 para el caso de las absorbancias y ecuación II.9 para el caso de los espectros de fluorescencia.

$$E_{AC^a} = Nhc (\bar{\nu}_{AC^+}^a - \bar{\nu}_{AC}^a) \quad \text{ec II.8}$$

$$E_{AC^f} = Nhc (\bar{\nu}_{AC^+}^f - \bar{\nu}_{AC}^f) \quad \text{ec II.9}$$

Donde N es el número de Avogadro, h la constante de Plank, c la velocidad de la luz,  $\bar{\nu}_i^a$  es el número de onda en  $\text{m}^{-1}$  de los máximos de absorbancia de la especie ácida y neutra, y  $\bar{\nu}_i^f$  es el número de onda en  $\text{m}^{-1}$  de los máximos de fluorescencia de la especie ácida y neutra.

Con estos valores podremos calcular el valor de  $\text{pK}_a^*$  con base a los números de onda de absorbancia ecuación II.10, de fluorescencia ecuación II.11 y el promedio de ambos, ecuación II.12. Esta última metodología es la recomendada para el cálculo de  $\text{pK}_a^*$  dadas la dificultades para conocer si se está en una transición a un estado singlete o a un estado triplete, y tener la certeza que las bandas en consideración tanto si se trata de absorción o de fluorescencia son debidas a transiciones O-O.<sup>25</sup>

$$\text{pK}_a - \text{pK}_a^* = \frac{Nhc}{2,303RT} (\bar{\nu}_{AC^+}^a - \bar{\nu}_{AC}^a) \quad \text{ec II.10}$$

$$\text{pK}_a - \text{pK}_a^* = \frac{Nhc}{2,303RT} (\bar{\nu}_{AC^+}^f - \bar{\nu}_{AC}^f) \quad \text{ec II.11}$$

$$\text{pK}_a - \text{pK}_a^* = \frac{Nhc}{2,303RT} \frac{(\bar{\nu}_{AC^+}^a - \bar{\nu}_{AC}^a) + (\bar{\nu}_{AC^+}^f - \bar{\nu}_{AC}^f)}{2} \quad \text{ec II.12}$$

Los valores de número de onda para los cálculos de  $\text{pK}_a^*$  se tomaron de los espectros de absorbancia y fluorescencia mostrados en la figura II.5 y figura II.6. En la Tabla II.5 se muestran los valores de  $\lambda$  de absorción asociada a la primera transición electrónica y la  $\lambda$  de fluorescencia junto con sus respectivos números de onda.

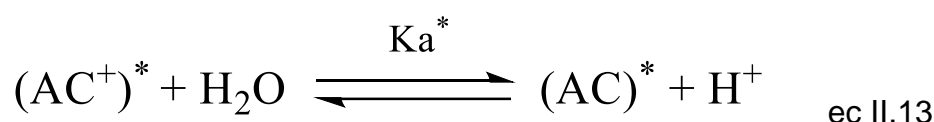
**Tabla II.5.** Longitudes de onda de máxima absorbancia y fluorescencia para las especies ácida y neutra de AC, con sus números de onda para el cálculo del pKa\*.

<i>Especie</i>	<i>Espectro</i>	$\lambda_{max}$ (nm)	$\bar{\nu}$ ( $m^{-1}$ )
AC	Absorbancia	280	3571428,571
	Fluorescencia	391	2557544,757
AC <sup>+</sup>	Absorbancia	269	3717472,119
	Fluorescencia	287	3484320,557

Los valores obtenidos mediante las ec. 11, 12 y 13 se presentan comparados con los métodos experimentales más adelante (Tabla II.6.)

### 2.3.2. Cálculo de constante de acidez en el estado excitado mediante curva de calibrado

En la ecuación II.13 se describe el equilibrio ácido base en el estado excitado del AC, que puede representarse por la ecuación II.14. Si se pueden conocer o calcular las concentraciones de ambas especies en el estado excitado, se puede estimar el valor de  $K_a^*$ .



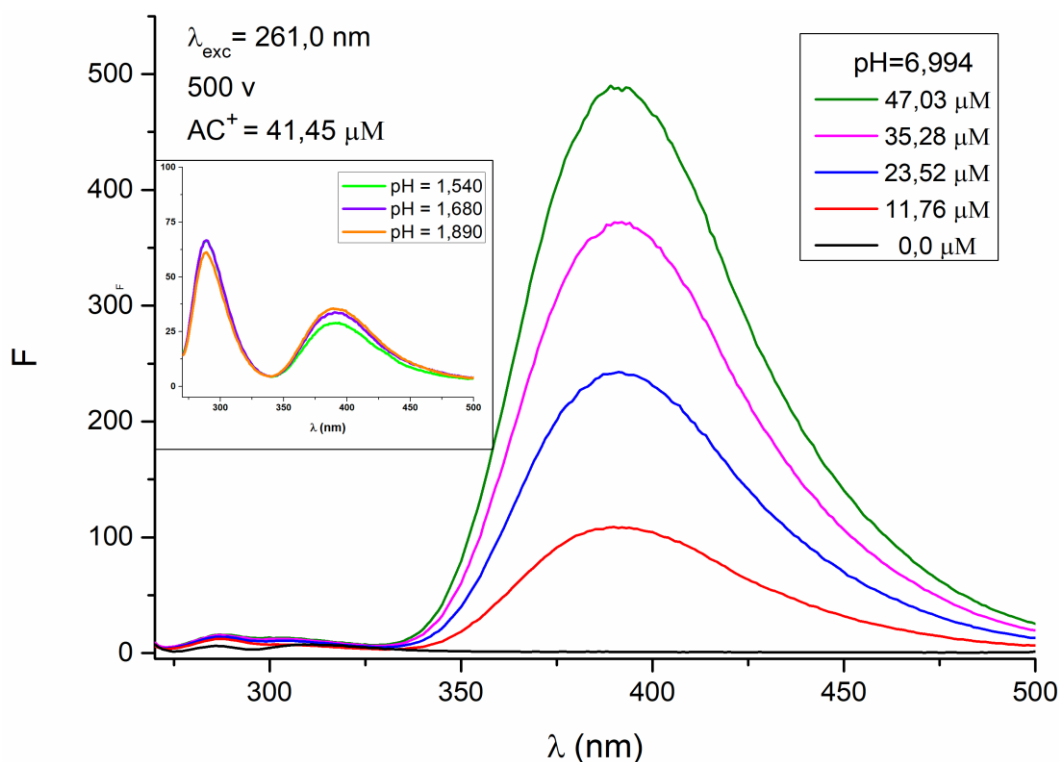
$$K_a^* = \frac{[H^+] + [AC]^*}{[AC^+]^*} \quad \text{ec II.14}$$

Se sabe que los espectros de fluorescencia están asociados con las especies en el estado excitado, con esto y midiendo soluciones de AC a pH ácido conocido (para este caso puntual pH = 1,540, pH = 1,680 y pH =

1,890) y concentración conocida de  $[AC^+]_0$  en el estado basal, podemos estimar las concentraciones en equilibrio de  $[AC^+]$  y  $[AC]$  en el estado excitado, si previamente se ha realizado una curva de calibración de AC a  $pH = 6,994$  donde se observa sólo la especie neutra.

En la figura II.9 se muestran los espectros de fluorescencia de AC a  $pH = 6,994$  a diferentes concentraciones y  $\lambda_{exc} = 261$  nm, este valor fue elegido ya que es el máximo de absorción de la especie ácida. Adicionalmente se encuentra tres espectros de AC a concentración  $41,45 \mu M$  a  $pH = 1,540$ ,  $pH = 1,680$  y  $pH = 1,890$  a  $\lambda_{exc} = 261$  nm.

Como se observa se puede determinar la fracción de  $[AC]^*$  en el estado excitado por medio de la señal a  $391,0$  nm, y por medio de la diferencia con  $[AC^+]_0$  podemos estimar  $[AC^+]$  en equilibrio. Al conocer el  $pH$  podemos remplazar en la ecuación II.12 para obtener el valor de  $K_a^*$  y posteriormente el  $pK_a^*$ . El valor calculado se reporta en la tabla II.6.



**Figura II.10.** Espectros de fluorescencia de AC a  $pH = 6,994$  a diferentes concentraciones. (En el recuadro se muestran los espectros de fluorescencia de una solución  $41,45 \mu M$  de AC a  $pH = 1,540$ ;  $1,680$ ;  $1,890$ ).

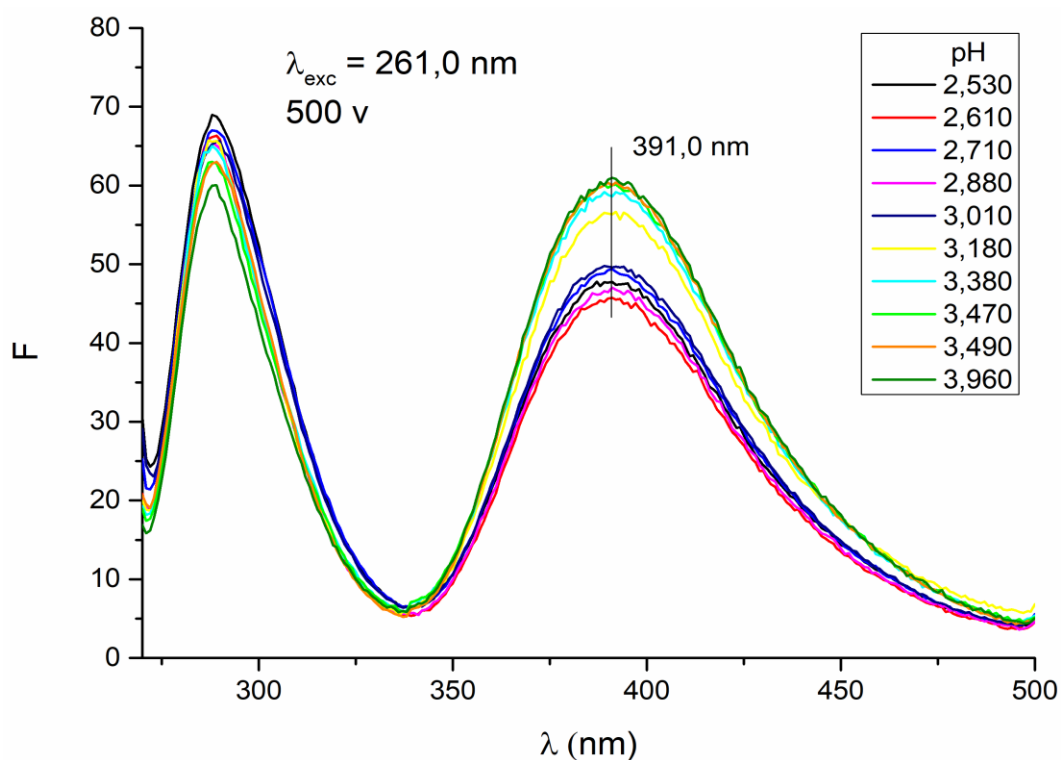
### 2.3.3. Cálculo de la constante de acidez en el estado excitado mediante el método de titulación

Otra forma en que se puede determinar el  $pK_a^*$  del AC es mediante una titulación espectrofluorimétrica donde se varía el pH de la solución que contiene el analito de interés, en nuestro caso AC y se toman sus respectivos espectros de fluorescencia.

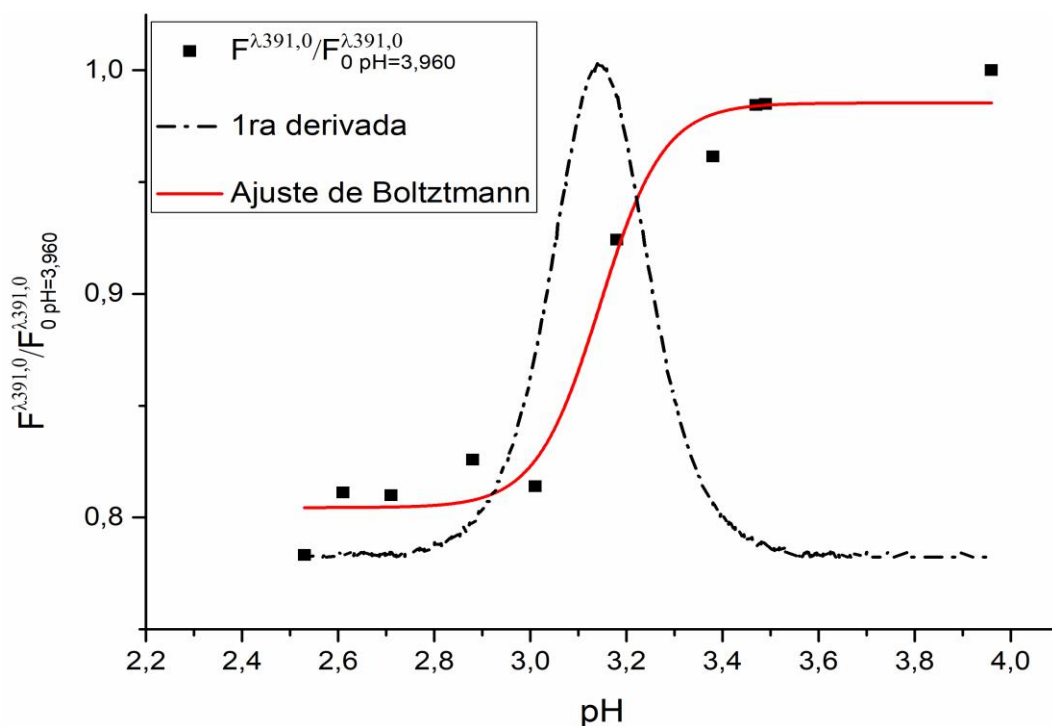
En la figura II.11 se muestran los espectros de fluorescencia de AC a diferentes pH, ya se determinó que la deprotonación de  $AC^+$  a AC genera la aparición de una señal fluorescente a 391,0 nm, si graficamos

$\frac{F^{\lambda_{391,0}}}{F_{0\text{ pH}=3,960}^{\lambda_{391,0}}}$  en función del pH obtendremos una curva sigmoideal

como la que se muestra en la figura II.12, el punto de inflexión de esta curva sigmoideal nos arroja el valor  $pK_a^*$ .<sup>28</sup> El valor calculado por este método se reporta en la tabla II.5.



**Figura II.11.** Espectros de emisión de fluorescencia de  $[AC]_0=43,73 \mu M$  a diferentes pH para determinación de  $pK_a^*$ .



**Figura II.12.** Variación de  $(F_{pH=i}/F_{pH=3,960})$  a  $\lambda = 391,0$  nm en función del pH de la solución. Ajuste de Boltzmann (—). Primera derivada (- · - · -). Método de titulación fluorimétrica (MTF)

Los valores de  $F_{pH=i}$  a 391,0 nm fueron divididos por  $F_{pH=3,960}$  a 391,0 nm para relativizar los valores de F y tener como valor máximo de F uno (1).

### 2.3.4. Comparación de valores de constantes de acidez en el estado excitado por métodos teóricos y experimentales

En la tabla II.5 se muestran los valores de  $pK_a^*$  para el AC mediante los cinco métodos descritos anteriormente.

Los valores de  $pK_a^*$  determinados por el ciclo de Förster presentan una gran diferencia entre sí, esto se debe a que este método está planteado estrictamente para sistemas donde las especies involucradas en el equilibrio presentan procesos de relajación similares tanto en el estado basal como en el estado excitado.<sup>28</sup>

**Tabla II.6.** Valores de  $pK_a^*$  de AC determinados por cinco métodos diferentes

<i>Equilibrio</i>	<i>pK<sub>a</sub><sup>*</sup></i>				
	<i>CF</i>			<i>ME</i>	<i>MTF</i>
	<i>A</i>	<i>F</i>	<i>prom<sub>(A-F)</sub></i>		
$AC^+ \rightleftharpoons AC^n + H^+$	2.63 <sup>a</sup>	-13,74 <sup>b</sup>	-5,56 <sup>c</sup>	2,67 <sup>d</sup>	3.14 <sup>e</sup>

<sup>a</sup> Determinado por Ciclo de Förster y valores de absorbancia.

<sup>b</sup> Determinado por Ciclo de Förster y valores de fluorescencia

<sup>c</sup> Determinado por Ciclo de Förster y valores promedio de absorbancia y fluorescencia

<sup>d</sup> Determinado mediante concentraciones en el equilibrio en medio ácido y curva de calibrado a pH=6,99

<sup>e</sup> Determinado por titulación fluorimétrica

El valor de  $pK_a^*$  determinado mediante la ecuación II.12, es el valor promedio de los valores elegidos para las soluciones a pH = 1,540, pH = 1,680 y pH = 1,890 que se muestran en la figura II.9. Las soluciones fueron medidas a pH extremos, asegurando así que no existiera presencia de AC en el estado basal que interfiriera en las concentraciones de equilibrio. El valor determinado de  $pK_a^* = 2,67$  concuerda con el valor de  $pK_a^*_{(abs)} = 2,63$  determinado mediante CF.

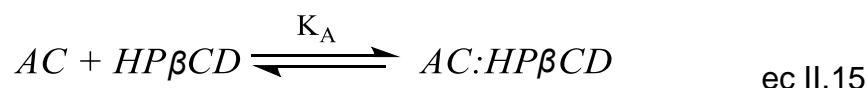
El método de titulación permitió calcular un valor de  $pK_a^*$  comparable con los calculados por ME y CF de absorbancia, lo que permite reportar un valor de  $pK_a^*$  para el AC calculado por tres métodos diferentes y con valores semejantes entre sí. El método de titulación se realizó cuidando que en la solución no hubiese AC en el estado basal, puesto que el ajuste se realizó con la señal de AC existente producto de la deprotonación en el estado excitado, lo que puede generar una alteración de los valores si no se cuida el efecto de la especie existente desde el inicio en la solución. Por esta razón el valor más alto de pH fue 3,960 y fue necesario restar la señal de la mínima fracción de AC que a este pH ya existía en el estado basal de la solución, ya que hay que tener en cuenta que, si bien se trata de una fracción muy pequeña, el rendimiento cuántico de fluorescencia de esta

especie es elevado lo que puede generar un error considerable a la hora de calcular el valor del  $pK_a^*$ .

## 2.4. Determinación de las constantes de asociación entre aminocarb e hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina

En la literatura se han reportado ampliamente cambios en las propiedades espectroscópicas de diferentes analitos en presencia de macromoléculas como los macrociclos, estas alteraciones se han atribuido a la formación de complejos huésped-receptor estabilizados mediante interacciones supramoleculares.<sup>29,30,31,32</sup>

El sistema en estudio se compone de un huésped como el AC y un receptor que es la HP $\beta$ CD. La  $K_A$  por definición es una constante de equilibrio, por lo que podemos plantearla como se muestra en la ecuación II.15.



La forma más común de evaluar y determinar la  $K_A$  entre dos especies, consiste en medir alguna propiedad intrínseca de una de las dos especies a una concentración constante, e ir variando la concentración de la segunda especie involucrada en el equilibrio.<sup>33</sup> En la ecuación II.16 se plantea la ecuación que representa a la  $K_A$  del sistema en estudio.

$$K_A = \frac{[AC:HP\beta CD]}{[AC][HP\beta CD]} \quad \text{Ec II.16}$$

En esta sección se estudiaron los cambios espectroscópicos de AC con el agregado de concentraciones variables de HP $\beta$ CD, realizando medidas de absorbancia y fluorescencia para determinar y comparar los valores de  $K_A$  obtenidos por ambas metodologías.



Como se pudo observar el AC presenta dos especies químicas en función del pH de la solución en que esté disuelto, por esta razón se evaluó la interacción del receptor HP $\beta$ CD con ambas especies del huésped, AC y AC<sup>+</sup> a pH = 6,994 y pH = 1,520 respectivamente.

### 2.4.1. Determinación de la constante de asociación a partir de medidas de absorción

El siguiente desarrollo se plantea considerando que el complejo formado AC:HP $\beta$ CD responde a una estequiometría 1:1, adicionalmente los espectros de absorbancia de la especie libre y el complejo formado presentan cambios significativos entre sí, y que todas las especies en el medio cumplen la ley de Lambert–Beer.

La determinación de la  $K_A$  se realiza seleccionando una  $\lambda$  a la cual el  $\epsilon_{AC}$  y  $\epsilon_{AC:HP\beta CD}$  sean diferentes. La ecuación II.17 representa la absorbancia del analito en ausencia del receptor, donde  $A_0$  es la absorbancia,  $\epsilon_{AC}$  el coeficiente de absorptividad molar de AC y  $[AC]_0$  la concentración analítica de AC en la solución.

$$A_0 = \epsilon_{AC}b[AC]_0 \quad \text{ec II.17}$$

Al adicionar una dada concentración de HP $\beta$ CD a la solución que contiene a AC, se formará un complejo huésped-receptor, y la absorbancia de la solución estará dada por la ecuación II.18 siempre y cuando la HP $\beta$ CD no absorba.

$$A = b(\epsilon_{AC}[AC] + \epsilon_{AC:HP\beta CD}[AC:HP\beta CD]) \quad \text{Ec II.18}$$

Si combinamos la ecuación II.18 con los respectivos balances de masa de AC y HP $\beta$ CD, se obtiene la ecuación II.19.  $[AC]_0 = [AC] + [AC:HP\beta CD]$ ;  $[HP\beta CD]_0 = [HP\beta CD] + [AC:HP\beta CD]$ .

$$A = b(\varepsilon_{AC}[AC]_0 - \varepsilon_{AC}[AC:HP\beta CD] + \varepsilon_{AC:HP\beta CD}[AC:HP\beta CD]) \text{ ec. II.19}$$

Agrupando los términos relacionados a la concentración del complejo y donde  $\Delta\varepsilon$  es la diferencia entre  $\varepsilon_{AC:HP\beta CD}$  y  $\varepsilon_{AC}$  tenemos la ecuación II.20.

$$A = b(\varepsilon_{AC}[AC]_0 + \Delta\varepsilon[AC:HP\beta CD]) \text{ ec. II.20}$$

Remplazando  $[AC:HP\beta CD]$  desde el balance de masas de la HP $\beta$ CD se obtiene la ecuación II.21.

$$A = b(\varepsilon_{AC}[AC]_0 + \Delta\varepsilon K_A [HP\beta CD][AC]) \text{ ec. II.21}$$

Por otro lado, y combinando la ecuación de constante de asociación con el balance de masas de la HP $\beta$ CD obtenemos la ecuación II.22.

$$[HP\beta CD] = \frac{[HP\beta CD]_0}{1 + K_A [AC]} \text{ ec. II.22}$$

Si se reemplaza  $[HP\beta CD]$  en la ecuación II.21 con la ecuación II.22 tenemos la ecuación II.23.

$$A_{AC:HP\beta CD} = A_0 + \frac{[AC]_0 \Delta\varepsilon K_A [HP\beta CD]}{1 + K_A [HP\beta CD]} \text{ ec II.23}$$

Si reordenamos la ecuación II.23 se obtiene la ecuación II.24.

$$A_0 - A_{AC:HP\beta CD} = - \frac{[AC]_0 \Delta\varepsilon K_A [HP\beta CD]}{1 + K_A [HP\beta CD]} \text{ ec II.24}$$

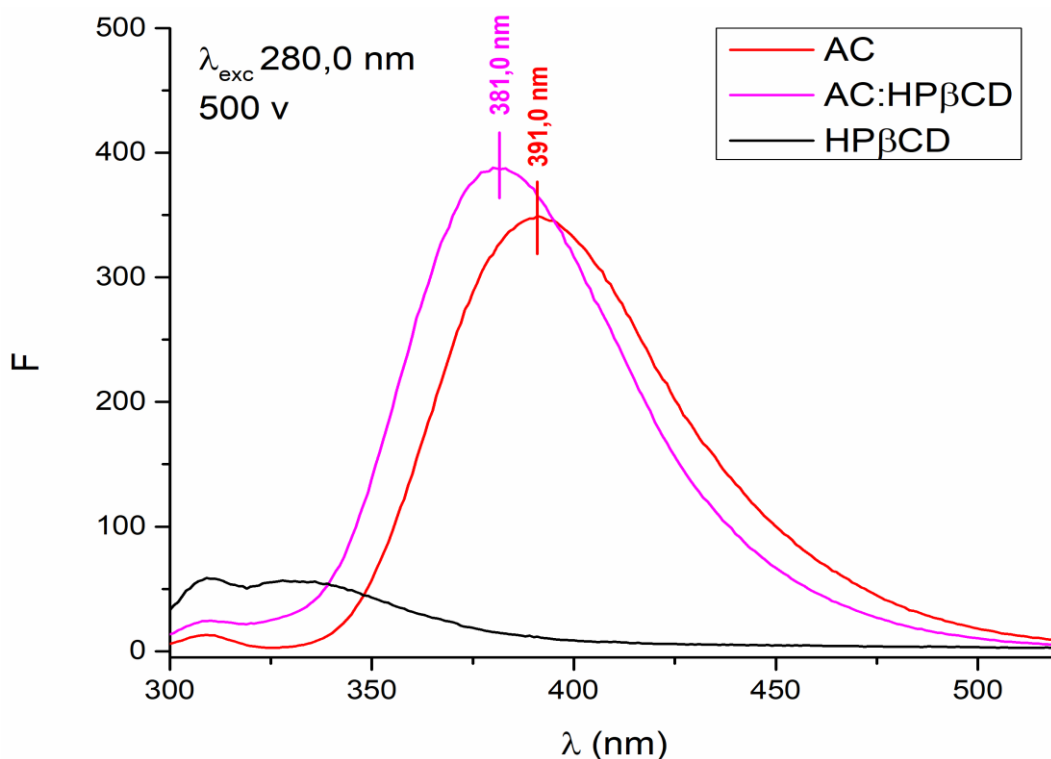
### 2.4.1.1. Influencia de la hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina en los espectros de absorción de aminocarb

Los espectros de absorción de AC tomados a pH = 6,994 son atribuidos únicamente a la señal de la especie deprotonada o neutra AC. Los

espectros de absorción de AC y de la mezcla entre AC y HP $\beta$ CD se muestran en la figura II.13. El espectro correspondiente a AC con HP $\beta$ CD fue corregido teniendo en cuenta la absorbancia que presentaba la HP $\beta$ CD en cada nivel de concentración.

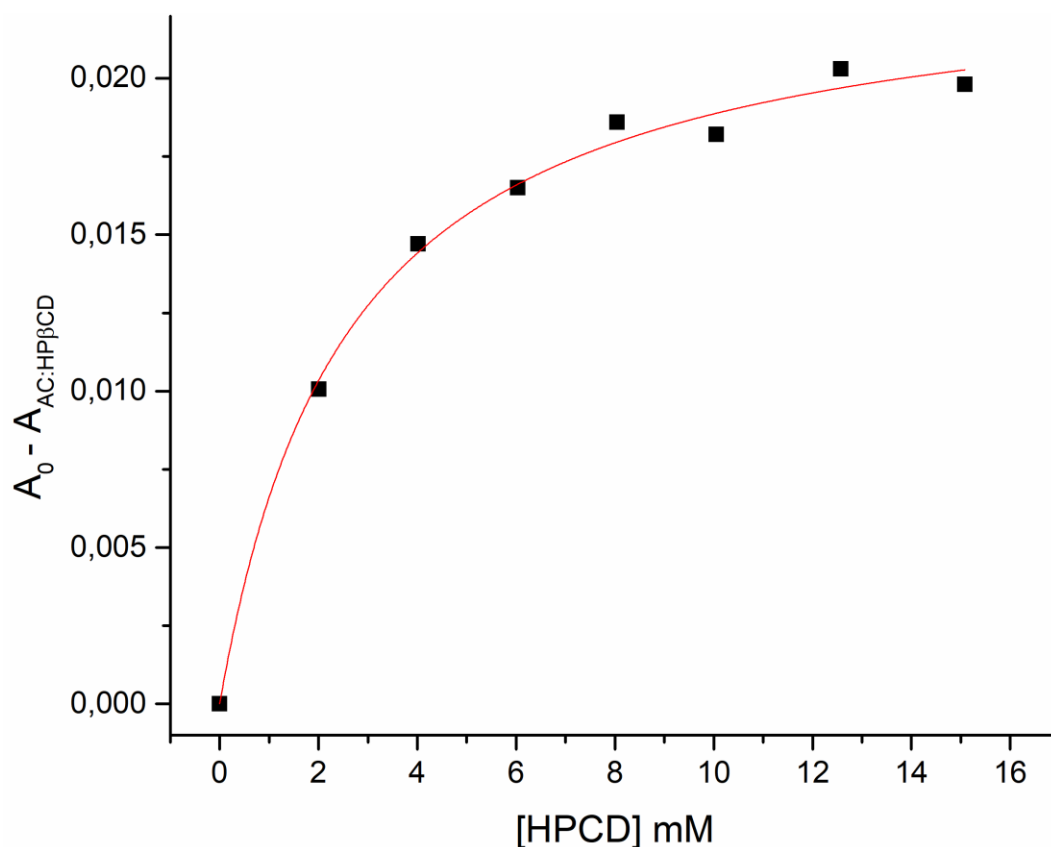
La  $\lambda$  seleccionada para el cálculo de  $K_A$  fue 231,0 nm, en la figura II.14 se observa como varía la absorbancia de AC [23,19]  $\mu$ M a pH = 6,994 en función de la concentración de HP $\beta$ CD adicionada en la solución. Los espectros fueron tomados a temperatura ambiente y paso óptico de 1 cm.

Se observa que el cambio que presenta el espectro de AC al entrar en contacto con la HP $\beta$ CD no es dado por una sumatoria de absorbancias de ambos compuestos, esto se corroboró con el perfil espectral obtenido tras la suma algebraica de los espectros individuales de AC y HP $\beta$ CD (AC + HP $\beta$ CD) en iguales concentraciones a las de la mezcla, puesto que al compararlos con los espectros obtenidos se evidencia que no son iguales.



**Figura II.13.** Influencia de la HP $\beta$ CD en la absorbancia de AC en buffer fosfato pH = 6,994; T = 25,0 °C. Espectro de la solución individual de AC [23,19] $\mu$ M (—); Espectro de la mezcla de AC e HP $\beta$ CD (—); Espectro de la solución individual de HP $\beta$ CD [15,00]mM (—); Espectro suma de las soluciones individuales de AC e HP $\beta$ CD (—).

Analizando el espectro de AC con HP $\beta$ CD se aprecian tres cambios espectrales importantes; primero se evidencia un desplazamiento batocrómico en el máximo de absorción y el hombro que presenta el espectro de AC libre, adicionalmente se observa una disminución en la intensidad de la señal a 237,0 nm, por otro lado, la señal a 280,0 nm presenta un leve aumento de la absorción. Estos cambios en el espectro de absorbancia de AC a causa de la adición de HP $\beta$ CD confirman la interacción de ambas especies, y permite plantear la existencia de un complejo supramolecular entre AC y HP $\beta$ CD. La ecuación II.24 es una buena representación de los datos experimentales con la cual puede obtenerse el valor de  $K_A$ .



**Figura II.14.** Absorbancia a  $\lambda = 231,0$  nm de AC [23,19]  $\mu$ M en función de la concentración de HP $\beta$ CD. Buffer fosfato pH = 6,994 y 25,0  $^{\circ}$ C, paso óptico 1 cm.

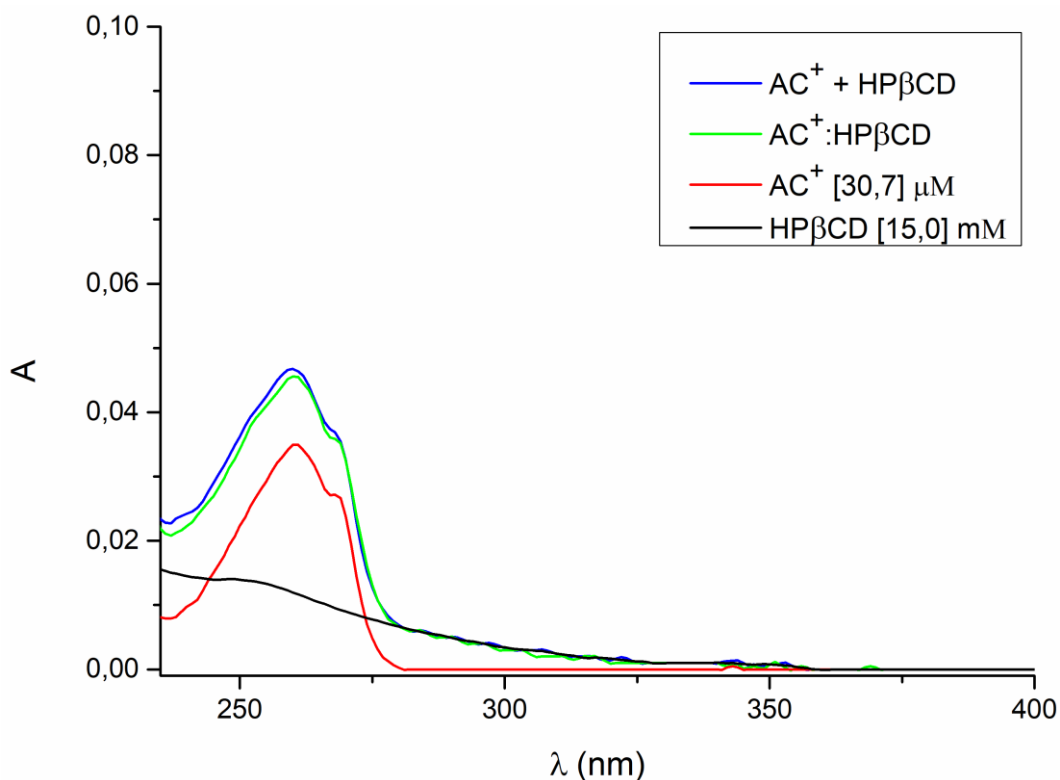
### **2.4.1.2. Influencia de la hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina en los espectros de absorción de aminocarb en medio ácido**

La figura II.15 muestra los espectros de absorbancia de AC<sup>+</sup> a pH = 1,520, en estas condiciones la única especie existente en el estado basal es la especie ácida, y como se indicó en la sección 2.1.1 su perfil absorción difiere notablemente del espectro de la especie neutra.

Los espectros que se muestran en la figura II.15 corresponde a soluciones 15,0 mM de HP $\beta$ CD; 30,7  $\mu$ M de AC<sup>+</sup> y de la mezcla de ambos compuestos a esas concentraciones, por último, se muestra el perfil espectral de la suma algebraica de los espectros obtenidos para las soluciones puras.

Al comparar los espectros de la solución de AC<sup>+</sup> con el espectro de la mezcla del analito con la HP $\beta$ CD se observa inicialmente un aumento considerable de la absorbancia en la solución mezcla, no obstante, al realizar la suma algebraica de los espectros de ambas especies por separado, podemos afirmar que, este aumento de absorbancia esta dado por la suma de absorbancias de ambas especies. Al no obtener una alteración de la señal espectral de AC<sup>+</sup> por parte de la HP $\beta$ CD no se puede determinar al menos por esta técnica la  $K_A$  entre la especie ácida AC<sup>+</sup> y el receptor.

Es importante aclarar que, a pesar de no existir un cambio en la señal de absorbancia del analito, esto no significa que no exista una interacción supramolecular entre las especies.



**Figura II.15.** Espectros de absorción a  $pH = 1,520$  y  $T = 25,0$  °C.  $HP\beta CD$  [15,0] mM (—);  $AC^+$  [30,7]  $\mu M$  (—);  $AC^+:HP\beta CD$  (—);  $AC^+ + HP\beta CD$  (—).

#### 2.4.2. Determinación de la constante de asociación a partir de medidas de fluorescencia

En base a las mismas consideraciones de la formación del sistema huésped-receptor planteadas para la sección 2.4.1, y teniendo en cuenta que, a concentraciones bajas, la intensidad de fluorescencia es directamente proporcional a la concentración del fluoróforo, tal como se plantea en la ecuación II.24, donde  $I_0$  es la intensidad de la fuente de excitación;  $\epsilon$  corresponde al coeficiente de absortividad molar a la  $\lambda$ ;  $c$  es la concentración molar del fluoróforo y  $\phi$  es el rendimiento cuántico de fluorescencia. Esta proporcionalidad lleva a que el tratamiento cuantitativo del equilibrio presentado en la figura II.9 sea similar al planteado en la sección 2.4.1.

$$F_0 = 2,3I_0\phi\epsilon b[AC]_0 \quad \text{ec II.24}$$

Si agrupamos las constantes de proporcionalidad en  $\xi_i$  la ecuación II.24 puede reescribirse como se muestra en la ecuación II.25.

$$F_0 = \xi_{AC}[AC]_0 \quad \text{ec.II.25}$$

La fluorescencia general de una solución que contiene el sustrato y el receptor macrociclo está dada por la suma de las fluorescencias individuales de las especies que la conforman como se muestra en la ecuación II.26. En este caso puntual se considera que la HP $\beta$ CD libre no fluoresce.

$$F = \xi_{AC}[AC] + \xi_{AC:HP\beta CD}[AC:HP\beta CD] \quad \text{ec II.26}$$

Si se considera la ecuación de la constante de asociación Ec II.16, y se reemplaza [AC:HP $\beta$ CD] en la ecuación II.26, y se saca factor común se obtiene la ecuación II.27.

$$F = [AC](\xi_{AC} + \xi_{AC:HP\beta CD}[HP\beta CD]K_A) \quad \text{ec II.27}$$

Si tenemos en cuenta el balance de masa en el equilibrio de la mezcla entre el sustrato y el receptor, y la expresión de constante de asociación se puede definir una relación entre la fluorescencia del sustrato complejoado con la fluorescencia del sustrato libre como se muestra en la ecuación II.28.

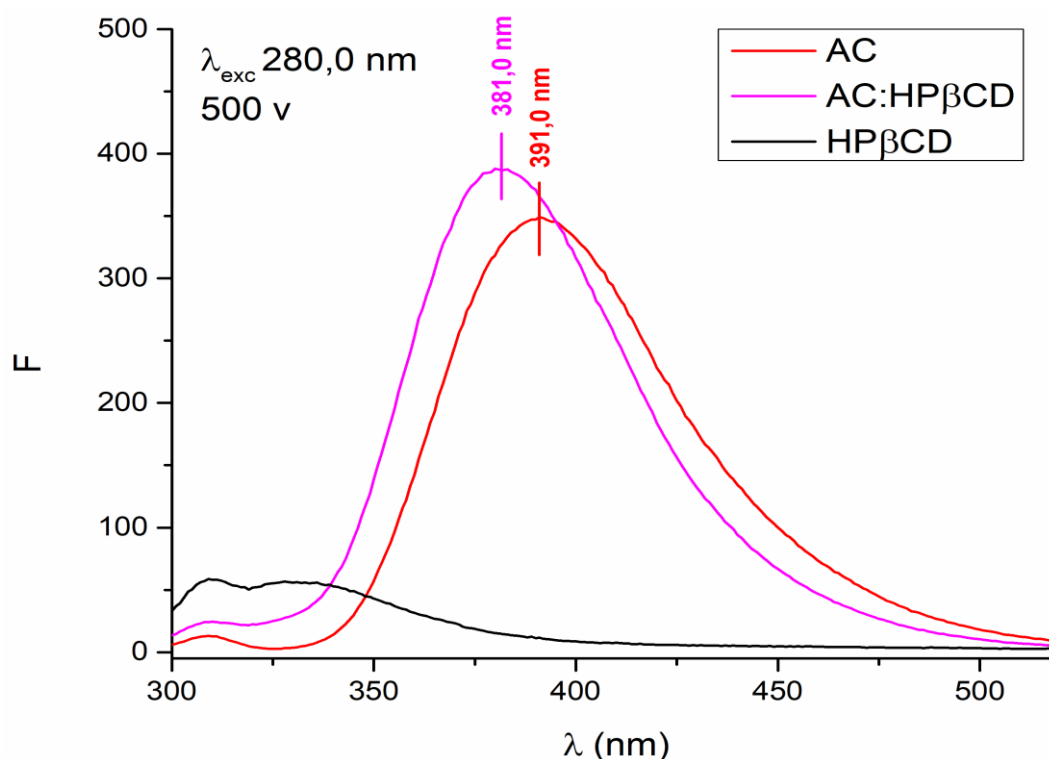
$$\frac{F}{F_0} = \frac{1 + \left(\frac{\xi_{HP\beta CD}}{\xi_{AC}}\right)K_A[HP\beta CD]}{1 + K_A[HP\beta CD]} \quad \text{ec II.28}$$

A partir de la ecuación II.28 donde se relaciona el cambio de la intensidad de fluorescencia del fluoróforo con la variación de la concentración de la HP $\beta$ CD, se puede determinar la  $K_A$  del complejo y el

valor de  $\left(\frac{\xi_{HP\beta CD}}{\xi_{AC}}\right)$ , esta última expresión representa la relación de rendimiento cuántico entre AC y AC:HP $\beta$ CD siempre y cuando  $\epsilon_{AC} = \epsilon_{AC:HP\beta CD}$  a la  $\lambda_{exc}$ .

### 2.4.2.1. Influencia de la hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina en los espectros de fluorescencia de aminocarb en medio neutro

La figura II.16 muestra los espectros de fluorescencia de AC, HP $\beta$ CD y de la mezcla de AC e HP $\beta$ CD. Los espectros fueron tomados a una  $\lambda_{exc} = 280,0$  nm, esta longitud de onda fue seleccionada del espectro de absorción de AC presentado en la figura II.6.



**Figura II.16.** Espectros de fluorescencia a  $\lambda_{exc} = 280,0$  nm. HP $\beta$ CD [15,0] mM (—); AC [23,19] $\mu$ M (—); AC:HP $\beta$ CD (—). 2 % v/v metanol-agua. T. 25,0 °C.

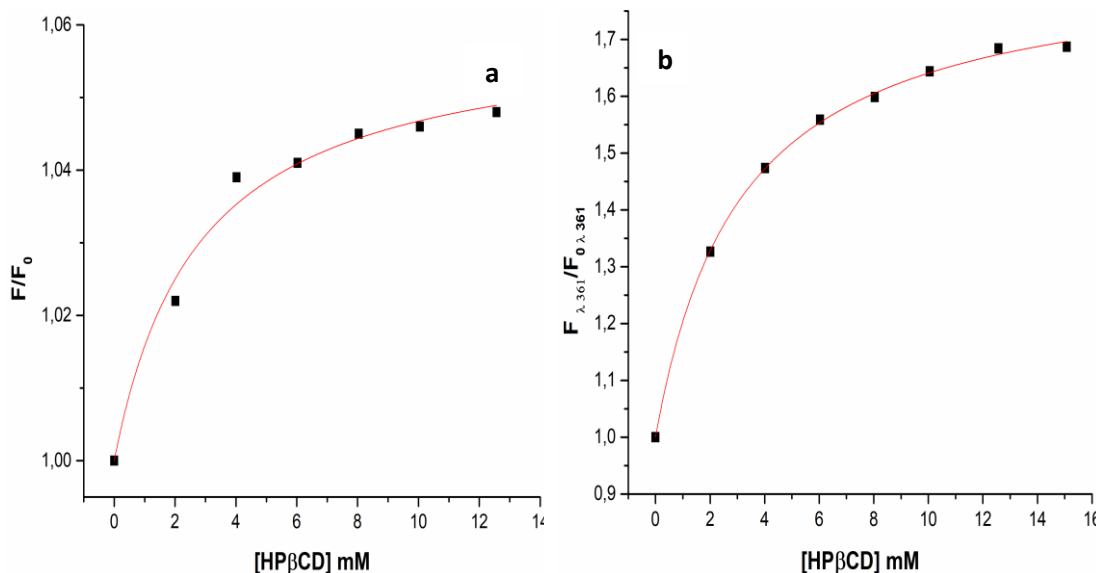
La interacción de AC y la HP $\beta$ CD generó un corrimiento hipsocrómico de la  $\lambda_{em}$  máxima de 10,0 nm, pasando de 391,0 nm a 381,0 nm como se



obseva en la figura II.18. Adicionalmente la fluorescencia de AC al interactuar con la HP $\beta$ CD presenta una exaltación de su fluorescencia ( $F/F_0$ ), siendo  $F$  y  $F_0$  las fluorescencias totales expresadas en área de AC:HP $\beta$ CD y AC respectivamente. Dado que el aumento de  $F/F_0$  es relativamente pequeño, se determinó la  $\lambda$  donde se presentaba el mayor cambio de fluorescencia  $F^\lambda/F_0^\lambda$ , esto con el objetivo de obtener un mejor ajuste al determinar el valor de  $K_A$  del sistema.

En trabajos anteriores donde se ha estudiado la interacción entre pesticidas N–metilcarbamato con HP $\beta$ CD se plantea que la exaltación de la intensidad de la señal fluorescente del fluoróforo es debida a la formación de un complejo supramolecular entre ambas especies.<sup>20,19</sup> En base a los cambios observados y las ecuaciones correspondientes se determinaron la  $K_A$  y rendimiento cuántico utilizando el área total de fluorescencia. Adicionalmente se determinó la  $K_A$  y la fracción de rendimiento cuántico tomando las intensidades de fluorescencia a una  $\lambda_{em} = 361,0$  nm, este valor fue seleccionado producto del análisis de la figura II.15 ya que es donde se presentaba mayor cambio  $F^{\lambda=361,0}/F_0^{\lambda=361,0}$ .

En las figuras II.17.a y II.17.b se observa la variación de la señal de fluorescencia  $F/F_0$  y  $F^{\lambda=361,0}/F_0^{\lambda=361,0}$  de AC en función de la concentración de HP $\beta$ CD. Las curvas descritas por los datos experimentales permitieron calcular por dos vías diferentes la  $K_A$  entre AC e HP $\beta$ CD por medio de medidas de fluorescencia.

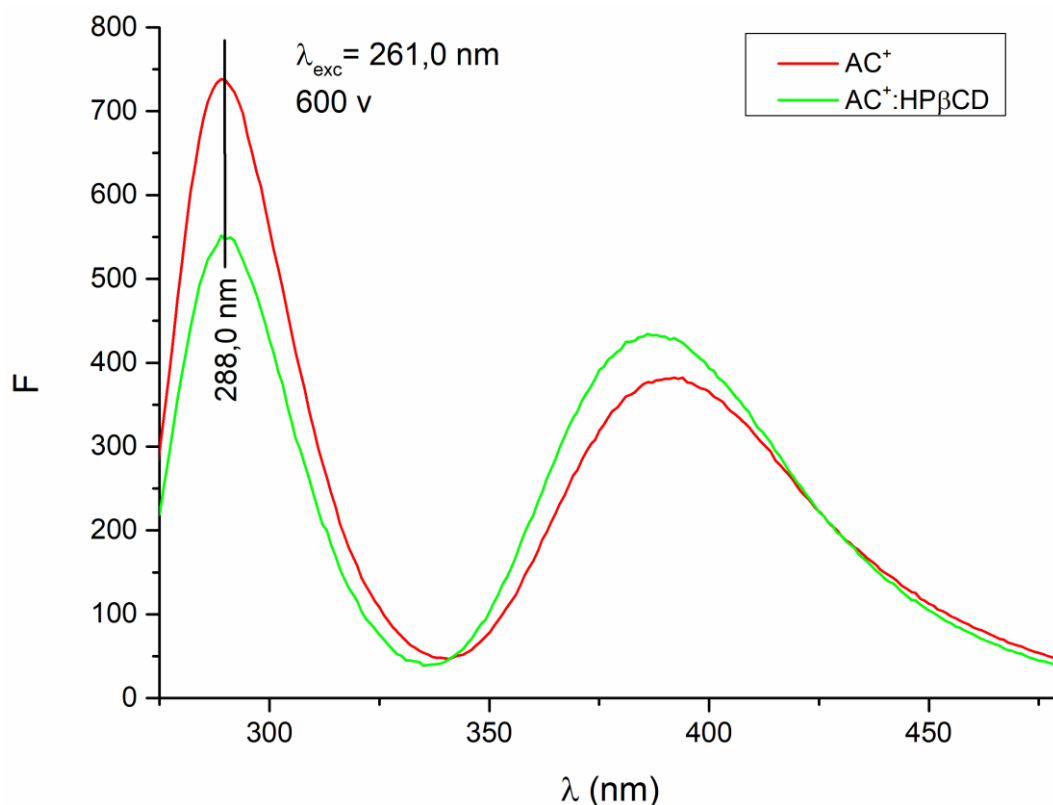


**Figura II.17.** a) Variación del área  $F/F_0$  en función de la concentración de HPβCD. b) Variación de la intensidad de  $F^\lambda/F_0^\lambda$  a  $\lambda_{em} = 361,0$  nm en función de la concentración de HPβCD.

#### 2.4.2.2. Influencia de la hidroxipropil-β-ciclodextrina en los espectros de fluorescencia de aminocarb en medio ácido

La figura II.18 muestra los espectros de fluorescencia de AC<sup>+</sup> a pH = 1,520. En estas condiciones la única especie existente en el estado basal es la especie ácida, no obstante, la señal con  $\lambda_{em}$  máxima a 391,0 nm se atribuye a la especie neutra AC producto del cambio de  $pK_a^*$  en el estado excitado, este estudio se abordó en la sección 2.3 del presente capítulo.

En general, los cambios espectroscópicos del huésped o del receptor al encontrarse formando complejos supramoleculares producto del reconocimiento molecular, complementariedad u otras características ya mencionadas en el Capítulo I, se manifiestan en un aumento de la intensidad de fluorescencia con relación a la especie libre. Este es el comportamiento que se observó con la especie neutra o deprotonada de AC en presencia de HPβCD.



**Figura II.18.** Espectros de fluorescencia a  $\lambda_{exc} = 261,0 \text{ nm}$   $\text{pH} = 1,520$ .  $\text{AC}^+$   $[30,7] \mu\text{M}$  (—);  $\text{AC}^+:\text{HP}\beta\text{CD}$  (—). 2% v/v metanol-agua. T.  $25,0 \text{ }^\circ\text{C}$ .

En otros casos, como es el concerniente a la interacción de la especie ácida con la HP $\beta$ CD se observa como la señal fluorescente de  $\text{AC}^+$  presenta una disminución en la intensidad de fluorescencia, este proceso se denomina desactivación (quenching) de fluorescencia. En este proceso se involucra una nueva especie denominada quéncher (Q), este es el causante de atenuar la fluorescencia del fluoróforo (FI) en el estado excitado mediante procesos competitivos con aquellos procesos naturales de desactivación radiativos y no radiativos.<sup>34</sup>

El proceso de quenching donde se ve involucrado Q, puede clasificarse en estático o dinámico según el mecanismo de acción de Q, aunque existen sistemas complejos donde se presentan los dos procesos simultáneamente. En el primer caso, la pre-formación de un complejo no fluorescente FI:Q en el estado basal gobernado por  $K_A$  genera a una disminución de la fracción libre de FI. En el segundo caso,  $\text{FI}^*$  es desactivado por la colisión bimolecular con Q.<sup>35</sup>

### 2.4.2.2.1. Determinación de la constante de asociación mediante curva de Stern–Völmer

La dependencia del quenching con el aumento de la concentración de Q producto de la asociación de las especies, se representa y deriva de la constante termodinámica  $K_A$  que se muestra en la ecuación II.15 y se convierte en  $K_{sv}$  en la ecuación II.29.

$$K_{sv} = \frac{[AC:HP\beta CD]}{[AC][HP\beta CD]} \quad \text{ec II.29}$$

En la ecuación II.30 se muestra el balance de masa para el pesticida libre, que combinada con la ecuación II.29 derivan en la ecuación II.31.

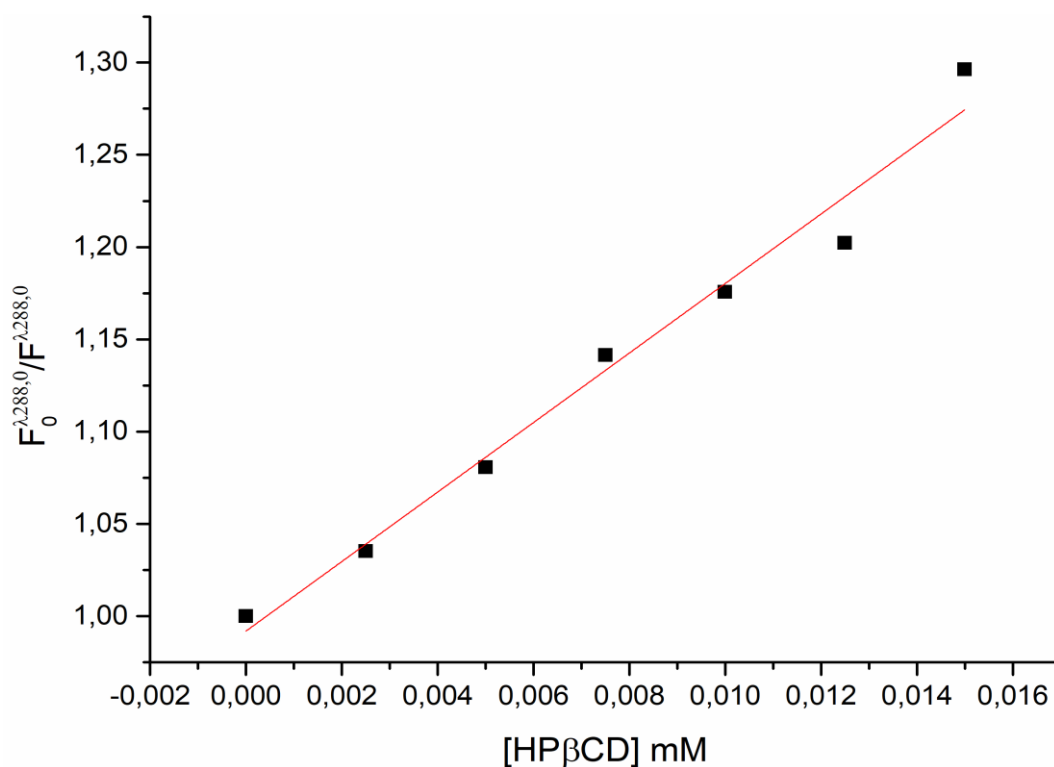
$$[AC^+]_0 = [AC^+]_l + [AC:HP\beta CD] \quad \text{ec II.30}$$

$$[AC^+]_0 = [AC^+](1 + K_{sv}[HP\beta CD]) \quad \text{ec II.31}$$

Si consideramos que  $[AC^+]_0 \propto F_0$  y  $[AC^+] \propto F$  tenemos la ecuación II.32.

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{sv}[HP\beta CD] \quad \text{ec II.32}$$

En condiciones de pseudo–primer orden donde  $[HP\beta CD]_0 \gg [AC^+]_0$ , se cumple que  $[HP\beta CD]_l \approx [HP\beta CD]_0$ .



**Figura II.19.** Gráfico de Stern Völmer para AC<sup>+</sup> a  $\lambda_{emi} = 288,0$  nm en presencia de HPβCD. Solución a pH=1,520;  $[AC^+]_0 = 30,7 \mu M$ ;  $[HP\beta CD] = 0,0$  mM–15,0 mM; 2% v/v MeOH/H<sub>2</sub>O; T. 25 °C.

En la tabla II.7 se recopilan los valores de  $K_A$  para la especie neutra y ácida de AC, estas constantes fueron determinadas por medio de medidas de absorbancia y fluorescencia para el caso de AC y solo por fluorescencia para el caso de AC<sup>+</sup>.

**Tabla II.7.** Constantes de asociación  $K_A$  de las especies ácida y neutra de AC con HPβCD

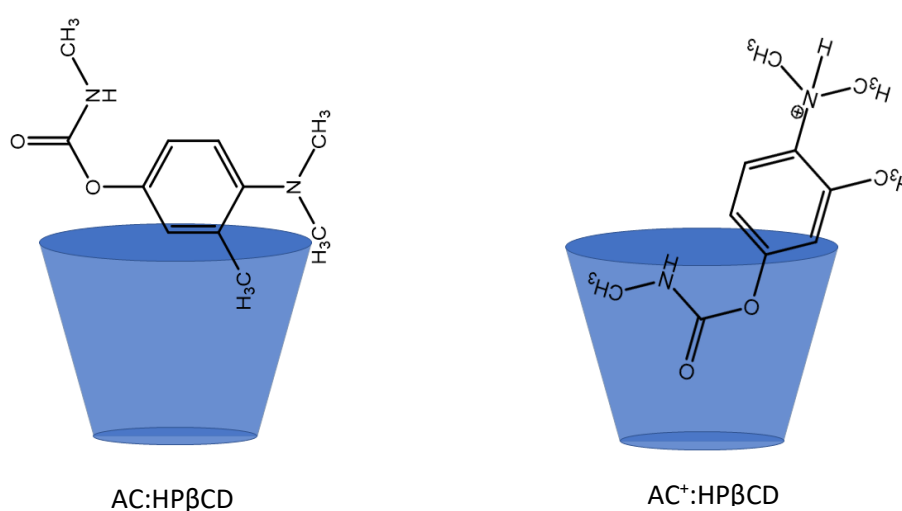
Especie	$K_A (M^{-1})$			
	Absorbancia	Fluorescencia		
	$\lambda_{231,0}$	$F$	$F_{\lambda}^{361,0}$	$F_{\lambda}^{288,0}$
AC	$(39 \pm 4) \times 10$	$(36 \pm 8) \times 10$	$(32 \pm 1) \times 10$	/
AC <sup>+</sup>	/	/	/	$(19 \pm 1) \times 10^3$

Como se ha detallado a lo largo de esta sección se determinaron las  $K_A$  para la especie neutra AC y especie ácida AC<sup>+</sup> con la HPβCD. Los valores

de  $K_A$  determinados para AC por medio de las medidas de absorbancia y fluorescencia no presentan diferencias significativas basados en un análisis de intervalo de confianza con un nivel de significancia del 95 %. Los valores de  $K_A$  para el complejo AC:HP $\beta$ CD son del orden de los reportados para BC, CF y CY con HP $\beta$ CD.<sup>21</sup>

Con respecto a AC<sup>+</sup>, no fue posible determinar el valor de  $K_A$  con la HP $\beta$ CD mediante las medidas de absorbancia; con respecto a las medidas de fluorescencia la  $K_A$  se determinó mediante quenching de fluorescencia, el valor determinado es dos órdenes de magnitud mayor a las determinadas para AC, y se encuentra en el orden para la  $K_A$  reportada en literatura para la interacción entre AC<sup>+</sup> y el C–butilresorcín[4]areno.<sup>36</sup>

Las grandes diferencias en los valores de  $K_A$  de ambas especies con la HP $\beta$ CD pueden deberse a la forma en la cual interacciona el pesticida con la estructura del receptor. Si bien no se obtuvieron evidencias computacionales y/o experimentales para la estructura del complejo, se plantea la posible interacción entre las especies como se muestra en la figura II.20, esto en base a que es bien conocido que la cavidad de este macrociclo posee un carácter hidrofóbico que se repele con especies polares.



**Figura II.20.** Representación posible de la interacción de AC y AC<sup>+</sup> con la HP $\beta$ CD.

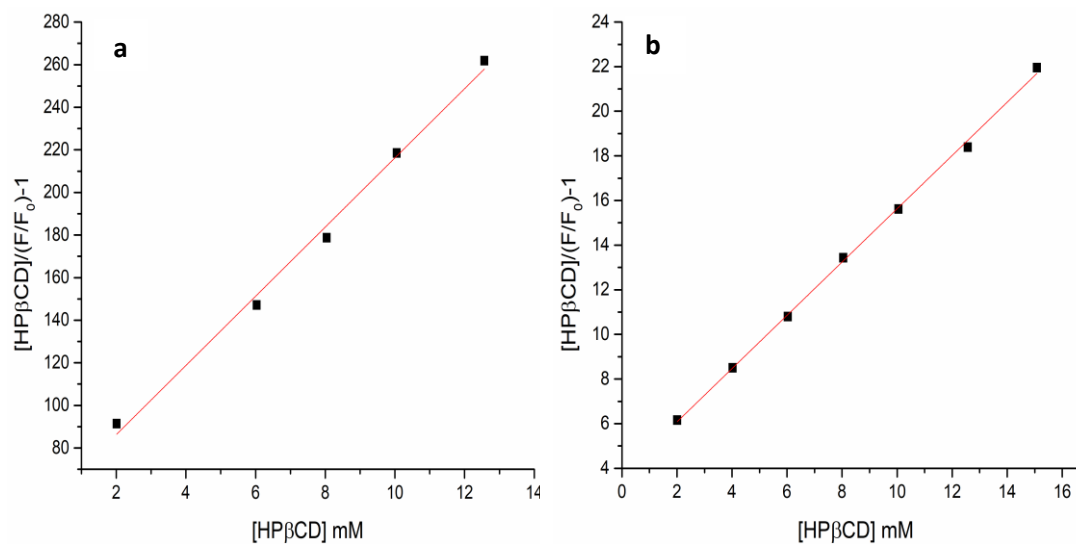
La especie neutra AC interacciona con el borde externo de la HPβCD formando un complejo parcialmente incluido, donde el huésped no ingresa a la cavidad del receptor; por otro lado, la especie ácida AC<sup>+</sup> presenta el grupo amino protonado que se aleja de la cavidad, permitiéndole incluirse parcialmente en la cavidad de la HPβCD lo que genera que la interacción entre ambas especies que forman el complejo sea más fuerte, generando que el valor de K<sub>A</sub> sea del orden de los complejos con restos alquílicos, el cual es mayor a la de los restos aromáticos, como se ha reportado para complejos de β-CD con *para* y *orto* hidroxifenil-álquil cetonas, donde se muestra que las K<sub>A</sub> aumenta a medida que la cadena alquílica en la estructura es más larga.<sup>37</sup>

### 2.4.2.3. Relación estequiométrica de los complejos

Teniendo en cuenta que todas las estimaciones realizadas para el complejo AC:HPβCD fueron con base a una estequiometría de reacción 1:1, se hace necesario corroborar este supuesto, y la mejor manera de hacerlo es mediante un gráfico de doble recíproca derivado del método de Benesi-Hildebrand, donde el reordenamiento de la ecuación II.28 da como resultado la ecuación II.31, si se grafican los términos  $([HP\beta CD]/(F/F_0) - 1)$  en función de  $[HP\beta CD]$  si se obtiene una línea recta se confirma que la estequiometría del complejo es 1:1.<sup>38</sup>

$$\frac{[HP\beta CD]}{\left(\frac{F}{F_0}\right)-1} = \frac{1}{K_A\left(\frac{\emptyset_{AC:HP\beta CD}}{\emptyset_{AC}}-1\right)} + \frac{[HP\beta CD]}{\left(\frac{\emptyset_{AC:HP\beta CD}}{\emptyset_{AC}}\right)} \quad \text{Ec II.31}$$

Para el sistema AC e HPβCD tanto si se emplea el área relativa del espectro o la intensidad relativa a λ<sub>emi</sub> = 361,0 nm se obtuvieron comportamientos lineales con correlaciones > 0,998 como se muestra en las figuras II.21.a y II.21.b, confirmando que la estequiometría del complejo es 1:1, avalando así el planteo desarrollado anteriormente.



**Figura II.21.** Gráfico de doble recíproca. a) Por área total de fluorescencia. b) Intensidad de fluorescencia a  $\lambda_{em} = 361,0 \text{ nm}$ .

Este análisis se realizó de igual forma con los valores obtenidos de absorbancia. El gráfico de la doble recíproca de la ecuación que representa la A del sistema representó una línea recta, confirmando una estequiometria 1:1 para el complejo de AC:HPβCD.



### 3. Conclusiones

El estudio realizado con AC mediante UV–visible permitió determinar como el espectro de absorción del analito es altamente dependiente del pH del medio en el cual se encuentra debido al grupo amino protonable en su estructura.

Los espectros de fluorescencia a pH neutro y ácido permitieron concluir que la disociación ácida de este pesticida difiere entre el estado basal y el estado excitado, lo que genera que el valor de  $pK_a \neq pK_a^*$ . En el estado basal el valor de  $pK_a = 5,69$ , en tanto que para el estado excitado se determinó mediante tres métodos diferentes con un valor promedio de  $pK_a^* = 2,81$ .

El valor de  $pK_{a^*}^{(abs)}$  obtenido mediante el método de FC, no concuerda con los valores de  $pK_{a^*}^{(flu)}$  y  $pK_{a^*}^{(av)}$  obtenido por el mismo método, esto es debido a que el método de FC se aplica estrictamente sólo cuando la relajación del disolvente es la misma tanto en el estado básico como en el excitado de las especies que participan en el equilibrio.<sup>28</sup>

El estudio espectroscópico del efecto de la HP $\beta$ CD sobre las especies ácida y básica del pesticida evidenció la interacción supramolecular de las especies en estudio formando complejos huésped–receptor. La especie AC presentó cambios en su espectro de absorbancia y en el de fluorescencia. La absorptividad del analito disminuyó en presencia de la HP $\beta$ CD, en tanto que la fluorescencia del analito se vio exaltada por la presencia de HP $\beta$ CD. Estos cambios permitieron determinar desde varios enfoques diferentes valores de  $K_A$  que no presentaron diferencias significativas entre sí.

La especie AC<sup>+</sup> por el contrario no presentó cambios apreciables en sus espectros de absorbancia, y a diferencia de AC su señal fluorescente presentó quenching en presencia de la HPβCD. El valor de K<sub>A</sub> para este complejo es  $(19 \pm 1) \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ , lo que corresponde a dos órdenes de magnitud mayor al determinado para AC:HPβCD, esto se ha interpretado debido a una interacción espacial diferente entre la cavidad de la HPβCD y AC<sup>+</sup> con respecto a la cavidad de la HPβCD y AC.

## 4. Parte experimental

En esta sección se detalla toda la instrumentación y procedimientos experimentales utilizados en el desarrollo y obtención de los resultados que se presentaron en este capítulo.

### 4.1. Instrumentación

Las soluciones de trabajo utilizadas fueron solubilizadas con ayuda de un sonicador Arcano modelo PS-10A a excepción de la HP $\beta$ CD.

El control del pH de las soluciones se realizó con un pH-metro Thermo Orion modelo 520A equipado con un electrodo Orion con sistema Ross a 25,0 °C. Previo a la primera medida del día el equipo era calibrado y verificado usando soluciones estándar de pH = 4,008 y 6,994, las cuales se prepararon según lo reportado en la literatura.<sup>39</sup>

Los espectros de absorción UV-visible se obtuvieron mediante el uso de un espectrofotómetro Shimadzu 1800 de doble haz, equipado con un baño termostático con circulación Haake a 25,0 °C, en todos los experimentos se utilizaron celdas de cuarzo con paso óptico de 1 cm.

Los espectros de emisión de fluorescencia se recolectaron en un espectrofluorímetro CARY Eclipse, con anchos de rendija de emisión y de excitación de 10,0 nm, una velocidad de barrido de 500 nm/min y una potencia de 500 v. El control de temperatura se realizó mediante el Single Peltier CARY conectado a la porta celda a 25,0 °C; las celdas usadas para todas las medidas fueron de cuarzo y paso óptico de 1 cm.

Los datos adquiridos tanto para los espectros de absorbancia como los de fluorescencia se procesaron mediante OriginPro 9.0.0 (64 bit) SR2 b87.

## **4.2. Reactivos y Procedimientos**

El aminocarb fue un reactivo grado analítico marca PESTANAL (99,9 % de pureza), que fue utilizado sin purificación previa.

Los solventes empleados fueron: agua deionizada calidad milli-Q purificada mediante sistema millipore con una resistividad  $\sim 18 \Omega\text{M cm}$  a  $25,0 \text{ }^\circ\text{C}$  y metanol Sintorgan grado HPLC. El pH de las soluciones fue regulado con HCl acuoso para el caso de las soluciones ácidas, y buffer fosfato para las soluciones de  $\text{pH} = 6,994$ .

### **4.2.1. Efecto de la acidez sobre los espectros de absorbancia y fluorescencia**

Teniendo como referencia el  $\text{pK}_a$  de AC en el estado basal, se tomaron los espectros de absorbancia y fluorescencia de  $\text{AC}^+$  a  $\text{pH} = 1,720$  y  $\text{pH} = 6,994$ . Se preparó una solución madre de AC en metanol de concentración aproximada de  $2,35 \text{ mM}$ , de esta solución se tomaron alícuotas para preparar  $10 \text{ mL}$  de la solución ácida y neutra a las concentraciones indicadas en sus respectivas figuras.

### **4.2.2. Determinación de la constante de acidez de aminocarb en el estado excitado**

La determinación de  $\text{pK}_a^*$  se realizó por tres diferentes métodos. Para el valor de  $\text{pK}_a^*$  determinado por ciclo de Förster se utilizaron los espectros tomados con las soluciones donde se evaluaba el efecto del pH sobre los espectros de absorción y fluorescencia de AC, estas están detalladas en la sección 4.2.1.

Para el caso donde se utilizó la curva de calibrado en solución acuosa con un  $2 \%$  de metanol y buffer fosfato de  $\text{pH} = 6,994$ , se prepararon cinco niveles de concentración por triplicado a partir de una solución madre de

4,80 mM de AC, las soluciones diluidas se prepararon tomando alícuotas de 0,5 mL; 1 mL; 1,5 mL; 2,0 mL; en un volumen final de 3,0 mL. Las condiciones de análisis fueron detalladas anteriormente. Posteriormente se midieron soluciones de 41,45  $\mu\text{M}$  de AC a  $\text{pH} = 1,540$ ,  $\text{pH} = 1,680$  y  $\text{pH} = 1,890$ , así se determinó la cantidad de AC presente en el estado excitado.

Para el método de titulación las muestras medidas fueron preparadas a partir de dos soluciones madres, una a  $\text{pH} = 1,72$  ajustada con HCl (S1) y la otra a  $\text{pH}=6,40$  propia del  $\text{H}_2\text{O}$  milliQ (S2), ambas soluciones contenían una concentración de pesticida equivalente a 20,12  $\mu\text{M}$ . Las muestras se prepararon tomando una alícuota determinada de S1 y se aforaron a 2 mL con S2, de esta forma se varió el  $\text{pH}$  en el intervalo de 2,53 a 3,96.

#### **4.2.3. Determinación de las constantes de asociación entre aminocarb e hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina**

La constante de asociación se determinó manteniendo la concentración de AC constante y variando la concentración de la HP $\beta$ CD. Para esto se prepararon dos soluciones a  $\text{pH} = 6,994$ , la primera (S1) contenía la cantidad necesaria para tener una concentración de 15,00 mM de HP $\beta$ CD; la segunda (S2) no contenía HP $\beta$ CD y ambas tenían una concentración de 23,19  $\mu\text{M}$  de AC. Cada solución medida se preparó tomando alícuotas de S1 y aforando hasta 2 mL con S2, variando la concentración de HP $\beta$ CD entre 0,00 mM y 15,00 mM. Cada una de estas soluciones fue medida por UV-visible y fluorescencia con  $\lambda_{\text{exc}} = 280$  nm. Este procedimiento minimiza los errores en concentración del analito.

#### **4.2.4. Determinación de las constantes de asociación entre aminocarb protonado e hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina**

Para el estudio de la constante de asociación de AC<sup>+</sup> con HP $\beta$ CD se siguió el mismo procedimiento que para las soluciones del inciso 4.2.4. En este caso ambas soluciones tenían un  $\text{pH} = 1,520$ , S1 contenía 15,00 mM

de HP $\beta$ CD y 30,7  $\mu$ M de AC<sup>+</sup>, en cuanto a S2 solo contenía 30,7  $\mu$ M de AC<sup>+</sup>. Se tomaron alícuotas de S1 y se aforaba con S2 hasta 2 mL para variar la concentración de HP $\beta$ CD. Cada una de estas soluciones fue medida por UV-visible y fluorescencia con  $\lambda_{exc} = 261,0$  nm.

## 5. Bibliografía

1. Crini G. Review: A history of cyclodextrins. *Chem Rev.* 2014;114(21):10940-10975.
2. Steed JW, Atwood JL. *Supramolecular Chemistry*. 2nd edition; 2009.
3. Baykal A, Bozkurt A, Jeremy R, et al. *Multistimuli-Responsive Magnetic Assemblies*. Elsevier Ltd; 2018.
4. Parmar V, Patel G, Abu-Thabit NY. Responsive cyclodextrins as polymeric carriers for drug delivery applications. In: *Stimuli Responsive Polymeric Nanocarriers for Drug Delivery Applications: Volume 1: Types and Triggers*. Elsevier Ltd; 2018:555-580.
5. Szejtli J. Past, present, and future of cyclodextrin research. *Pure Appl Chem.* 2004;76(10):1825-1845.
6. Cedillo-Flores OE, Rodríguez-Laguna N, Hipólito-Nájera AR, Nivón-Ramírez D, Gómez-Balderas R, Moya-Hernández R. Effect of the pH on the thermodynamic stability of inclusion complexes of thymol and carvacrol in  $\beta$ -cyclodextrin in water. *Food Hydrocoll.* 2022;124.
7. Huang Z, Xu R, Ge X, Cheng J. Complexation of capsaicin with hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin and its analytical application. *Spectrochim Acta - Part A Mol Biomol Spectrosc.* 2019;223:117278.
8. Frankewich RP, Thimmaiah KN. Evaluation of the relative effectiveness of different water-soluble  $\beta$ -cyclodextrin media to function as fluorescence enhancement agents. *Anal Chem.* 1991;63(24):2924-2933.
9. Hu X, Ke Y, Zhao Y, Lu S, Yu C, Peng F. Synthesis and characterization

- of a  $\beta$ -cyclodextrin modified polyacrylamide and its rheological properties by hybridizing with silica nanoparticles. *Colloids Surfaces A Physicochem Eng Asp.* 2018;548:10-18.
10. Zhang J, Ma PX. Cyclodextrin-based supramolecular systems for drug delivery: Recent progress and future perspective. *Adv Drug Deliv Rev.* 2013;65(9):1215-1233.
  11. Concheiro A, Alvarez-Lorenzo C. Chemically cross-linked and grafted cyclodextrin hydrogels: From nanostructures to drug-eluting medical devices. *Adv Drug Deliv Rev.* 2013;65(9):1188-1203.
  12. Kurkov S V., Loftsson T. Cyclodextrins. *Int J Pharm.* 2013;453(1):167-180.
  13. Tejashri G, Amrita B, Darshana J. Cyclodextrin based nanosponges for pharmaceutical use: A review. *Acta Pharm.* 2013;63(3):335-358.
  14. Chilajwar S V., Pednekar PP, Jadhav KR, Gupta GJC, Kadam VJ. Cyclodextrin-based nanosponges: A propitious platform for enhancing drug delivery. *Expert Opin Drug Deliv.* 2014;11(1):111-120.
  15. Kanchi S. Nanotechnology for water treatment. *Curr Nanosci.* 2011;(7):640-654.
  16. Bilensoy E, Hincal AA. Recent advances and future directions in amphiphilic cyclodextrin nanoparticles. *Expert Opin Drug Deliv.* 2009;6(11):1161-1173.
  17. Brandariz I, Iglesias E. Local Anesthetics: Acid-base behaviour and inclusion with cyclodextrins. *Curr Org Chem.* 2013;17(24):3050-3063.
  18. López-Nicolás JM, Rodríguez-Bonilla P, García-Carmona F. Cyclodextrins and antioxidants. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2014;54(2):251-276.
  19. Pacioni NL, Veglia A V. Determination of carbaryl and carbofuran in fruits and tap water by  $\beta$ -cyclodextrin enhanced fluorimetric method. *Anal*



*Chim Acta*. 2003;488(2):193-202.

20. Pacioni NL, Veglia A V. Determination of poorly fluorescent carbamate pesticides in water, bendiocarb and promecarb, using cyclodextrin nanocavities and related media. *Anal Chim Acta*. 2007;583(1):63-71.
21. Pacioni NL, Bracamonte AG, Veglia A V. Comparative effect of cyclodextrin nanocavities versus organic solvents on the fluorescence of carbamate and indole compounds. *J Photochem Photobiol A Chem*. 2008;198(2-3):179-185.
22. Salas SD, Baumgartner MT, Veglia A V. Alkyl chain length and metallic cation effects on the acid-base properties of C-alkylresorcin[4]arenes in aqueous media. *J Mol Liq*. 2019;277:769-775.
23. Maroni M. "Indicadores biológicos para la valoración de la exposición humana a compuestos químicos industriales: Plaguicida carbamato" (EUR 11748 EN) N° 29 en: Serie Eines de Salut i treball. In: 29th ed. ; 1998. <http://publicaciones.san.gva.es/publicaciones/documentos/V.130-1996.PDF>
24. Skoog DA, James Holler F, Crouch SR. *Principios de Análisis Instrumental*. 6.a. (Learning C, ed.); 2008.
25. Cetina R, Meza S, Mateos JL. pKa\* el estado electrónico de fenoles sustituidos y la constante de sustituyente. In: *BOLETÍN DEL INSTITUTO DE QUÍMICA*. Vol 247; 1967:41-48.
26. Vert FT, Sanchez IZ, Torrent AO. Acidity constants of  $\beta$ -carbolines in the ground and excited singlet states. *J Photochem*. 1983;23(4):355-368.
27. Alazaly AMM, Amer ASI, Fathi AM, Abdel-Shafi AA. Photoacids as singlet oxygen photosensitizers: Direct determination of the excited state acidity by time-resolved spectroscopy. *J Photochem Photobiol A Chem*. 2018;364:819-825.
28. Saroj MK, Payal R, Jain SK, Rastogi RC. Study of prototropic reactions of indole chalcone derivatives in ground and excited states using

- absorption and fluorescence spectroscopy. *J Mol Liq.* 2020;302:112164.
29. Pacioni NL, Sueldo Ocelllo VN, Lazzarotto M, Veglia A V. Spectrofluorimetric determination of benzoimidazolic pesticides: Effect of p-sulfonatocalix[6]arene and cyclodextrins. *Anal Chim Acta.* 2008;624(1):133-140.
  30. Bracamonte AG, Veglia A V. Spectrofluorimetric determination of serotonin and 5-hydroxyindoleacetic acid in urine with different cyclodextrin media. *Talanta.* 2011;83(3):1006-1013.
  31. Sueldo Ocelllo VN, De Rossi RH, Veglia A V. Complexation (cucurbit[6]uril-pyrene): Thermodynamic and spectroscopic properties. *J Lumin.* 2015;158:435-440.
  32. Sueldo Ocelllo VN, Veglia A V. Cucurbit[6]uril nanocavity as an enhanced spectrofluorimetric method for the determination of pyrene. *Anal Chim Acta.* 2011;689(1):97-102.
  33. Hoenigman SM, Evans CE. Improved accuracy and precision in the determination of association constants. *Anal Chem.* 1996;68(18):3274-3276.
  34. Skoog DA, West DM, James Holler F, Crouch SR. *Fundamentos de Química Analítica.* 8th ed. (Pérez Bonilla JT, ed.). Thomson; 2005.
  35. Fraiji LK, Hayes DM, Werner TC. Static and dynamic fluorescence quenching experiments for the physical chemistry laboratory. *J Chem Educ.* 1992;69(5):424-428.
  36. Salas SD. Sensores basados en nanocavidades de resorcinarenos; Tesis de doctorado en ciencias químicas; FCQ/UNC. Published online 2017.
  37. Veglia AV, De Rossi RH. Interaction of hydroxyphenyl alkyl ketones with  $\beta$ -cyclodextrin. *Can J Chem.* 2000;78(2):233-237.
  38. Hildebrand JH, Benesi HA. A Spectrophotometric investigation of the

interaction of iodine with aromatic hydrocarbons. *Nature*. 1949;71:2703-2707.

39. Strauts C, Gilfillan J, Wilson H. *Analytical Chemistry: The Working Tools*. Vol 1. Oxford University press; 1958.



# CAPÍTULO III

**Efecto de la adición poscolumna de hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina en los cromatogramas de N-metilcarbamatos.**



# 1. Introducción

En este trabajo, la técnica principal de análisis para los pesticidas AC, CF, BC y CY es la cromatografía líquida de alto rendimiento con derivatización poscolumna.

La cromatografía es un método instrumental empleado principalmente para la separación de compuestos en una muestra problema, el fundamento básico de la técnica es la distribución o repartición de los analitos en dos fases, una de las cuales es estacionaria y la otra móvil. Una de las principales características de esta técnica analítica es su alta especificidad, dado que la etapa de separación se desarrolla en función de la molécula de interés.<sup>1,2</sup>

## 1.1. La cromatografía líquida de alto rendimiento en química analítica

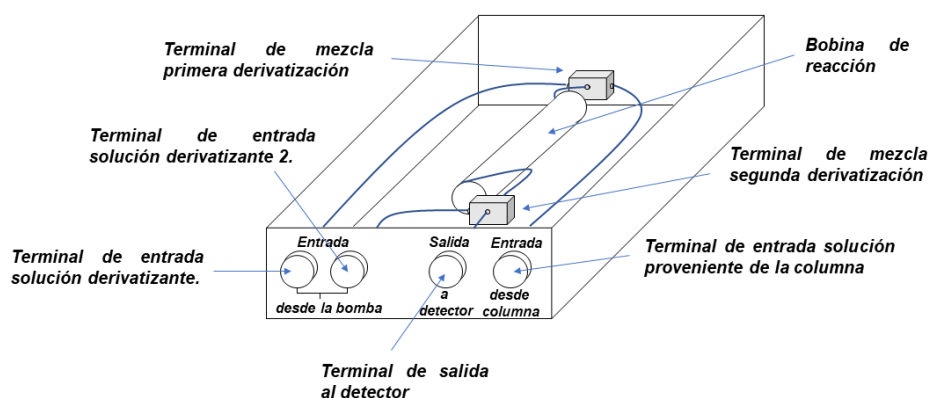
La identificación de compuestos es la parte más importante de muchos trabajos en HPLC. En este proceso se debe seleccionar un sistema de detección que mida una o varias propiedades físico-químicas de la molécula, se pueden usar detectores de absorbancia, conductividad, fluorescencia, relación masa/carga, etc.<sup>2</sup>

A lo largo de los años se han desarrollado gran número de metodologías analíticas a partir de la HPLC, las cuales han permitido separar, identificar y cuantificar diferentes analitos de interés en diferentes matrices reales como artificiales. Como ejemplos encontramos diseños analíticos para la cuantificación de carbazoles en agua,<sup>3</sup> hidrocarburos aromáticos policíclicos como naftaleno, acenaftileno, fluoran Teno, etc.<sup>4</sup>

Se han publicado estudios para la cuantificación de diferentes derivados indólicos en muestras de alimentos.<sup>5,6</sup> La técnica HPLC ha generado grandes aportes si de análisis clínicos se trata, puesto que se han desarrollado metodologías analíticas para identificarlos y cuantificarlos en muestras biológicas como plasma y orina humana.<sup>7,8,9</sup>

La HPLC es una técnica analítica muy versátil y noble, lo que permite el desarrollo de metodologías en asociación con otras áreas de la química, una de estas es la química supramolecular, de gran interés en nuestro estudio. Se conocen trabajos donde se evalúa el efecto de la adición de un macrociclo en la fase móvil del sistema sobre la separación de los analitos.<sup>10,11</sup>

En HPLC el uso de módulos de derivatización poscolumna no es una práctica muy común, pero si es una herramienta muy versátil y de gran valor en el desarrollo de métodos analíticos que lo requieran. El sistema de derivatización poscolumna consiste en un segundo flujo de un solvente X que se mezcla en un reactor con el flujo que sale de la columna, esta mezcla ahora pasa por el detector, en la figura III.1 se muestra una representación del sistema poscolumna. El tiempo que las soluciones residen en el módulo de derivatización es generalmente de 1 minuto.<sup>12</sup>



**Figura III.1.** Representación de un módulo de derivatización poscolumna



Algunos métodos analíticos desarrollados con módulos de derivatización poscolumna tenían como objetivo la determinación de aminas en muestras de vinos,<sup>12</sup> se han realizado determinaciones de residuos de bromo en alimentos mediante un proceso de derivatización con tetrametilbencidina.<sup>13</sup> Muchos otros desarrollos analíticos con derivatización poscolumna se han publicado a lo largo de los últimos años.<sup>14,15,16,17</sup>

En base a estos estudios y el principio de derivatización poscolumna se ha planteado en esta tesis la formación de complejos supramoleculares entre la HP $\beta$ CD y los pesticidas N–metilcarbamatos objeto de este estudio. Los resultados del efecto de la adición poscolumna del macrociclo sobre los cromatogramas obtenidos mediante un detector de fluorescencia se muestran a lo largo de este capítulo.

## **1.2. Instrumentación “Cromatografía líquida de alto rendimiento”**

En lo que concierne a la instrumentación en HPLC se ha desarrollado importantes avances durante los últimos años, especialmente en el desarrollo de nuevas fases estacionarias para construir columnas cada vez más precisa y selectiva, siendo estos los pilares fundamentales en el hecho de llamarla de “alto rendimiento”. El desarrollo de bombas que permiten general caudales muy estables, detectores con celdas intercambiables que permiten elegir el volumen, generalmente entre 1  $\mu$ L y 12  $\mu$ L, válvulas independientes y programables que permiten automatizar procesos, y todo esto conectado a sistemas de control global que permite la libre manipulación y procesamiento de datos, generación de reportes al instante e incluso el desarrollo de métodos totalmente automatizados, etc.<sup>1</sup>

Los equipos de HPLC están compuestos al menos por cinco módulos, estos se conectan entre sí por tuberías cuyo diámetro externo es usualmente de 1/16”, 1/32” en sistemas de alta resolución, o 1/8” en sistemas preparativos. Los cinco módulos esenciales son:

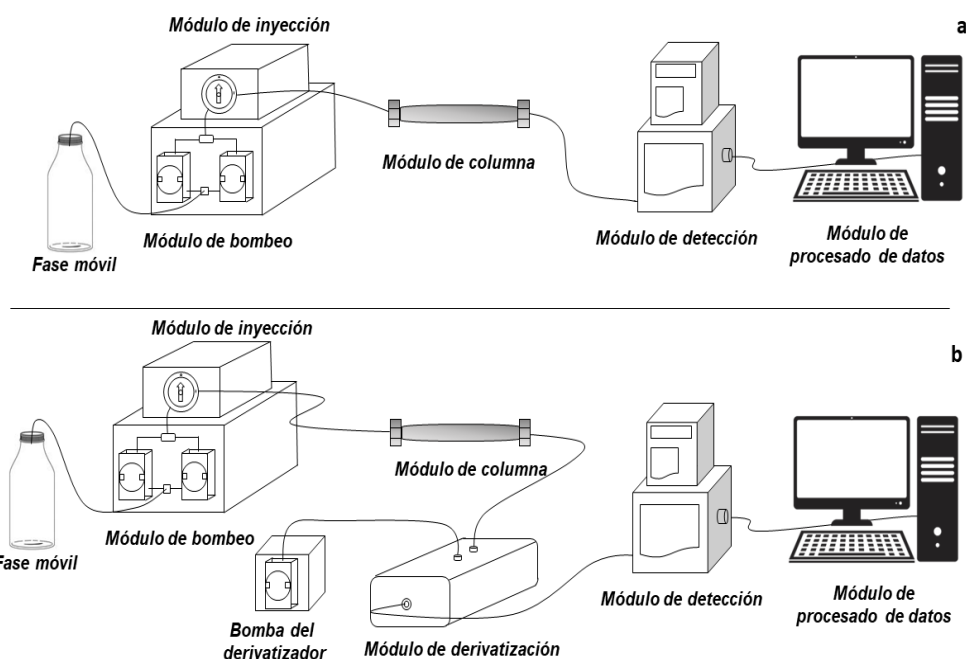
- ✚ El sistema de bombeo, que se compone de una o más bombas, con o sin sistemas de formación de gradiente.
- ✚ El inyector de la muestra, que puede ser manual o automático. El loop de muestra en el inyector puede ser intercambiado por uno de diferente volumen.
- ✚ La columna, la cual puede o no tener una precolumna.
- ✚ El detector, los más comunes son los de UV–visible y fluorescencia, no obstante, se pueden acoplar detectores de masa.
- ✚ El procesador de datos, en el cual se pueden visualizar los cromatogramas y realizar cálculos y reportes en tiempo real. Igualmente se pueden controlar cada uno de los módulos instalados.

La modularidad de los equipos de cromatografía es la que ha permitido en gran medida el desarrollo de gran variedad de aplicaciones en HPLC, la facilidad de intercambiar y adicionar módulos, como inyectores automáticos, hornos de columna, un segundo detector, etc.

Adicionalmente se pueden adicionar módulos no tan comunes pero que son indispensables para algunas aplicaciones, uno de estos son los módulos de derivatización, los más comunes instalados poscolumna; esta fue una herramienta indispensable en el desarrollo del presente trabajo. En la figura III. 2a y 2b se muestra una representación de un cromatógrafo modular con los cinco módulos básicos y un cromatógrafo modular con un módulo de derivatización y su respectivo sistema de bombeo.

El manejo de un cromatógrafo de HPLC es relativamente sencillo, no obstante se requiere de conocer muy bien los sistemas a estudiar con el fin de elegir los módulos adecuados para el desarrollo del método analítico, y las características de los mismos, puesto que como se ya se mencionó existen bombas de número de líneas variable lo que permite usar más reservorios de solvente, pueden o no tener flujos en gradiente; en cuanto a las columnas existen gran cantidad de fases estacionarias dependiendo del interés del analista; se debe conocer si es necesario o no un control de

temperatura en la columna y para esto hacer uso del respectivo módulo del horno; conocer las características espectroscópicas de los analitos para poder elegir el detector correcto, etc.



**Figura III. 2.** a) Cromatógrafo modular con sus cinco módulos básicos b) Cromatógrafo modular con un módulo de derivatización adicional y su sistema de bombeo.

### 1.3. Pesticidas y sus efectos nocivos para la salud humana

Los pesticidas carbamatos utilizados como insecticidas son hidrolizados en el suelo durante su primera etapa de degradación metabólica.<sup>18</sup> Estos pesticidas persisten durante cierto tiempo en los cultivos después de su aplicación, pueden penetrar los tejidos de las plantas, filtrarse de manera equitativa en el suelo, contaminando frutas, verduras, aguas subterráneas y aguas superficiales.<sup>19,20,21</sup>

#### 1.3.1. Mecanismo de toxicidad

Se ha debatido que los pesticidas carbamatos poseen un mecanismo de acción parecido a los organofosforados, ya que ambos tienen la capacidad

de inhibir la acción de la enzima acetilcolinesterasa. No obstante, se pueden numerar dos peculiaridades farmacocinéticas que los distinguen:

- ✚ La primera es que la unión pesticida carbamato–enzima es reversible, esto debido a que el pesticida no genera procesos de fosforilación enzimática, lo que facilita la reactivación espontánea de la enzima una vez que ha transcurrido cierto tiempo.
- ✚ La segunda es que sus efectos a nivel del sistema nervioso central son limitados, debido a que los carbamatos no pueden atravesar fácilmente la barrera hematoencefálica.

### **1.3.2. Exposición a pesticidas inhibidores de la acetilcolinesterasa**

La exposición a pesticidas carbamatos puede darse durante el almacenamiento, distribución, fabricación, mantenimiento del equipo de fumigación, aplicación, mezclado, y durante la eliminación de los envases o al ingresar a áreas fumigadas. Pero sin lugar a duda, el manejo inadecuado de productos que contengan estos compuestos es una de las principales razones por las que ocurren las intoxicaciones en los trabajadores agrícolas. Y como se mencionó anteriormente las personas ajenas a la actividad agrícola suelen exponerse a estos compuestos a través de alimentos o aguas contaminadas.<sup>22,23</sup>

Existen condiciones que aumentan la probabilidad de una intoxicación con este tipo de pesticidas, algunas de ellas son fumigar en espacios cerrados, en contra del viento, aplicar el plaguicida en horas con más calor o en climas cálidos ya que se incrementa la absorción dérmica.<sup>23</sup> Las exposiciones elevadas a pesticidas inhibidores de la acetilcolinesterasa, por ejemplo en derrames, desencadenan síntomas inmediatos, en tanto que las menores provocan síntomas que se hacen evidentes con el tiempo y la

repetición a las exposiciones de la misma magnitud. Finalmente, las exposiciones externas ocasionales no son consideradas de riesgo.<sup>23</sup>

En la tabla III.1 se reportan los síntomas más comunes asociados con el envenenamiento por pesticidas carbamatos y organofosforados.

**Tabla. III.1.** *Síntomas asociados al envenenamiento con pesticidas organofosforados y carbamatos*

<b>Grado de envenenamiento</b>	<b>Síntomas</b>
<b>Leve</b>	<i>Diarrea, dolor de estómago o cabeza, mareo, náusea/vómito, sudor y salivación excesiva, visión borrosa y fatiga.</i>
<b>Medio</b>	<i>Sumado al aumento en la intensidad de los síntomas para el grado leve, se suman la constricción de las pupilas, malestar en el pecho, debilidad y/o incapacidad para caminar.</i>
<b>Alto</b>	<i>Problemas respiratorios, salivación, secreción nasal, calambres musculares, constricción severa de pupilas, pérdida de la consciencia, coma, y muerte.</i>

Es importante recordar que la presencia de cualquiera de estos síntomas va a depender de la toxicidad, tiempo de exposición y vía de ingreso del pesticida al organismo.

### **1.3.3. Manifestaciones clínicas**

A las intoxicaciones causadas por pesticidas inhibidores de la acetilcolinesterasa se las puede agrupar en tres cuadros clínicos: la intoxicación aguda, el síndrome intermedio y la neurotoxicidad tardía.

#### **1.3.3.1. Intoxicación aguda**

Como se ha mencionado anteriormente la exposición a pesticidas inhibidores de la enzima acetilcolinesterasa, pueden generar en las

personas distintos efectos según la dosis y la vía a la cual sucedió la exposición, al mismo tiempo, la gravedad de la intoxicación está definida por la magnitud y duración del contacto.

Es necesario mencionar que la manifestación de los síntomas consecuentes con un cuadro de intoxicación aguda va desde los pocos minutos hasta doce horas subsecuentes al contacto con el pesticida. En la tabla III.2 se reportan en forma de síntesis los signos y síntomas asociados a una intoxicación aguda.

**Tabla. III.2. Signos y síntomas de intoxicación aguda**

<i>Efectos muscarínicos</i>	<i>Efectos nicotínicos</i>	<i>Efectos en el SNC</i>
<i>Bradycardia, incontinencia de esfínteres, cólico abdominal, diarrea, vómito, náuseas, diaforesis, cianosis, broncoespasmo, sialorrea.</i>	<i>Hiperglicemia, parálisis flácida, debilidad, fasciculaciones, mialgias, calambres.</i>	<i>Cefalea, convulsiones, depresión respiratoria, ataxia, alteración del estado de conciencia, irritabilidad, confusión, ansiedad.</i>
<i>Broncorrea, rinorrea, hiperemia conjuntival, miosis, visión borrosa, incremento de la salivación.</i>	<i>Vasoconstricción periférica.</i>	<i>Dolor de cabeza</i>

### **1.3.3.1.1. Síndrome intermedio**

Estos casos suelen presentarse entre las 24 y 48 horas posteriores a la exposición al pesticida, muchas veces los síntomas aparecen luego de recuperarse de los síntomas propios de una intoxicación aguda, pero siempre se presentan antes de la aparición de la neuropatía retardada.

Este cuadro se caracteriza por el compromiso de pares craneales, disminución o ausencia de los reflejos miotendinosos, compromiso de la función respiratoria, debilidad en los músculos flexores del cuello, músculos

proximales de las extremidades, así como también se ven comprometidas la faringe y la lengua.

El proceso de intoxicación inicia con el depósito de acetilcolina en los receptores nicotínicos, este proceso genera un compromiso progresivo de los músculos proximales de las extremidades que inicia con los músculos flexores del cuello y culmina con los músculos encargados de la respiración como los intercostales y el diafragma, lo que puede causar una falla respiratoria si no es tratada de manera oportuna. También puede existir daño de los pares craneales en especial del sexto, cabe indicar que estos signos se manifiestan en intoxicaciones que ya no poseen manifestaciones colinérgicas.<sup>23,24</sup>

### **1.3.3.1.2. Neuropatía retardada**

La neuropatía retardada aparece a la segunda o tercera semana de la exposición a algún pesticida, pero en casos de exposición crónica, su inicio es desconocido ya que pueden ser meses o años. La tardanza dependerá de la naturaleza química y la dosis a la cual se fue expuesto. Los efectos neurotóxicos no están relacionados con la inhibición de la acetilcolinesterasa, sino más bien a la fosforilación de la estearasa neurotóxica (NTE), lo que produce su inhibición y alteración de la enzima calcio-calmodulinaquinasa II, a su vez el calcio intracelular se incrementa causando degeneración axonal.<sup>25</sup>

Todo este proceso perjudica a los músculos distales de las extremidades manifestándose con hipoestesia, parestesia, calambres, hiporreflexia en miembros inferiores, hipotrofia muscular y ataxia. Si bien la neuropatía retardada no está asociada directamente con los pesticidas carbamatos, sino a los organofosforados, es importante mencionarlo puesto que en las actividades agrícolas el uso de pesticidas no está sesgado a una sola clase, y por esto es importante conocer toda la información de los productos con los que se tiene contacto.<sup>25</sup>

Por todo lo anteriormente expuesto se hace necesario seguir desarrollando metodologías analíticas rápidas y sencillas que permitan detectar y cuantificar diferentes pesticidas en matrices que comprometen la salud de los seres vivos. En este trabajo de tesis se trabajó puntualmente con agua de red.



## **2. Resultados y análisis**

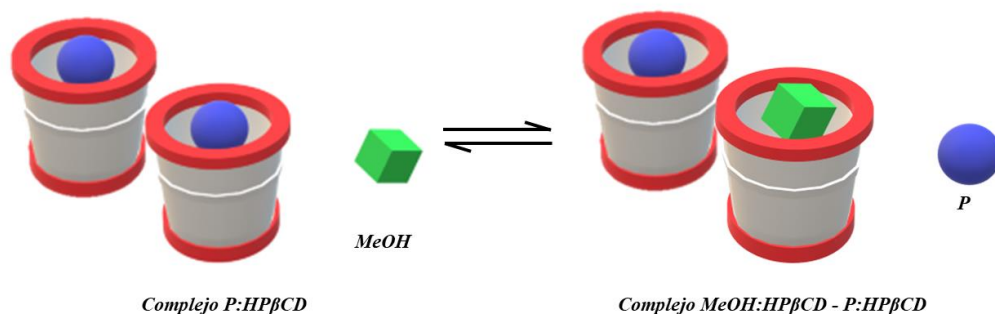
### **2.1. Elección de las condiciones cromatográficas para la separación e identificación de los N-metilcarbamatos**

El objetivo de este estudio es trasladar los sistemas supramoleculares estudiados mediante técnicas espectroscópicas estáticas, en las cuales se han desarrollado métodos analíticos para la cuantificación individual de pesticidas N-metilcarbamatos,<sup>26,27</sup> a un sistema dinámico como la HPLC y desarrollar un método analítico que permita separar, identificar y cuantificar simultáneamente AC, CF, BC y CY.

El primer y mayor desafío para enfrentar en la separación e identificación de los analitos mediante HPLC, es el porcentaje de solvente orgánico que conforma la fase móvil del sistema cromatográfico. Los antecedentes demuestran que las  $K_A$  entre pesticidas carbamato y la HP $\beta$ CD disminuyen a medida que el porcentaje de solvente orgánico aumenta en el medio.<sup>28</sup>

La tabla III.3 muestra el comportamiento de la  $K_A$  entre CF y HP $\beta$ CD con la presencia de diferentes porcentajes de solventes orgánicos en el medio. Como se observa las  $K_A$  disminuyen a medida que el porcentaje de solvente orgánico aumenta.<sup>28</sup>

Se plantea que esta disminución en la  $K_A$  entre los pesticidas y la HP $\beta$ CD es generado por una competencia entre el pesticida y el solvente orgánico por la cavidad del macrociclo desestabilizando la especie P:HP $\beta$ CD formando un posible complejo MeOH:HP $\beta$ CD.<sup>28</sup> El fenómeno planteado se muestra en la figura III.3.



**Figura III.3.** Coexistencia de los equilibrios del pesticida (P) y el metanol por la cavidad de la hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina.

**Tabla III.3.** Valores de  $K_A$  para el complejo CF:HP $\beta$ CD en presencia de porcentajes variables de solvente orgánico.<sup>28</sup>

<i>Solvente orgánico</i>	<i>% v/v</i>	<i>HP<math>\beta</math>CD <math>K_{AP}</math>, <math>10^2 M^{-1}</math></i>
-	0	$1,23 \pm 0,07$
<i>Metanol</i>	10	$0,67 \pm 0,05$
	20	$0,10 \pm 0,04$
<i>n-propanol</i>	3	$0,46 \pm 0,07$
	10	$0,29 \pm 0,05$
<i>Acetonitrilo</i>	1	$0,85 \pm 0,07$
	10	$0,40 \pm 0,03$

En base a la información anterior, se llevó a cabo la optimización de separación de los analitos, teniendo en cuenta que para el sistema planteado se requiere el uso de la menor cantidad de MeOH en la fase móvil que permitiera la mejor resolución de los analitos en cuestión. Esto generó tiempos de retención más largos a cambio de un ambiente químico que perjudicara lo menos posible la formación de los complejos supramoleculares entre los N-metilcarbamatos y la HP $\beta$ CD.

En la tabla III.4 se muestran las condiciones cromatográficas elegidas para el desarrollo del método analítico, en esta elección es de gran importancia que el flujo que arrastra la muestra a lo largo de la columna sea mayor al flujo del derivatizador poscolumna. El flujo de la fase móvil fue elegido de tal forma que al mezclar los flujos en el derivatizador el porcentaje de MeOH en el medio al momento de formarse el complejo sea aproximadamente del 19 %.

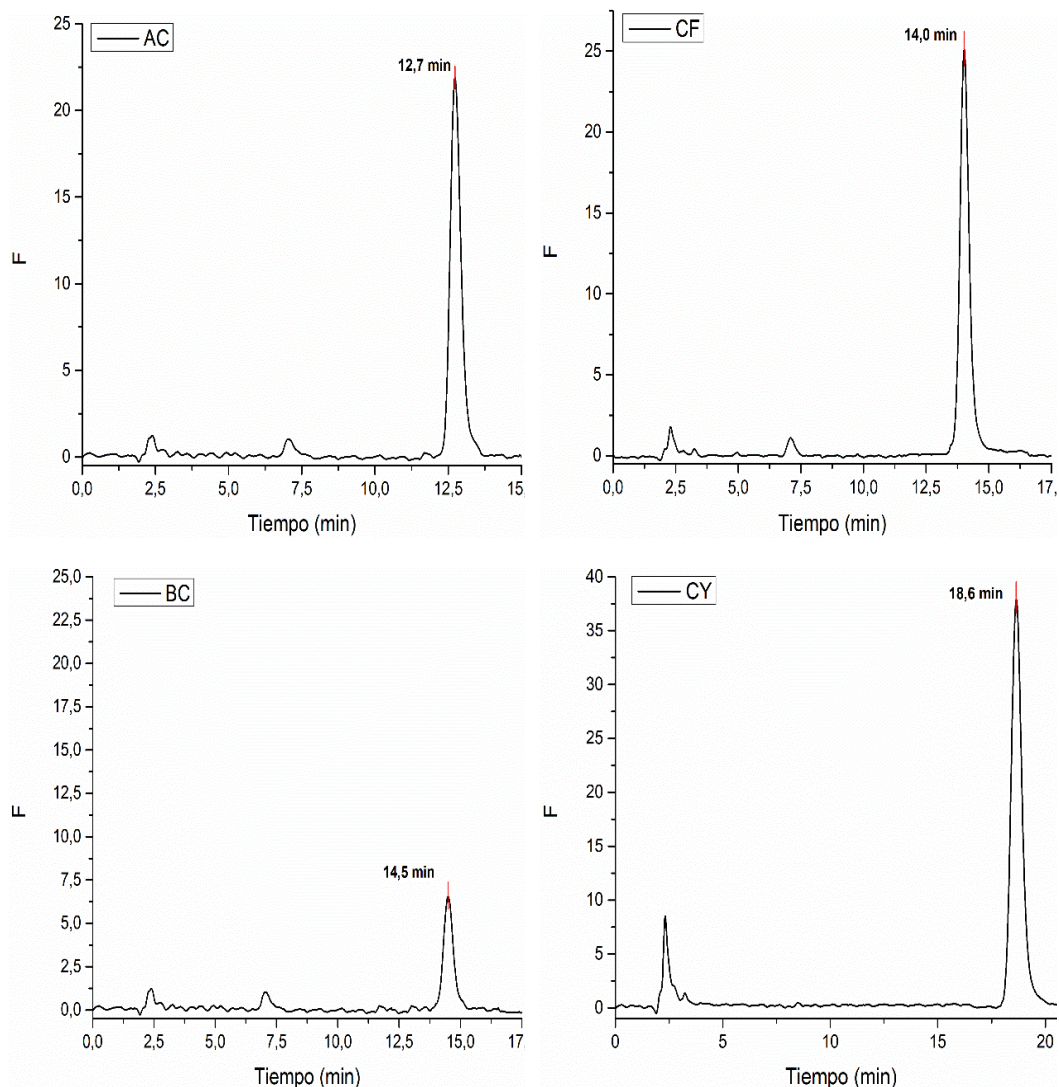
**Tabla III.4.** Condiciones cromatográficas para el estudio de la mezcla de los N-metilcarbamatos con adición poscolumna de hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina.

<i>Flujo (mL/min)</i>	<i>% H<sub>2</sub>O</i>	<i>% MeOH</i>	<i>Temp. Columna °C</i>	<i>Flujo Derivatizador (mL/min)</i>	<i>Temp. Derivatizador °C</i>
0,7	65	35	32,5	0,6	25,0

La figura III.4 muestra los cromatogramas para los analitos puros, mediante los cuales se terminaron los tiempos de retención para cada uno de estos, como se observa en cada cromatograma AC, CF, BC y CY eluyeron a 12,7 min, 14,0 min, 14,5 min y 18,6 min respectivamente.

Un aspecto importante que se puede observar en los cromatogramas es el fuerte solapamiento de las señales de CF y BC, adicionalmente se puede concluir que el rendimiento cuántico de BC es considerablemente menor al CF, ya que a pesar de tener una concentración 27 veces mayor posee una intensidad de fluorescencia 4,5 veces menor a la de CF.

En base a lo anterior el detector de fluorescencia fue configurado para recolectar la mayor información espectral de BC, los parámetros de la configuración se muestran en la tabla III.5. Los valores de ganancia reportados fueron seleccionados mediante la función ganancia automática (*AUTO GAIN*) del software del detector, de esta manera se obtuvieron los mejores cromatogramas posible sin correr el riesgo de la saturación de la señal.



**Figura III.4.** Cromatogramas individuales de aminocarb, carbofuran, bendiocarb y carbaryl y sus tiempos de retención bajo las condiciones de la tabla 2.

**Tabla III.5.** Configuración de parámetros para el detector de fluorescencia.

<b>Tiempo (min)</b>	<b>Ganancia (mV)</b>	<b><math>\lambda_{exc}</math> (nm)</b>	<b><math>\lambda_{emi}</math> (nm)</b>
0,0	100	276,0	352,0
11,0	60	276,0	352,0
14,5	10	260,0	330,0

Los parámetros que cambian automáticamente durante la corrida se configuran en el detector de fluorescencia, de esta forma se tiene que los primeros 11,0 min de la corrida, el detector tendrá una ganancia de 100 mV,

una  $\lambda_{exc}$  276,0 nm y una  $\lambda_{em}$  352,0 nm, del minuto 11,0 al minuto 14,5 el equipo automáticamente cambia la ganancia de 100 mV a 60 mV y se mantiene las  $\lambda_{exc}$  y  $\lambda_{em}$ , favoreciendo la emisión de BC, esto con el fin de facilitar su cuantificación sobre CF. Luego del minuto 14,5 y hasta el final de la corrida se modifican los tres parámetros para obtener la mejor señal de fluorescencia de CY.

## **2.2. Efecto de la adición poscolumna de hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina en la señal fluorescente de los cromatogramas de la mezcla de los pesticidas**

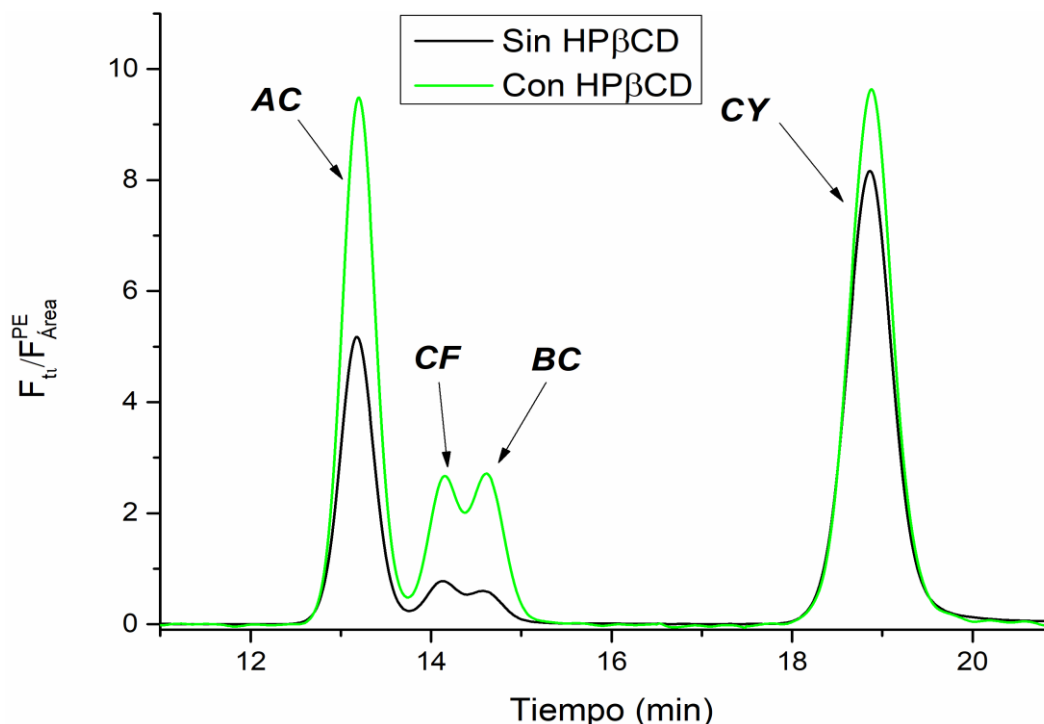
Una vez determinadas las condiciones cromatográficas óptimas para la resolución de AC, CF, BC y CY, así como la configuración del módulo de detección fluorescente, se procedió a evaluar cual era el efecto de la adición poscolumna de la HP $\beta$ CD en las señales fluorescentes de los analitos en el sistema cromatográfico.

En la figura III.5 se muestran los cromatogramas de la mezcla de pesticidas en ausencia de HP $\beta$ CD y tras la adición postcolumna de la HP $\beta$ CD, las concentraciones analíticas de AC, CF, BC y CY son [80,0]  $\mu$ M, [8,0]  $\mu$ M, [200,0]  $\mu$ M, [2,5]  $\mu$ M respectivamente, la concentración estimada de la HP $\beta$ CD en el derivatizador es de [8,0] mM.

La presencia de la HP $\beta$ CD en el sistema generó alteraciones significativas en las señales fluorescentes de los analitos. Como se observa existe una exaltación de la fluorescencia en todos los casos, lo que nos permite concluir que en la bobina de reacción del derivatizador poscolumna se están formando los complejos huésped-receptor que se habían estudiado individualmente por técnicas estáticas como UV-visible y fluorescencia.<sup>26,27</sup>

Como se comentó anteriormente los perfiles de CF y BC muestran un fuerte solapamiento de las señales, y es de recalcar que esta es la mejor resolución obtenida ajustándonos a los limitantes que presenta nuestro sistema a la hora de elegir las condiciones cromatográficas óptimas del

sistema, adicionalmente en literatura se reportan tiempos de retención idénticos para estos dos pesticidas,<sup>29,30,31</sup> y su resolución completa es muy compleja puesto que sus estructuras químicas son muy similares.



**Figura III.5.** Cromatograma de la mezcla de aminocarb, carbofuran, bendiocarb y carbaryl en ausencia y tras la adición de la HP $\beta$ CD en el derivatizador poscolumna, en condiciones y concentraciones detalladas en el texto.

Para sortear la dificultad existente por el solapamiento de las señales de CF y BC, se eligió para el procesamiento de los datos y el diseño analítico el uso de calibración multivariada de primer orden por cuadrados mínimos parciales (PLS), este modelo permite cuantificar correctamente analitos aun cuando sus señales analíticas presenten fuertes solapamiento. Este desarrollo se puede observar en el capítulo IV de esta tesis.

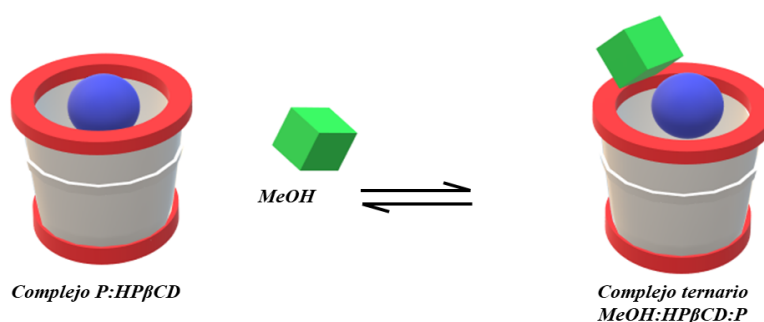
La exaltación de las señales fluorescentes de los analitos producto de la adición de la HP $\beta$ CD en el derivatizador poscolumna se muestra en la tabla III.6 como valor de  $F/F_0$ , donde  $F$  es el valor del área bajo la curva del complejo entre el pesticida y la HP $\beta$ CD y  $F_0$  es el valor del área bajo la curva del pesticida libre.

**Tabla III.6.** Efecto de la hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina sobre la fluorescencia de *N*-metilcarbamatos expresados en valor de  $F/F_0$

<i>Pesticida</i>	$F/F_0^a$
AC	1,79
CF + BC	5,87
CY	1,15

<sup>a</sup>Valores obtenidos con una concentración de HP $\beta$ CD 8,0 mM y 18,5% de MeOH

Para el caso de los complejos de CY, CF y BC se observa una disminución en los valores con respecto a los reportados en literatura para HP $\beta$ CD,<sup>26,27</sup> este comportamiento como ya se indicó es debido al elevado porcentaje de MeOH en el medio. Caso contrario ocurrió con AC, donde el rendimiento cuántico aumentó, en este caso este comportamiento es debido a la posible formación de un complejo ternario entre HP $\beta$ CD, AC y MeOH, cuyas interacciones estabilizan el complejo aumentando así el rendimiento cuántico del mismo.<sup>32</sup> En la figura III.6 puede ver una ejemplificación del complejo ternario planteado.



**Figura III.6.** Esquema propuesto del posible complejo ternario entre aminocarb, hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina y metanol

Estos cambios espectrales aumentaron la sensibilidad de los analitos lo que fue aprovechado para mejorar los LOD de los pesticidas como se presentara en el capítulo IV.





### 3. Conclusiones

El estudio realizado por HPLC con los cuatro N–metilcarbamatos permitió determinar cuáles eran las condiciones ideales para obtener la mejor resolución cromatográfica de los analitos. Los cromatogramas individuales de los analitos permitieron observar que el BC presenta un rendimiento cuántico de fluorescencia significativamente menor al que presentan los otros pesticidas, esto genera un reto a la hora del desarrollo analítico, más cuando la señal de este analito se encuentra fuertemente solapada con la señal del CF.

Los diferentes parámetros del sistema cromatográfico, al igual que la configuración de algunos parámetros específicos del detector fueron seleccionados en armonía entre sí para promover las mejores condiciones de trabajo, y desarrollo del método analítico. El flujo de la bomba previa a la columna tiene como objetivo generar la menor dilución posible de los analitos teniendo en cuenta que con el flujo del derivatizador tendremos un aumento del volumen de la fase móvil del sistema. Así sacrificamos una corrida más corta por señales más intensas. La configuración de los parámetros que cambian automáticamente durante la corrida en el detector fue elegida con el objetivo de favorecer la fluorescencia del analito menos fluorescente de los cuatro, el BC, y que como se indicó se encuentra fuertemente solapado por la señal de CF.

El porcentaje de MeOH en la fase móvil fue elegido de tal forma que los analitos eluyeran de forma correcta de la columna, y que al mezclarse con la solución acuosa de HP $\beta$ CD en el módulo el porcentaje total de MeOH en el medio fuera ~18,5%, favoreciendo así la formación del complejo entre el pesticida y el macrociclo.

La adición de HP $\beta$ CD 8,0 mM en el derivatizador poscolumna generó que las señales de fluorescencia de los cromatogramas de todos los analitos se exaltaran en relación con las muestras corridas sin la adición del macrociclo. La afinidad de los analitos por la cavidad de la HP $\beta$ CD generó la posible formación de complejos huésped–receptor entre ambas especies.

La fluorescencia de carbofuran, bendiocarb y carbaryl en presencia de HP $\beta$ CD es menor a las reportadas en trabajos previos, esto es debido al elevado porcentaje de MeOH en el medio, estableciéndose la coexistencia de los equilibrios entre la cavidad con el pesticida, y la cavidad y el metanol. Un comportamiento contrario presentó el aminocarb, cuya fluorescencia luego de interactuar con HP $\beta$ CD fue mayor en presencia de un porcentaje de MeOH más alto en el medio, esto como consecuencia de la estabilización del complejo por parte del MeOH, formando posiblemente un complejo ternario AC:MeOH:HP $\beta$ CD.

## **4. Parte experimental**

Esta sección detalla toda la instrumentación y procedimientos experimentales utilizados en el desarrollo y obtención de los resultados que se presentaron en este capítulo.

### **4.1. Instrumentación**

El estudio cromatográfico se realizó en un equipo HPLC Waters 1525, acoplado con un equipo de desgasificación en línea AF (Waters), una bomba binaria HPLC Waters de la serie 1500, un módulo de horno de columna, detector de matriz de fotodiodos UV–visible 2998 (waters), detector de fluorescencia 2475 Multi  $\lambda$  (waters), un módulo de reacción poscolumna (Waters) y el sistema informático (software Empower 2) para controlar los instrumentos, la adquisición y el análisis de datos. Se hizo uso de una columna de fase reversa Xbrige TM C18–3.5  $\mu\text{m}$ , 4.6 mm X 50 mm en conjunto con un guarda columna Xbrige TM C18–3.5  $\mu\text{m}$ , 4.6 mm X 20 mm.

El procesado de datos se realizó utilizando Origin 9.0.

### **4.2. Reactivos y Procedimientos**

Los reactivos utilizados fueron de grado analítico, se empleó AC (99,9 %) marca PESTANAL, CF (99 %), BC (99 %) y CY (99 %) de Chem Service. Se hizo uso de una HP $\beta$ CD con grado de sustitución 0,81 por unidad de glucosa. El NaOH (95 %) Cicarelli y el MeOH grado HPLC marca Sintorgan. El agua deionizada calidad milli-Q purificada mediante sistema millipore con una resistividad  $\sim 18 \Omega\text{M cm}$  a 25,0 °C.

El agua milli-Q utilizada en la fase móvil, se pasó previamente a través de un filtro hidrófilo de nylon (diámetro = 4,7 cm, poro = 0,5 µm; Osmonic). El mismo procedimiento se realizó con las soluciones de las mezclas de analitos, estas se pasaron por filtros de jeringa de Politetrafluoroetileno (PTFE-teflon) (diámetro = 13 mm, poro = 0,22 µm; GVS) antes de ser inyectadas en el equipo de HPLC.

#### **4.2.1. Evaluación y elección de condiciones cromatográficas para la separación e identificación de los N-metilcarbamatos**

Inicialmente se realizó una corrida cromatográfica con los cuatro pesticidas y flujo en gradiente para estimar el porcentaje de solvente necesario para eluir los analitos. Seguido a esto se realizaron diferentes corridas con flujo isocrático disminuyendo el porcentaje de metanol en la fase móvil hasta el punto en el que los perfiles de las señales no presentaran cola, esta cola se presenta cuando los analitos empiezan a retenerse en la columna. En este proceso se incrementó la temperatura de la columna con el objetivo de poder disminuir lo más posible el porcentaje de metanol en la fase móvil, siempre teniendo en cuenta de no excederse puesto que el aumento de temperatura suele atenuar la fluorescencia.

Una vez optimizados los valores cromatográficos se realizó una configuración de diferentes parámetros del detector de fluorescencia, el tiempo en el cual deben ocurrir los eventos son determinados por el operador en función de los tiempos de retención de los analitos, se seleccionaron las  $\lambda_{exc}$  y  $\lambda_{em}$  a partir de los espectros de absorción y emisión de los analitos, siempre favoreciendo la señal menos fluorescente en los casos donde no era posible separar las señales.

Un parámetro importante para configurar es la ganancia del detector, este se optimiza automáticamente con ayuda de la opción auto ganancia (*AUTO-GAIN*) del detector. Para este proceso se realiza una inyección de los analitos y el detector optimiza la ganancia en cada tiempo que se haya

indicado en función de la señal detectada; el programa genera el mejor cromatograma posible sin correr el riesgo de saturar el detector.

#### **4.2.2. Efecto de la adición poscolumna de hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina en la señal fluorescente de los cromatogramas de la mezcla de los pesticidas**

La solución de HP $\beta$ CD se preparó en agua milli-Q a una concentración de [17,3] mM, esta concentración garantizaba tener ~ [8,0] mM del macrociclo interaccionando con los analitos luego de ser diluida en derivatizador. La temperatura del derivatizador se fijó a 25,0 °C, y el flujo de inyección en el derivatizador fue de 0,6 mL/min. La solución de HP $\beta$ CD fue filtrada previamente a través de un filtro hidrófilo de nylon con diámetro = 4,7 cm y poro = 0,5  $\mu$ m de la marca Osmonic. Es indispensable que el flujo del derivatizador poscolumna sea menor al flujo de la columna para no perturbar los perfiles de las señales de los analitos.

Previo a la inyección de los analitos, se dejó estabilizar el sistema cromatográfico con la solución derivatizante durante 10 min, una vez transcurrido este tiempo se iniciaba con la inyección de las mezclas.



## 5. Bibliografía

1. Quattrocchi OA, Abelaira SI, Laba RF. Introducción a la HPLC: aplicación y práctica. Published online 1992:405.
2. Manuel Santamaría O, Pilar B, Ignacio J M. Cromatografía líquida de alta eficiencia. *Enfermedades Hepáticas Autoinmunes*. 2007;7(Unidad de Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad de Granada, Granada):44-52.
3. Rouhollah H. Simultaneous determination of carbazoles in water samples by cloud point extraction coupled to HPLC. *J Appl Chem Res*. 2013;31:21-31.
4. Herrera Murillo J, Chaves Villalobos M del C. Validación de un método de análisis para la determinación de hidrocarburos aromáticos policíclicos por cromatografía líquida de alta eficiencia en partículas PM10 Y PM2,5. *Tecnol en Marcha*. 2012;25(3):8.
5. Costa DJE, Martínez AM, Ribeiro WF, et al. Determination of tryptamine in foods using square wave adsorptive stripping voltammetry. *Talanta*. 2016;154:134-140.
6. Islam J, Shirakawa H, Nguyen TK, Aso H, Komai M. Simultaneous analysis of serotonin, tryptophan and tryptamine levels in common fresh fruits and vegetables in Japan using fluorescence HPLC. *Food Biosci*. 2016;13:56-59.
7. Muñoz JLP, Ceinos RM, Soengas JL, Míguez JM. A simple and sensitive method for determination of melatonin in plasma, bile and intestinal tissues by high performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci*. 2009;877(22):2173-2177.

8. Rizzo V, Porta C, Moroni M, Scoglio E, Moratti R. Determination of free and total (free plus protein-bound) melatonin in plasma and cerebrospinal fluid by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci.* 2002;774(1):17-24.
9. Helander A, Löwenmo C, Beck O. Determination of 5-hydroxytryptophol in urine by high-performance liquid chromatography: Application of a new post-column derivatization method with fluorometric detection. *J Pharm Biomed Anal.* 1995;13(4-5):651-654.
10. Gazpio C, Sánchez M, García-Zubiri IX, et al. HPLC and solubility study of the interaction between pindolol and cyclodextrins. *J Pharm Biomed Anal.* 2005;37(3):487-492.
11. León AG, Olives AI, del Castillo B, Martín MA. Influence of the presence of methyl cyclodextrins in high-performance liquid chromatography mobile phases on the separation of  $\beta$ -carboline alkaloids. *J Chromatogr A.* 2008;1192(2):254-258.
12. Hlabangana L, Hernández-Cassou S, Saurina J. Determination of biogenic amines in wines by ion-pair liquid chromatography and post-column derivatization with 1,2-naphthoquinone-4-sulphonate. *J Chromatogr A.* 2006;1130:130-136.
13. Yokota A, Kubota H, Komiya S, Sato K, Akiyama H, Koshiishi I. Sensitive and simple determination of bromate in foods disinfected with hypochlorite reagents using high performance liquid chromatography with post-column derivatization. *J Chromatogr A.* 2012;1262:219-222.
14. Long C, Mai Z, Zhu B, Zou X, Gao Y, Huang X. New oxidant used for the post-column derivatization determination of malachite green and leucomalachite green residues in cultured aquatic products by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr A.* 2008;1203(1):21-26.
15. Pollok D, Melchert HU. Determination of  $\alpha$ -tocopherolquinone in human



- serum samples by liquid chromatography with fluorescence detection and on-line post-column derivatization. *J Chromatogr A*. 2004;1056(1-2 SPEC.ISS.):257-262.
16. Pakin C, Bergaentzlé M, Hubscher V, Aoudé-Werner D, Hasselmann C. Fluorimetric determination of pantothenic acid in foods by liquid chromatography with post-column derivatization. *J Chromatogr A*. 2004;1035(1):87-95.
  17. Yáñez-Jácome GS, Aguilar-Caballos MP, Gómez-Hens A. Luminescent determination of quinolones in milk samples by liquid chromatography/post-column derivatization with terbium oxide nanoparticles. *J Chromatogr A*. 2015;1405:126-132.
  18. Racke KD, Coats JR. Enhanced degradation and the comparative fate of carbamate insecticides in soil. *J Agric Food Chem*. 1988;36(5):1067-1072.
  19. Sánchez-Brunete C, Albero B, Tadeo JL. High-performance liquid chromatography multiresidue method for the determination of N-methyl carbamates in fruit and vegetable juices. *J Food Prot*. 2004;67(11):2565-2569.
  20. Pacioni NL, Veglia A V. Determination of carbaryl and carbofuran in fruits and tap water by  $\beta$ -cyclodextrin enhanced fluorimetric method. *Anal Chim Acta*. 2003;488(2):193-202.
  21. Montemurro M, Pinto L, Vérias G, et al. Highly sensitive quantitation of pesticides in fruit juice samples by modeling four-way data gathered with high-performance liquid chromatography with fluorescence excitation-emission detection. *Talanta*. 2016;154:208-218.
  22. Smith GJ. *Pesticide Use and Toxicology in Relation to Wildlife: Organophosphorus and Carbamate Compounds*. Vol 170.; 1987.
  23. Osten JR Von, Tinoco-ojanguren R, Soares AMVM, Tinoco-ojanguren R. Effect of Pesticide Exposure on Acetylcholinesterase Activity in Subsistence Farmers from Campeche , Mexico. *Arch Environ*. 2004;

- (2015):37-41.
24. Hoppin JA, Umbach DM, Kullman GJ; Henneberger, PK. London SJ;Alavanja; Michael C.R; Sandler DP. Pesticides and other agricultural factors associated with self-reported farmer's lung among farm residents in the Agricultural Health Study. *Occup Environ Med.* 2007;64(5):334-342.
  25. Ferrer A. Intoxicación por plaguicidas. *An Sist Sanit Navar.* 2003;26:155-171.
  26. Pacioni NL, Veglia A V. Determination of poorly fluorescent carbamate pesticides in water, bendiocarb and promecarb, using cyclodextrin nanocavities and related media. *Anal Chim Acta.* 2007;583(1):63-71.
  27. Pacioni NL, Veglia A V. Determination of carbaryl and carbofuran in fruits and tap water by  $\beta$ -cyclodextrin enhanced fluorimetric method. *Anal Chim Acta.* 2003;488(2):193-202.
  28. Pacioni NL, Bracamonte AG, Veglia A V. Comparative effect of cyclodextrin nanocavities versus organic solvents on the fluorescence of carbamate and indole compounds. *J Photochem Photobiol A Chem.* 2008;198(2-3):179-185.
  29. Martínez-Domínguez G, Nieto-García AJ, Romero-González R, Frenich AG. Application of QuEChERS based method for the determination of pesticides in nutraceutical products (*Camellia sinensis*) by liquid chromatography coupled to triple quadrupole tandem mass spectrometry. *Food Chem.* 2015;177:182-190.
  30. Sánchez-Barragán I, Karim K, Costa-Fernández JM, Piletsky SA, Sanz-Medel A. A molecularly imprinted polymer for carbaryl determination in water. *Sensors Actuators, B Chem.* 2007;123(2):798-804.
  31. Gilbert-López B, García-Reyes JF, Fernández-Alba AR, Molina-Díaz A. Evaluation of two sample treatment methodologies for large-scale pesticide residue analysis in olive oil by fast liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. *J Chromatogr A.* 2010;1217(24):3736-

3747.

32. Pacioni NL, Bracamonte AG, Veglia A V. Comparative effect of cyclodextrin nanocavities versus organic solvents on the fluorescence of carbamate and indole compounds. *J Photochem Photobiol A Chem.* 2008;198(2-3):179-185.



# CAPÍTULO IV

---

**Aplicación analítica: Determinación simultánea de aminocarb, carbofuran, bendiocarb y carbaryl por cromatografía líquida de alto rendimiento con la adición poscolumna de hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina y calibración multivariada de primer orden.**

---



# 1. Introducción

Los pesticidas poseen diferentes actividades biológicas y son ampliamente utilizados con diferentes propósitos a lo largo del mundo. Una de estas aplicaciones como ya se ha comentado en el capítulo I de esta tesis se da en la industria agrícola, donde los N–metilcarbamatos (NMC) son una clase importante de insecticidas.

Se conoce que los NMC permanecen en los cultivos después su aplicación penetrando los tejidos vegetales, al igual que en el suelo, contaminando así frutas, verduras, aguas subterráneas y/o superficiales.<sup>1,2,3</sup> Los NMC tienen como características baja estabilidad y no acumulación en los tejidos orgánicos; y debido a su efecto neurotóxico como inhibidores reversibles de la enzima acetilcolinesterasa,<sup>4</sup> y alta toxicidad; son mortales en altas concentraciones.<sup>5</sup>

La presencia de residuos de insecticidas en frutas, verduras y aguas es una preocupación para los consumidores debido a sus efectos adversos para la salud, siendo esto especialmente importante y preocupante para los niños, puesto que consumen una mayor proporción de frutas y verduras procesadas en relación con su peso corporal.

Debido al alto uso de los NMC como insecticida en la gran variedad de cultivos agrícolas, es esencial desarrollar métodos analíticos que permitan determinarlos en diferentes matrices, tales como suelos, agua, frutas. Con base en lo anterior, se han publicado diferentes métodos para la identificación y cuantificación de pesticidas carbamatos.<sup>1,2,5,6,7,8,9</sup> Dentro de estos desarrollos analíticos se encuentran estrategias novedosas para detectar los NMC que implican la formación de complejos supramoleculares y la detección fluorescente.<sup>2,6</sup>

El estudio directo de estos carbamatos por cromatografía de gases–masas presenta bastantes complicaciones debido a la inestabilidad térmica de estos compuestos, que tienden a descomponerse en condiciones comunes de análisis.<sup>10,11</sup>

Uno de los métodos preferidos a lo largo del tiempo para la identificación y cuantificación de los NMC es la cromatografía líquida de alto rendimiento en fase reversa,<sup>1</sup> con detección UV–visible o arreglo de diodos.<sup>5,7,12</sup> Una forma de mejorar la sensibilidad de los métodos conocidos es mediante el uso de detectores de fluorescencia,<sup>13</sup> los cuales proporcionan al menos un orden de magnitud de mejora en el parámetro mencionado, generando la mejora del límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ).

Por otro lado, se han reportado el desarrollo de métodos analíticos que combinan HPLC con detección fluorescente y calibración multivariada.<sup>3</sup> Es importante tener en cuenta que hay reportes de casos donde se utiliza calibración multivariada de primer orden como PLS para cuantificar compuestos enantioméricos del ibuprofeno en señales cromatográficas fuertemente superpuestas.<sup>14,15</sup>

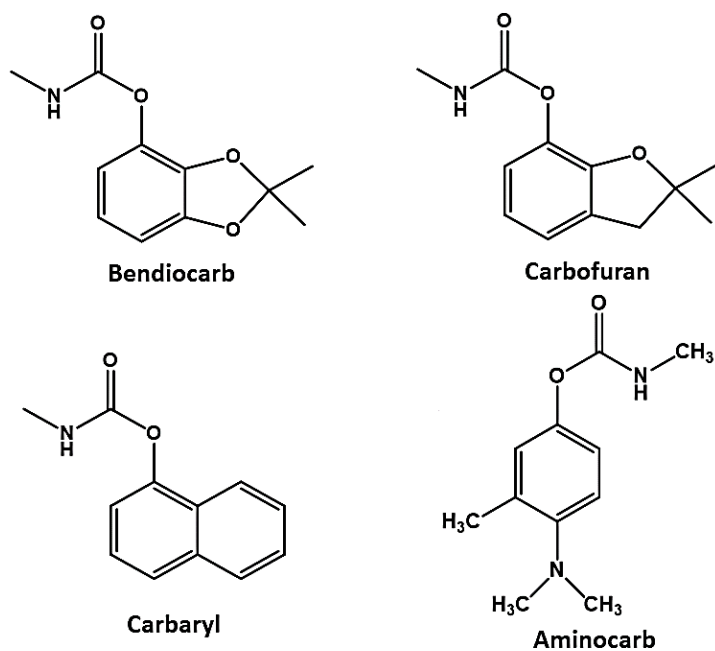
Junto con la implementación de detectores de fluorescencia en HPLC para mejorar la sensibilidad del método, se han desarrollado y evaluado otros desarrollos experimentales que acoplados al sistema cromatográfico ayudan en la mejorar los LOD y LOQ.

Una de estas estrategias es realizar una derivatización poscolumna de los analitos, con el objetivo de exaltar las señales relacionadas con la concentración del compuesto estudiado. Estos métodos requieren reactivos específicos y condiciones particulares, lo que los hace complejos de implementar.<sup>16</sup>

Este trabajo tiene como objetivo desarrollar un método analítico simple, que permita mejorar la cuantificación de un grupo de NMC como son: AC, CF, BC y CY combinando las ventajas de la HPLC en fase reversa con la derivación supramolecular poscolumna y la calibración multivariada de primer orden, más específicamente PLS, la cual aportó gran ayuda a la hora



de analizar señales no resueltas por el sistema cromatográfico. Las estructuras de los cuatro analitos objeto de este estudio se muestran en la figura. IV.1.



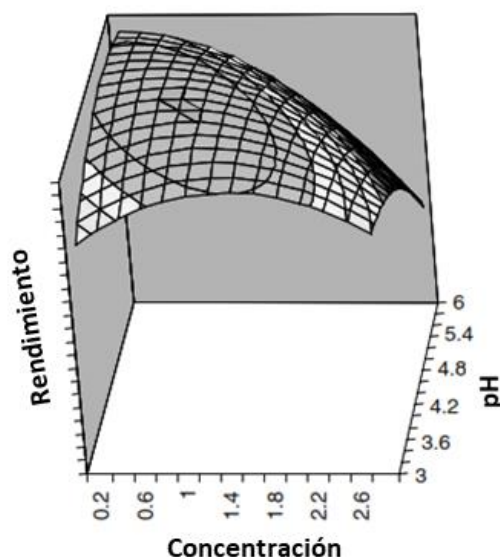
*Figura VI.1. Estructuras químicas de los pesticidas N-metilcarbamatos en estudio*

## 1.1. Diseño experimental de Taguchi

El diseño experimental en el área de la química juega un rol relevante que ha sido poco explotado a lo largo del tiempo bajo la premisa de la simplicidad de algunos procesos básicos de la misma, sin embargo el correcto diseño de un experimento puede llevar a la simplificación de procesos complejos que involucren gran cantidad de variables, la optimización de procesos de síntesis, condiciones cromatográfica para la correcta separación de diferentes analitos, la disminución de experimentos y por ende el tiempo requerido para una experiencia que involucre parámetros no controlables individualmente, etc.<sup>17</sup>

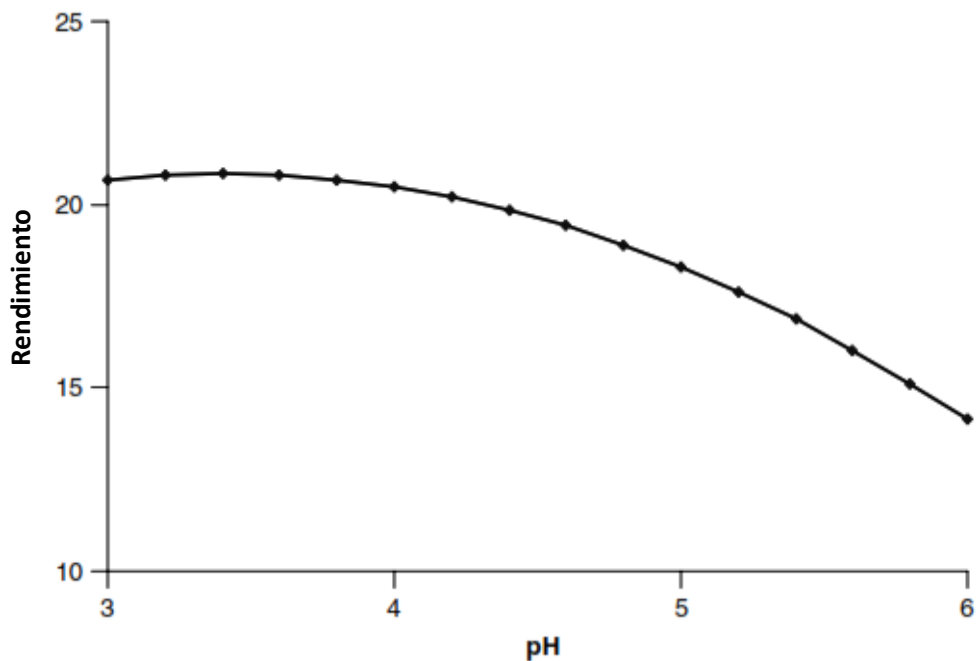
Un ejemplo de esto se observa en la optimización del rendimiento de una reacción en función del pH y la concentración de un catalizador. En la figura IV.2 se muestra un diagrama de superficie del rendimiento de la reacción en

función del pH y la concentración del catalizador. Generalmente el analista elige un valor fijo en una de las variables (concentración) para luego cambiar los valores de la segunda (pH), esto le permite encontrar el óptimo para el pH como se muestra en la figura IV.3 y a partir de este encontrar la mejor concentración al variar este parámetro como se muestra en la figura IV.4.<sup>17</sup>

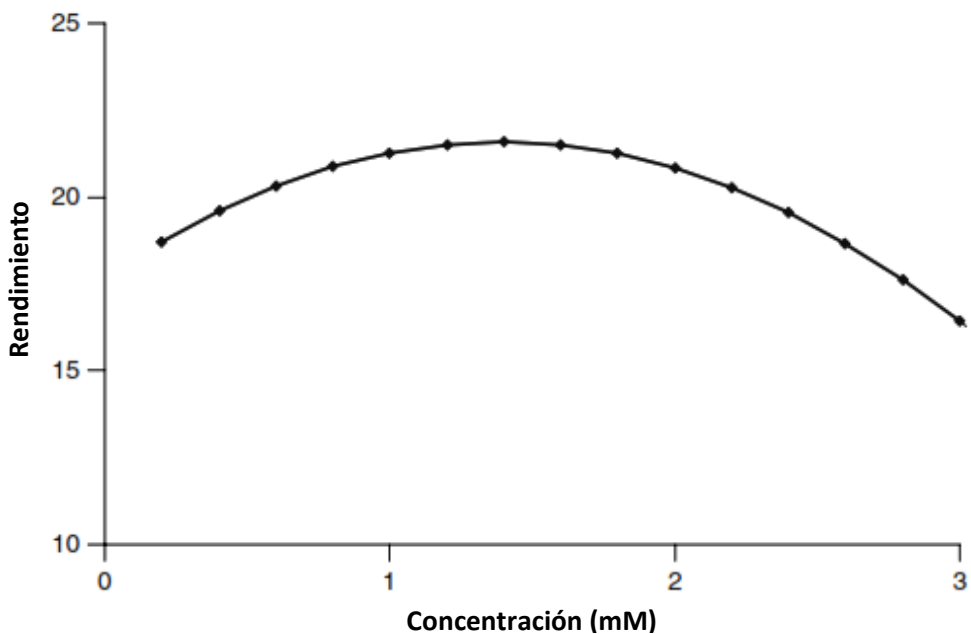


**Figura VI.2.** Diagrama de superficie del rendimiento de la reacción en función del pH y la concentración del catalizador. Figura basada en literatura.<sup>17</sup>

Si se analiza cada variable por separado en base a la figura IV.3 y figura IV.4 los valores que mejor rendimiento darían serían a  $\text{pH} = 3,4$  y  $1,4 \text{ mM}$  del catalizador. Estos valores difieren significativamente de los valores ideales que se obtendrían del gráfico de superficie, donde los valores óptimos resultan ser  $\text{pH} = 4,4$  y  $1,0 \text{ mM}$  del catalizador, esto sucede porque en este sistema la influencia del pH y la concentración no son independientes.<sup>17</sup>



**Figura VI.3.** Sección transversal del diagrama de superficie del rendimiento de la reacción en función del pH y concentración del catalizador fija. Figura basada en literatura.<sup>17</sup>



**Figura VI.4.** Sección transversal del diagrama de superficie del rendimiento de la reacción en función de la concentración del catalizador y pH fijo. Figura basada en literatura.<sup>17</sup>

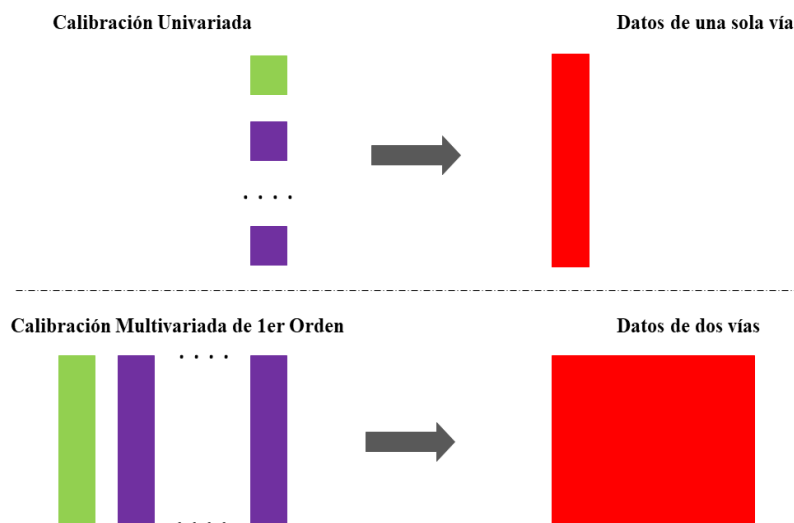
Si se quisiera construir la superficie de respuesta basados únicamente en el trabajo experimental se requerirían 256 experimentos, lo cual es completamente inviable. El diseño experimental consiste en una selección

de niveles para ambas variables que explique significativamente el sistema y luego realizar pruebas sólo con este subconjunto con el fin de desarrollar una relación matemática entre el descriptor del sistema (en este caso rendimiento de la reacción) y las variables estudiadas (pH y concentración del catalizador) mediante un modelo computacional.<sup>17</sup>

Los usos potenciales del diseño experimental racional en la química son amplios, de igual forma es importante reconocer que el enorme número de métodos que aparecen en la literatura se basa en un pequeño número de principios fundamentales. A la hora de elegir un método o diseño experimental lo más importante es apreciar las motivaciones de este. Es por esto que es importante resaltar que el diseño de Taguchi implementado en este trabajo tiene como finalidad obtener pares de mezclas a diferentes concentraciones, que fueran totalmente aleatorizados y sin correlaciones en las concentraciones. Por esta razón no se evaluaron parámetros de respuesta en función de los factores presentes en el sistema.

## **1.2. Cuadrados mínimos parciales**

El método de PLS es uno de los métodos de calibración multivariada de primer orden (el orden del método es un tema que no se tratará en esta tesis). La calibración multivariada permite cuantificar simultáneamente más de un analito o un analito en presencia de interferentes haciendo uso de más de un sensor analítico, a diferencia de la calibración univariada donde a cada muestra se le asigna una única señal analítica.<sup>18</sup> En la figura IV.5 se muestra una representación de los datos para un sistema univariado y multivariado. Un ejemplo sencillo de datos de múltiples sensores son los espectros de absorción, donde la señal analítica es la absorbancia y los sensores son la longitud de onda. No obstante, es preciso aclarar que los datos multisensoriales no se limitan exclusivamente a datos espectroscópicos, siendo posible el uso de otras señales como los voltamperogramas.



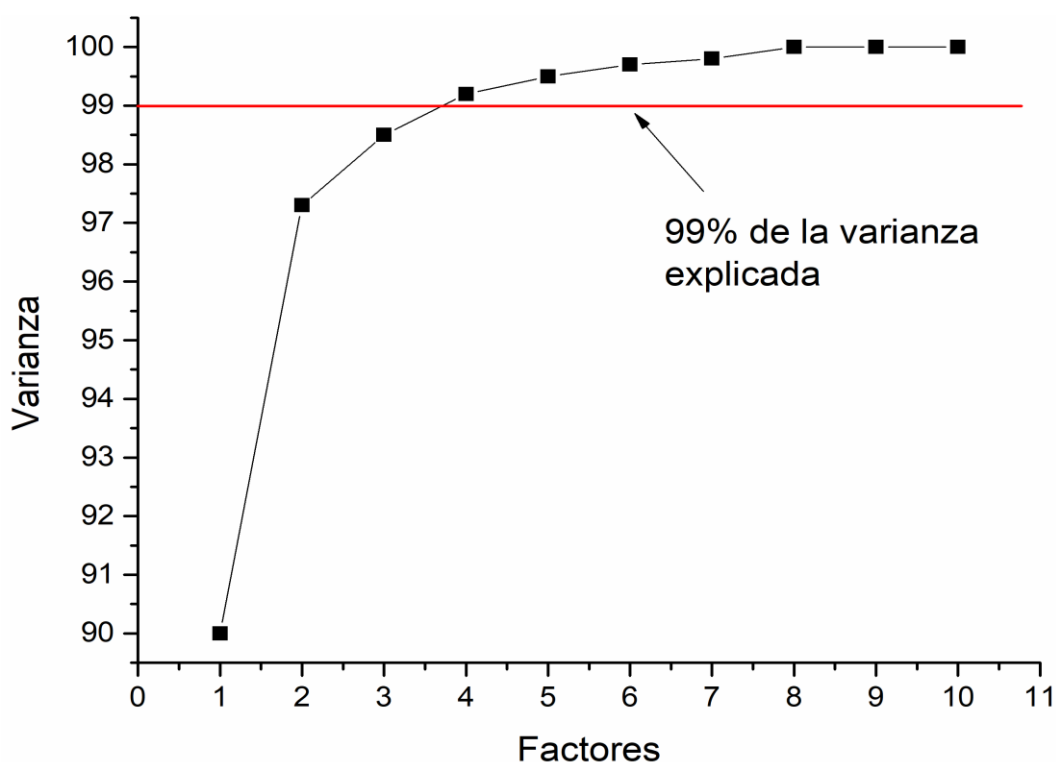
**Figura IV.5.** Ilustración de las distintas matrices que pueden construirse con datos univariados y multivariados. Izquierda: se ejemplifica el orden de los datos, es decir, la complejidad de los datos de una muestra (los objetos verdes identifican muestras específicas de un conjunto de muestras). Derecha: Se muestran los objetos matemáticos construido con los datos de un conjunto de muestras de una sola vía y de dos vías.

La calibración multivariada consta de dos etapas al igual que la calibración univariada; la primera etapa es la de calibración, donde se busca establecer la relación entre la señal analítica y la concentración del analito en la muestra, concentración que debe ser conocida. Las soluciones para calibrar pueden ser mezclas de los analitos o las soluciones puras de los mismos si experimentalmente es posible.

Dado que intrínsecamente los datos obtenidos multivariadamente son menos selectivos, es necesaria una metodología que relaciones las señales con los analitos a determinar, razón por la cual el procesado de esta información es realizado por medio de notación matricial.<sup>18</sup>

El método por PLS mejora el método de regresión por componentes principales (PCR), al incluir los valores de concentración de calibrado en el cálculo para determinar los factores que explican la variación espectral del sistema en estudio, parámetro que es de gran importancia a la hora de analizar sistemas complejos con fuentes de variación desconocidas.

Estos factores contribuyen en un porcentaje cada vez menor de la variación espectral total del sistema, por tal razón lo usual es usar la menor cantidad de factores que en conjunto aporten el mayor porcentaje de variación espectral. Un ejemplo de esto se muestra en la figura IV.6, donde los cuatro primeros factores explican más del 99,0 % de la varianza espectral, lo que permitiría concluir que existen cuatro fuentes de variación espectral en los espectros contenidos por la matriz.



**Figura IV.6.** Varianza explicada en función del número de factores.<sup>a</sup>

Como ya se mencionó en el ámbito analítico es importante involucrar los valores de concentración en el cálculo de estimación de las fuentes de variación espectral, para ello se ha desarrollado un método llamado *validación cruzada*, el cual consiste en calibrar el modelo con todas las muestras de calibrado excepto una y predecir la concentración de la muestra excluida junto con su respectivo error de predicción. Este cálculo se realiza dejando de lado un número creciente de muestras (factores) hasta un máximo que deberá ser menor al número de muestras de calibrado. A cada muestra dejada de lado se le determina el respectivo error de predicción y se calcula la suma cuadrática de errores de predicción (PRESS) en función

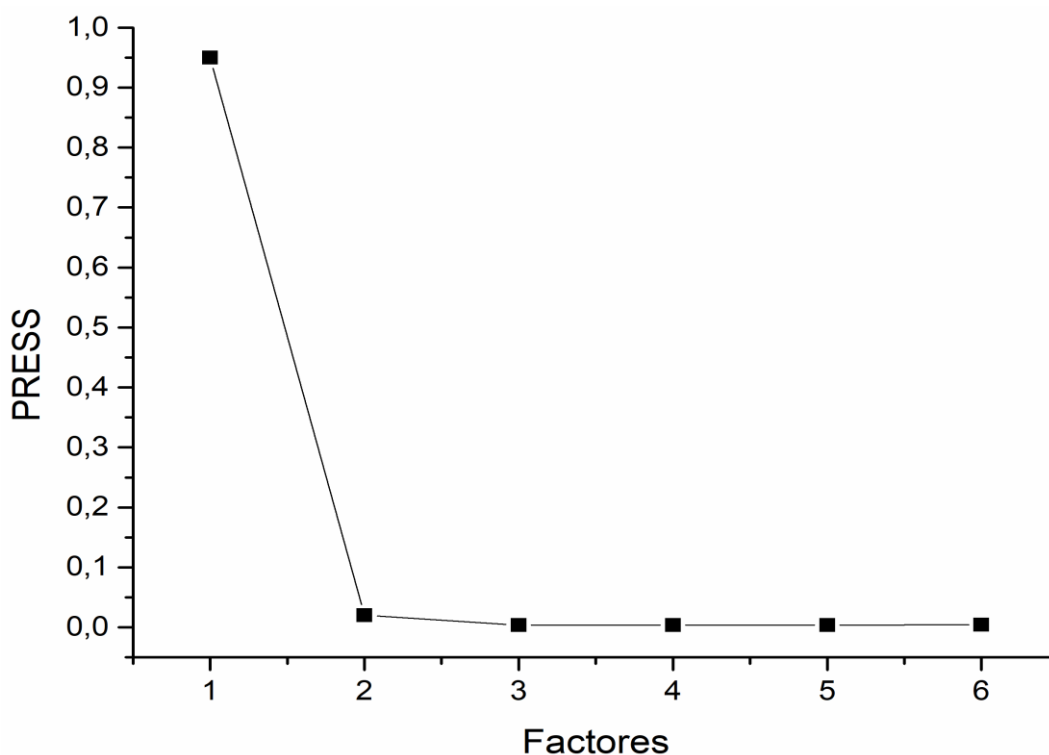
<sup>a</sup> Datos propuestos por el autor de esta tesis basados en ejemplos similares de literatura (Referencia 18).

del número de factores excluidos. El análisis de la variación de PRESS en función del número de factores se realiza mediante un procedimiento estadístico que se ejemplifica a continuación.

En la tabla IV.1 se muestra un ejemplo para los valores de PRESS en función del número de factores. Graficar estos datos como se muestra en la figura IV.7 permite analizar de forma más sencilla su comportamiento.

**Tabla IV.1.** Variación de PRESS en función del número de factores incluidos en la calibración.<sup>a</sup>

<b>Factores</b>	<b>PRESS</b>
1	0,95
2	0,0199
3	$3,9 \times 10^{-3}$
4	$4,0 \times 10^{-3}$
5	$3,5 \times 10^{-3}$
6	$4,5 \times 10^{-3}$



**Figura IV.7.** Variación del PRESS en función del número de factores.

Fácilmente se observa como el PRESS va disminuyendo a medida que el número de factores aumenta, esto debido una compresión más eficiente de los datos por parte del algoritmo. Dado que los primeros factores son los que poseen la mayor variación espectral en la calibración y que el uso de

<sup>a</sup> Datos propuestos por el autor de esta tesis basados en ejemplos similares de literatura (Referencia 18).

menos factores de los necesarios conlleva a un *subajuste* de los datos, es importante seleccionar el número óptimo de factores para cada sistema. El valor de PRESS se estabiliza con un número de factores más alto, demostrando que los últimos factores no aportan información significativa en la variancia espectral. Es importante saber que así el PRESS no varía significativamente entre un factor y otro, y se elige un número mayor de factores al requerido se puede generar una situación no deseada como lo es el *sobreajuste* de los datos.

Visualmente podría concluirse que el valor óptimo de factores es aquel que tenga el menor PRESS, lo que llevaría a asegurar erróneamente que el número de factores para el ejemplo de la tabla IV.2 es dos (2). Si se calcula el cociente de los distintos PRESS con el valor mínimo de PRESS y se analizan estos cocientes de como coeficientes de varianza con su probabilidad y grados de libertad asociados tanto al numerador como al denominador, la tabla IV.2 contendría los datos completos del análisis.

**Tabla IV.2.** Variación de PRESS en función del número de factores incluidos en la calibración.<sup>a</sup>

<b>Factores</b>	<b>PRESS</b>	<b>PRESS/min(PRESS)</b>	<b>p</b>
1	0,95	271	0,999
2	0,0199	5,43	0,997
3	$3,9 \times 10^{-3}$	1,11	0,605
4	$4,0 \times 10^{-3}$	1,14	0,576
5	$3,5 \times 10^{-3}$	1	0,5
6	$4,5 \times 10^{-3}$	-	

Mediante este procedimiento y en base a resultados empíricos, Haaland propuso elegir como número de factores óptimo para el sistema aquel valor cuya probabilidad asociada sea menor a 0,75, de esta forma para los datos de la tabla IV.2 el número de factores que aportan significativamente a la variancia espectral son tres (3).<sup>19</sup>

### 1.2.1. Etapa de calibración y predicción

Para estas dos etapas se requiere la preparación de soluciones mezcla de los analitos incógnita y se dividen en dos conjuntos denominados set de

<sup>a</sup> Datos propuestos por el autor de esta tesis basados en ejemplos similares de literatura (Referencia 18).



calibración y set de predicción, se recomienda que las concentraciones entre ambos conjuntos sean diferentes y se debe evitar la colinealidad de las concentraciones de cada analito entre las soluciones mezcla.<sup>18</sup>

Inicialmente se determinan los factores de variación espectral requeridos mediante *validación cruzada*, para finalmente obtener un vector de coeficientes de regresión a los diferentes factores, para finalmente mediante estos estimar la concentración del set de predicción o la solución incognita.<sup>18</sup>

### **1.2.2. Exactitud del método**

La exactitud del método se determinó mediante la prueba de la región elíptica de confianza conjunta (EJCR), que a diferencia de analizar cuanto se alejaba el valor predicho del valor nominal y asumir que los valores de pendiente e intercepto son independientes, considera un intervalo de confianza conjunta entre ambos parámetros, este intervalo es una región en el plano de la pendiente y el intercepto que tiene forma de elipse. La prueba consiste en estudiar si el punto ideal de pendiente e intercepto (1:0) está contenido en la elipse, si es así el método evaluado es exacto.<sup>18</sup>

Esta región está basada en el parámetro estadístico  $F$  y un nivel de confianza usualmente del 95,0 %, de igual forma los desvíos estándar de la regresión están involucrados en el cálculo por lo que el ancho de esta elipse da una idea de la precisión del método. Es importante conocer si la variancia del método es homoscedástico o heteroscedástico.<sup>18</sup>

### **1.2.3. Límites de detección**

Para este tipo de métodos como es PLS se reportan dos (2) LOD, un  $LOD_{min}$  y un  $LOD_{max}$ , estos valores se encuentran asociados al *leverage* mínimo y máximo en el proceso de estimación de coeficientes de regresión.<sup>20</sup>



## 2. Resultados y análisis

En la siguiente sección se muestran los resultados y consideraciones para el desarrollo de una metodología analítica por HPLC y derivatización supramolecular poscolumna para la detección y cuantificación de cuatro pesticidas N-metilcarbamatos.

### 2.1. Determinación de absorptividades molares

Teniendo en cuenta que las concentraciones de los analitos cumplen la ley de Lambert–Beer (ecuación IV.1), y dado que las muestras a inyectar en el sistema HPLC, deben ser preparadas en un medio similar a las proporciones de la fase móvil, fue necesario determinar las  $\epsilon$  de los cuatro pesticidas en solución al 40 % v/v de metanol–agua a 25,0 °C.

$$A = \epsilon bC \quad \text{ec IV.1}$$

Estos  $\epsilon$  fueron usados el control de las concentraciones de las soluciones madre que se emplearon para preparar las diferentes mezclas de calibración y predicción.

La determinación experimental por medio de espectroscopia UV–vis de los  $\epsilon$  para los cuatro analitos arrojaron coeficientes de correlación mayores a 0,999. En la tabla IV.3. se presentan los valores de  $\epsilon$  calculados.

**Tabla IV.3.** Coeficientes de absorptividad molar de AC, CF, BC y CY en solución 40 % v/v metanol–agua

<i>Pesticida</i>	$\lambda_{max}$ (nm)	$\epsilon, M^{-1} cm^{-1}$
AC	237,0	$(74 \pm 1) \times 10^2$
CF	276,0	$(286 \pm 2) \times 10$
BC	278,0	$(35 \pm 2) \times 10^2$
CY	280,0	$(49 \pm 1) \times 10^2$

## 2.2. Consideraciones cromatográficas

En base al análisis y consideraciones ya planteadas en el capítulo III para la elección de las condiciones cromatográficas utilizadas en el estudio del efecto de la HP $\beta$ CD en la fluorescencia de los pesticidas; se eligieron las condiciones cromatográficas para el estudio analítico mencionadas en el capítulo III (tabla III.3).

Teniendo en cuenta los diferentes procesos que ocurren en los complejos supramoleculares producto de la presencia de co–solventes orgánicos en el sistema,<sup>2,6,21</sup> y teniendo en cuenta que la fluorescencia del complejo formado entre CF, BC y CY con la HP $\beta$ CD disminuye con la adición de concentraciones crecientes de metanol,<sup>2,6,21</sup> se preparó la solución de HP $\beta$ CD en agua, y se bombeó a un flujo fijo de 0,6 mL min<sup>-1</sup> con el objetivo de disminuir el porcentaje de metanol en el módulo poscolumna, facilitando la mayor proporción de complejos plaguicida-HP $\beta$ CD posible en las condiciones experimentales.

## 2.3. Soluciones estándar y sets de calibración y predicción

Las soluciones estándar se prepararon en una mezcla agua–metanol (65:35), las concentraciones de AC, CF, BC y CY fueron 128  $\mu$ M, 227  $\mu$ M, 1200  $\mu$ M y 10  $\mu$ M, respectivamente.

Los conjuntos (set) de calibración y predicción constaban de 16 y 10 soluciones respectivamente. Se prepararon mezclando alícuotas de las

soluciones estándar de los NMC. Los niveles de concentración para cada analito en cada una de las soluciones de calibración y predicción se determinaron con un diseño experimental de Taguchi de tres factores y cuatro niveles, y se muestran en la tabla IV.4.

**Tabla IV.4.** *Diseño experimental de Taguchi. Set de calibrado y set de predicción*

<b>Set de calibrado [<math>\mu\text{M}</math>]</b>					<b>Set de predicción [<math>\mu\text{M}</math>]</b>				
Set	AC	CF	BC	CY	Set	AC	CF	BC	CY
<b>C1</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,0</b>	<b>0,53</b>	<b>P1</b>	<b>40,6</b>	<b>5,0</b>	<b>27,4</b>	<b>0,183</b>
<b>C2</b>	<b>0,00</b>	<b>6,58</b>	<b>38,0</b>	<b>0,53</b>	<b>P2</b>	<b>40,6</b>	<b>15,0</b>	<b>109,7</b>	<b>0,183</b>
<b>C3</b>	<b>0,00</b>	<b>25,0</b>	<b>94,0</b>	<b>0,13</b>	<b>P3</b>	<b>40,6</b>	<b>39,5</b>	<b>27,4</b>	<b>0,183</b>
<b>C4</b>	<b>0,00</b>	<b>65,8</b>	<b>274,2</b>	<b>0,00</b>	<b>P4</b>	<b>55,0</b>	<b>5,0</b>	<b>61,0</b>	<b>0,305</b>
<b>C5</b>	<b>4,50</b>	<b>0,00</b>	<b>0,0</b>	<b>0,53</b>	<b>P5</b>	<b>55,0</b>	<b>15,0</b>	<b>104,0</b>	<b>0,305</b>
<b>C6</b>	<b>4,50</b>	<b>6,58</b>	<b>94,0</b>	<b>1,31</b>	<b>P6</b>	<b>55,0</b>	<b>39,5</b>	<b>142,0</b>	<b>0,305</b>
<b>C7</b>	<b>4,50</b>	<b>25,0</b>	<b>0,0</b>	<b>0,26</b>	<b>P7</b>	<b>18,1</b>	<b>5,0</b>	<b>109,7</b>	<b>0,72</b>
<b>C8</b>	<b>4,50</b>	<b>65,8</b>	<b>274,2</b>	<b>0,13</b>	<b>P8</b>	<b>18,1</b>	<b>15,0</b>	<b>104,0</b>	<b>0,72</b>
<b>C9</b>	<b>45,4</b>	<b>0,00</b>	<b>274,2</b>	<b>0,13</b>	<b>P9</b>	<b>18,1</b>	<b>39,5</b>	<b>61,0</b>	<b>0,72</b>
<b>C10</b>	<b>45,4</b>	<b>6,58</b>	<b>38,0</b>	<b>1,31</b>	<b>P10</b>	<b>18,1</b>	<b>39,5</b>	<b>27,4</b>	
<b>C11</b>	<b>45,4</b>	<b>25,0</b>	<b>274,2</b>	<b>0,26</b>					
<b>C12</b>	<b>45,4</b>	<b>65,8</b>	<b>0,0</b>	<b>0,00</b>					
<b>C13</b>	<b>71,0</b>	<b>0,00</b>	<b>38,0</b>	<b>0,26</b>					
<b>C14</b>	<b>71,0</b>	<b>6,58</b>	<b>274,2</b>	<b>0,26</b>					
<b>C15</b>	<b>71,0</b>	<b>6,58</b>	<b>38,0</b>	<b>0,00</b>					
<b>C16</b>	<b>71,0</b>	<b>65,84</b>	<b>94,0</b>	<b>1,31</b>					

Este diseño se considera una herramienta poderosa que podría hacer frente a sistemas muy complejos, es utilizado de forma más eficiente cuando hay un número intermedio de variables (de 3 a 50), pocas interacciones entre variables y cuando sólo unas pocas variables contribuyen

significativamente,<sup>22,23</sup> ajustándose así a las características de nuestro estudio.

Los factores en el diseño son AC, CF y BC y los niveles las concentraciones de calibrado. Las concentraciones para el conjunto de calibración de CY son independientes y no se incluyeron en el diseño experimental puesto que este analito estaba completamente resuelto en el cromatograma, y no presentaba un efecto en su señal por parte de las concentraciones de los otros analitos. Se prepararon cuatro niveles por triplicado y cuadruplicado para el nivel central.

Para el conjunto de muestras de predicción, se prepararon 10 soluciones con concentraciones aleatorias, estas soluciones se prepararon a partir de las soluciones estándar en tres niveles de concentración. Las concentraciones de las soluciones para los conjuntos de calibración y predicción se muestran en la tabla IV.4.

## **2.4. Alineamiento de los perfiles cromatográficas**

Dado que los algoritmos de PLS reconocen las señales e identifican los cambios espectrales de cada analito de forma multivariada, se hace necesario para su óptimo funcionamiento, un alineamiento de los perfiles cromatográficos en la matriz de datos. Este procedimiento es necesario ya que experimentalmente hay cambios en los tiempos de retención de los analitos, probablemente debido a ligeras fluctuaciones en la composición de la fase móvil, temperatura efectiva de la columna o tiempo de equilibrio de la columna.

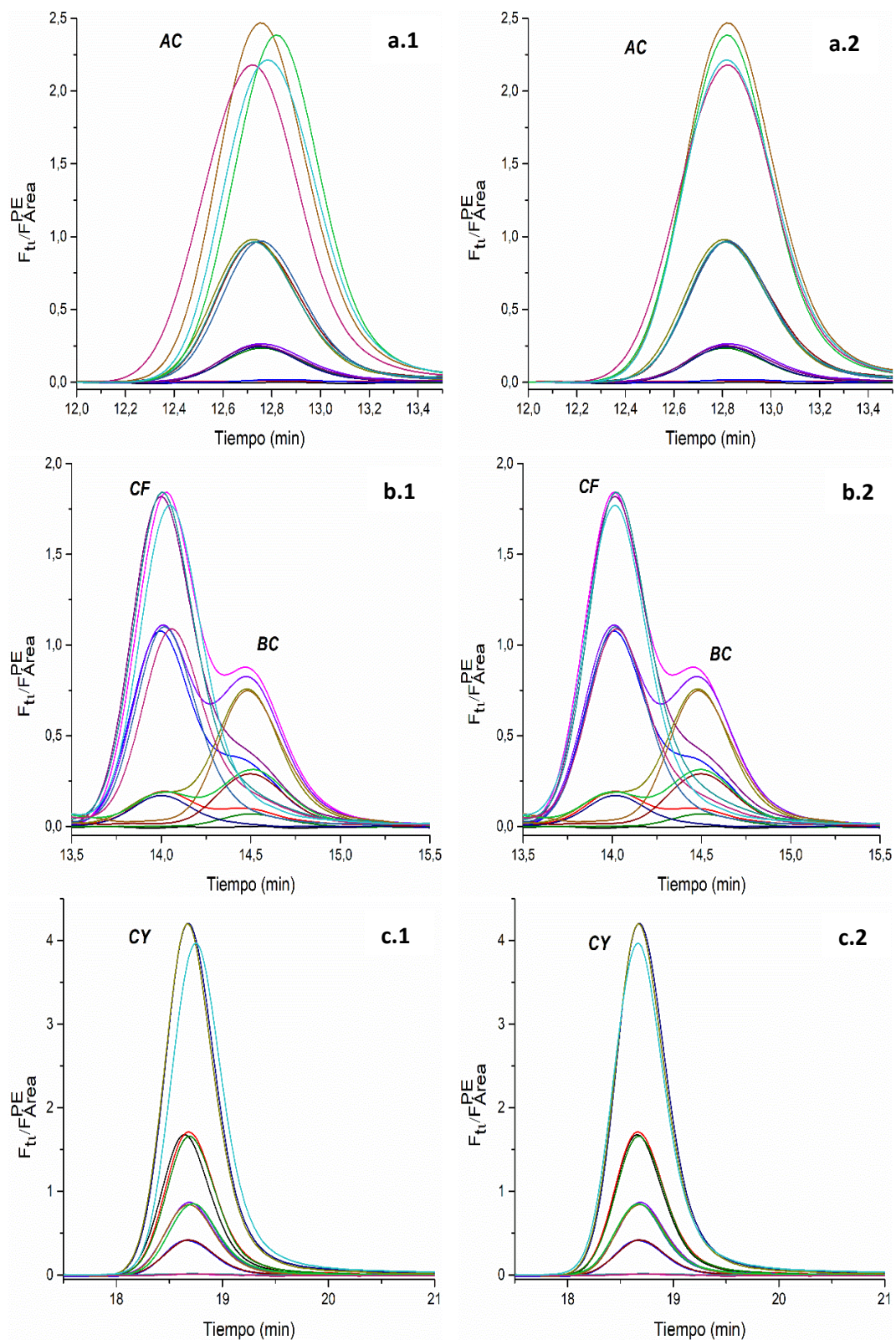
En este caso, las matrices de datos registradas de cada señal se alinearon, seleccionando un pico de referencia y moviendo digitalmente todas las demás matrices en la coordenada de tiempo hasta que el pico máximo se alineó con el de la matriz de referencia. Este procedimiento se hizo para las señales de AC y CY, las cuales se encuentran completamente resueltas en el cromatograma. Para la señal no resuelta correspondiente a

CF y BC, se tomó como referencia el tiempo de retención de CF en uno de los cromatogramas, y finalmente fueron alineados moviendo digitalmente todos los demás hasta que el pico máximo para el componente principal CF se alineó en tiempo con la matriz de referencia.<sup>14,15</sup> En la figura IV.8.a (1,2,3) se muestran los cromatogramas originales respectivamente para AC, la mezcla de CF y BC, y CY. En la figura IV.8.b (1,2,3) se pueden ver los mismos cromatogramas después de la alineación. Este procedimiento se realizó de igual forma para los cromatogramas con adición de HP $\beta$ CD.

## 2.5. Selección de factores o variables latentes

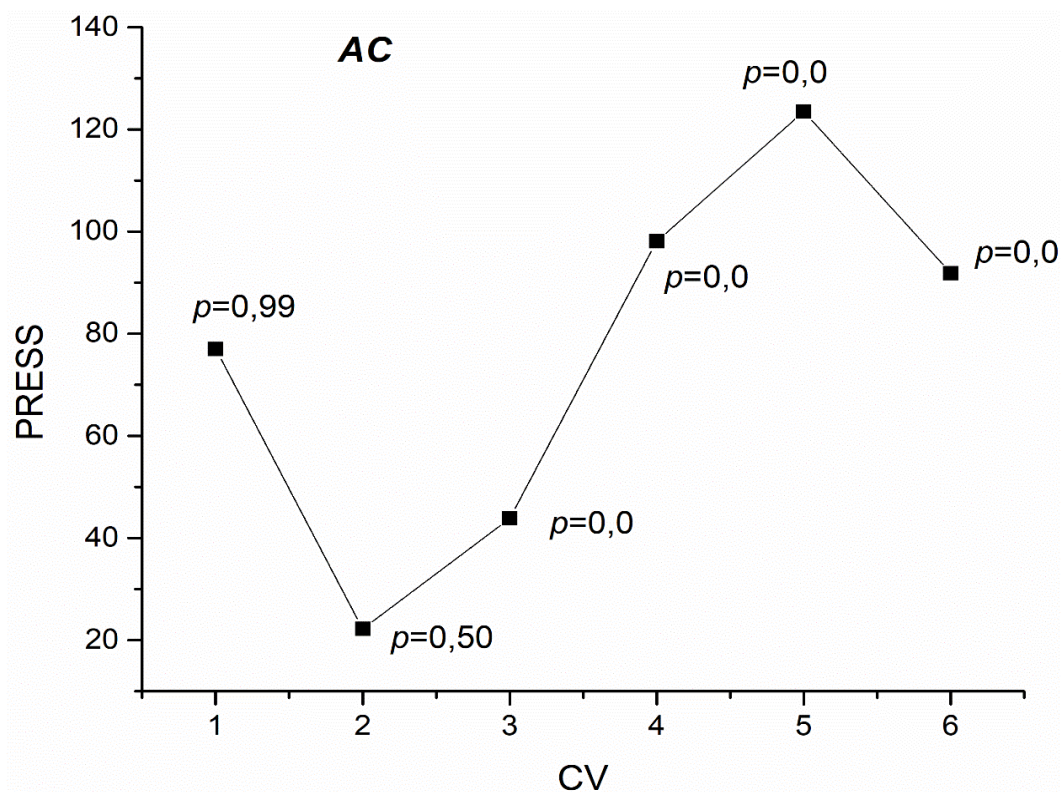
Dado que los algoritmos de PLS pueden modelar sistemas complejos sin sobre ajustar los datos de las concentraciones de los analitos en las muestras, es necesario seleccionar los factores óptimos, vectores de carga o variables latentes (CV).<sup>24</sup> Para los sistemas químicos estudiados en este trabajo, los vectores de carga de cada analito fueron seleccionados por validación cruzada (*leave-one-out*) en todos los casos, lo que incluye el sistema sin y con la adición poscolumna de HP $\beta$ CD. La forma correcta de calcular los vectores de carga es a partir de la PRESS para las concentraciones en todas las muestras de calibración.<sup>25,26</sup>

La figura IV.9 muestra los valores de PRESS obtenido por la matriz de calibración de los cromatogramas de AC sin HP $\beta$ CD frente a CV, junto con el valor  $p$  para cada número de factores. El CV de este analito fue el primer valor PRESS cuya probabilidad de valor  $p$  cae por debajo de 0,75. De esta misma forma se determinó el CV para CF, BC y CY en el sistema sin y con adición de HP $\beta$ CD. Estos valores se reportan en la tabla IV.9.



**Figura IV 8.** Cromatogramas originales a.1; b.2; c.3 y cromatogramas alineados por tiempos de retención para aplicar en el algoritmo de PLS.





**Figura IV.9.** Gráfico de PRESS en función del número de variables latentes para AC.

## 2.6. Parámetros analíticos y cifras de mérito en ausencia y presencia de hidroxipropil-β-ciclodextrina en el derivatizador poscolumna

Haciendo uso de los sets de calibrado y predicción se obtuvieron los parámetros analíticos para el método analítico desarrollado en ausencia y en presencia de HPβCD que se reportan en la tabla IV.5

La media cuadrática del error de predicción (RMSEP) como medida de la variación entre el valor de concentración nominal y el predicho en la solución incógnita nos brinda un estimado del valor de incertidumbre y sesgo en la predicción.

Los errores relativos de predicción (REP %) fueron  $\leq 6\%$ , estos valores son bajos exponiendo un método altamente preciso en la cuantificación, considerando especialmente el fuerte solapamiento de las señales de CF y BC.

**Tabla IV.5.** Parámetros analíticos y cifras de mérito en ausencia y presencia de hidroxipropil-β-ciclodextrina para aminocarb, bendiocarb, carbofuran y carbaryl por cuadrados mínimos parciales.

Parámetro	Analitos				Analitos-HPβCD			
	AC	CF	BC	CY	AC	CF	BC	CY
<b>CV</b>	2	1	2	1	2	2	2	1
<b>RMSEP<sup>a</sup></b>	1,17	0,58	3,78	0,009	0,88	1,19	7,02	0,008
<b>REP%<sup>b</sup></b>	4,26	2,41	3,67	2,33	3,60	4,89	6,15	2,05
<b>R<sup>2</sup></b>	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99
<b>SEN. Ana</b>	34,43	21,64	1,19	3,15 10 <sup>3</sup>	66,33	52,17	2,96	3,59 10 <sup>3</sup>
<b>LOD<sup>c</sup><sub>min</sub></b>	21,35	37,98	0,66 <sup>d</sup>	2,35	11,29	19,58	0,27 <sup>d</sup>	2,35
<b>LOD<sup>c</sup><sub>max</sub></b>	24,03	38,40	0,77 <sup>d</sup>	2,41	12,83	28,34	0,31 <sup>d</sup>	2,37
<b>LOQ<sup>c</sup><sub>min</sub></b>	64,05	113,94	1,98 <sup>d</sup>	7,05	33,87	58,74	0,81 <sup>d</sup>	7,05
<b>LOQ<sup>c</sup><sub>max</sub></b>	72,09	115,50	2,30 <sup>d</sup>	7,23	38,49	85,02	0,93 <sup>d</sup>	7,11

<sup>a</sup> RMSEP = Error cuadrático medio de predicción, <sup>b</sup> REP% = Error relativo de predicción, <sup>c</sup> (ng/mL) a menos que se indique, <sup>d</sup> (μg/mL).

Podemos observar como la sensibilidad analítica (*SEN. Ana*) de AC, CF y BC incrementa cuando se incorpora la HPβCD en el módulo poscolumna. Esto se debe a la formación de complejos supramoleculares entre los pesticidas y la HPβCD.<sup>2,6</sup> La sensibilidad analítica de CY, no presenta un cambio significativo, el incremento del rendimiento cuántico de fluorescencia ( $\phi_{\text{complejo}}/\phi_{\text{libre}}$ ) es muy bajo (1,15), producto del efecto del solvente orgánico en la fase móvil en la formación del complejo.<sup>6</sup>

Este incremento en la sensibilidad está acompañado por una disminución en los LOD y LOQ. Para el modelo PLS se recomienda el reporte de un intervalo en el valor de LOD y LOQ, la forma correcta es indicar LOD<sub>min</sub>–LOD<sub>max</sub> y LOQ<sub>min</sub>–LOQ<sub>max</sub>.<sup>27,20,28</sup> Los valores de LOD y LOQ para el sistema sin y con adición de HPβCD fueron del orden de los ng/mL, a excepción del obtenido para BC, el cual es del orden de los μg/mL. Esto es a causa del bajo  $\phi_{\text{BC}}$  comparado con el de los demás pesticidas, lo que hizo necesario el uso niveles de concentración altos en el set de calibrado, como se mostró en la tabla IV.4.

Distintos métodos para la detección y cuantificación de pesticidas como propoxur en muestra de fluidos biológicos posmortem se han desarrollado mediante HPLC equipado con un detector de UV–visible, en este se hace

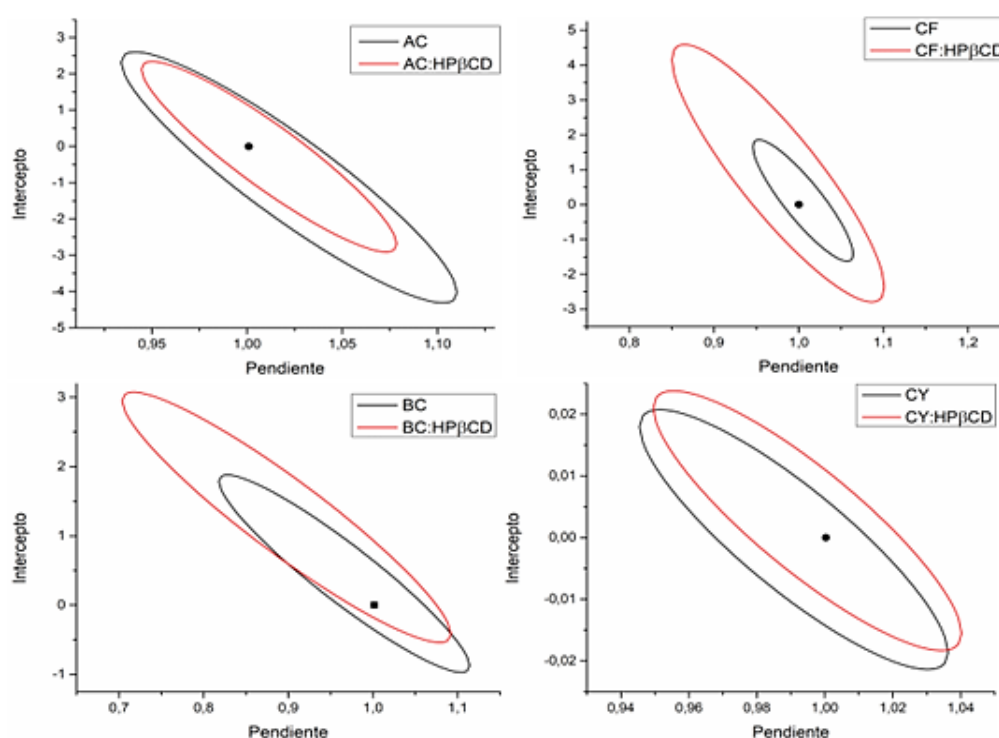
uso de una fase móvil acetonitrilo/H<sub>2</sub>O 40/60 (v/v) con flujo isocrático.<sup>7</sup> El CF y 3-hidroxicarbofuran se han determinado por HPLC con detector de arreglo de diodos (DAD) en matrices biológicas de diferentes animales, este método está configurado con un flujo de 1 mL/min en gradiente de acetonitrilo/agua a una temperatura de 30 °C.<sup>29</sup> Estas metodologías reportaron LOD del orden de los µg/mL.<sup>7,29</sup> Métodos indirectos donde se requieren altas temperaturas, o procedimientos con sucesivas reacciones de derivatización y que permiten obtener mejores fluoróforos, y en combinación con HPLC reportan LOD de 0,1 ng/mL.<sup>16</sup> También han reportado metodologías mediante calibración multivariada para la cuantificación de siete residuos de pesticidas en vegetales usando cromatografía líquida con DAD con LOD del orden de los µg/mL.<sup>30</sup> Métodos de análisis para la detección y cuantificación individual de CY, CF, BC y PC en muestras de fruta y agua mediante la interacción supramolecular con HPβCD y usando espectroscopia fluorescente indicaron LOD de ng/mL para CF y CY, y µg/mL para BC, analitos que hacen parte de la mezcla de interés en este trabajo de tesis.<sup>2,21</sup>

En cuanto a sistemas basados en calibración multivariada, se encuentran usando matrices de excitación-emisión de fluorescencia (EEM) y calibración multivariada como (PARAFAC), para el estudio de la mezcla de tres fungicidas han reportado LOD entre (1–20) ng/mL.<sup>31</sup> Metodologías basadas en mínimos cuadrados parciales desdoblados, acoplados a la bilinealización residual (U-PLS/RBL) para la determinación simultánea de carbendazim, carbaryl, clorothalonil (CHL) y tsumacida en muestras de agua ambiental con LOD de 1 a 30 ng/mL.<sup>32</sup> Un estudio usando cuadrados mínimos parciales de N-vías (N-PLS) y EEM para la detección de CHL y CY en muestras de agua reportaron LOD del orden de los ng/mL.<sup>33</sup>

El método analítico aquí desarrollado aprovecha la interacción supramolecular entre los pesticidas y la HPβCD para detectar bajas concentraciones de los analitos permitiendo su cuantificación simultánea en una mezcla compleja por HPLC y análisis PLS a temperaturas cercanas a las ambientales y reactivos de bajo costo.

## 2.7. Análisis de la región elíptica de confianza conjunta

El análisis de la región elíptica de confianza (EJCR por sus siglas en inglés), consiste en trazar sobre el eje de pendiente–intercepto una región en forma elipse con confianza del 95 % que se forma a partir de los valores de las concentraciones nominales y predichas de las muestras. Una vez construida la región se evalúa si el punto ideal de pendiente (1) e intercepto (0) está contenido en la elipse, lo que confirmaría que el modelo de calibración construido es exacto.



**Figura IV.10.** Gráficos de la región elíptica de confianza conjunta para los métodos desarrollados para aminocarb, carbofuran, bendiocarb y carbaryl en ausencia y presencia de hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina.

En la figura IV.10 se muestran los gráficos de la EJCR para los cuatro analitos en ausencia y presencia de HP $\beta$ CD. El punto ideal (1:0) se encuentra contenido en la región para los 8 casos estudiados, demostrando que los métodos desarrollados para la cuantificación de AC, CF, BC y CY en ausencia y presencia de HP $\beta$ CD son exactos.

## 2.8. Estudio de recuperación en muestras de agua de red

Las recuperaciones de los N-metilcarbamatos analizados se realizaron por triplicado, fortificando muestras que contenían el 5 % v/v de agua de red en agua milli-Q. Se prepararon tres niveles de concentración por cada pesticida, y los resultados del estudio de recuperación para los métodos desarrollados sin y con la adición poscolumna de la HP $\beta$ CD se presentan en la tabla IV.6 y tabla IV.7 respectivamente.

*Tabla IV.6. Promedio de recuperación de N-metilcarbamatos en muestras de agua de red para el sistema sin adición de HP $\beta$ CD.*

<i>Muestra</i>	<i>Analito</i>	<i>Adición (<math>\mu</math>M)</i>	<i>Recuperación (<math>\mu</math>M)<sup>a</sup></i>	<i>%R<sup>b</sup> (SD)<sup>c</sup></i>
<i>Agua de Red</i>	<i>AC</i>	0,49	0,49	100 (5)
		29,64	28,0	95 (1)
		48,61	45,70	94,0 (0,1)
	<i>CF</i>	0,83	0,84	102 (0,1)
		21,60	21,0	97 (1)
		51,21	47	91 (5)
	<i>BC</i>	20,88	22,2	106 (3)
		95,63	94	98 (3)
		191,26	189,9	91 (7)
	<i>CY</i>	0,041	0,037	91 (7)
		0,52	0,52	100 (5)
		1,10	1,07	97 (3)

<sup>a</sup> Promedio de triplicado; <sup>b</sup> porcentaje de recuperación; <sup>c</sup> desviación estándar

**Tabla IV.7.** Promedio de recuperación de *N*-metilcarbamatos en muestras de agua de red para el sistema con adición de HP $\beta$ CD.

<i>Muestra</i>	<i>Analito</i>	<i>Adición (<math>\mu</math>M)</i>	<i>Recuperación (<math>\mu</math>M)<sup>a</sup></i>	<i>%R<sup>b</sup> (SD)<sup>c</sup></i>
<i>Agua de Red</i>	<i>AC</i>	0,29	0,30	101 (4)
		32,64	29,5	90 (1)
		43,61	43	99 (3)
	<i>CF</i>	0,51	0,51	100 (2)
		25,60	24,4	96 (1)
		51,21	49,8	97 (1)
	<i>BC</i>	9,96	10,2	103 (1)
		95,63	96	101 (2)
		150,26	148,5	99 (0)
	<i>CY</i>	0,041	0,041	100 (10)
		0,52	0,52	100 (3)
		1,10	1,07	97 (1)

<sup>a</sup> Promedio de triplicado; <sup>b</sup> porcentaje de recuperación; <sup>c</sup> desviación estándar

Las recuperaciones para los cuatro plaguicidas utilizados en la fortificación de la muestra de agua potable fueron superiores al 90 % en cada uno de los tres niveles evaluados. Los valores de SD no superaron el 10 % para ambos métodos con y sin la adición poscolumna de HP $\beta$ CD. Los resultados obtenidos no mostraron un efecto matriz en ninguno de los dos métodos desarrollados.

Se aplicó el estadístico *t* de Student de dos colas con un nivel de confianza del 95% y un número de grados de libertad correspondiente a cada recuperación. El contraste entre los *t* experimentales y los *t* teóricos corroboró que las recuperaciones promedio de los triplicados en los tres (3) niveles de fortificado para cada analito con el método sin o con adición de HP $\beta$ CD no presentan diferencias significativas con el valor de concentración adicionada en cada muestra.

Los niveles máximos de concentración (MCL) especifican la concentración máxima permitida de un pesticida en una matriz, en este caso agua potable. Sin embargo, estos valores a menudo varían alrededor de 5 órdenes de magnitud según el país o la jurisdicción para los mismos compuestos.<sup>34</sup> Los MCL recomendados para los pesticidas carbamatos en agua potable van desde los 10 ng/mL a los 100 ng/mL, esto recomendado por las directrices canadienses de calidad del agua y la US-EPA, jurisdicciones utilizadas por Argentina como referencia;<sup>35</sup> aunque la Unión Europea (UE) enumera valores más bajos alrededor de 0,1–1 ng/mL. Las metodologías reportadas en el presente trabajo facilitan el análisis de muestras reales dentro de los MCL que permiten en algunos países.

Es importante destacar que los resultados expuestos en el capítulo III y capítulo IV ya fueron publicados en *Microchemical Journal* 169 (2021) 106550.





### 3. Conclusiones

El desarrollo analítico presentado en el presente capítulo muestra un método para la detección y cuantificación simultáneas de AC, CF, BC y CY, mediante la asociación de diferentes áreas de la química analítica.

El análisis de datos multivariado de primer orden utilizado mediante el algoritmo PLS permitió cuantificar con precisión CF y BC, aun cuando sus señales espectrales en HPLC presentaban una fuerte superposición.

Las interacciones supramoleculares entre pesticidas carbamatos y HP $\beta$ CD en un reactor poscolumna mejoraron las sensibilidades de los analitos evaluados por HPLC con detección fluorescente con la consecuente disminución de los LOD de AC, CF y BC. Los métodos analíticos desarrollados para los cuatro analitos con o sin adición de HP $\beta$ CD son exactos, esto basados en el análisis de la EJCR.

El estudio de recuperaciones en agua domiciliaria indica la veracidad y utilidad de las metodologías desarrolladas.

Teniendo en cuenta los métodos reportados en la literatura, se ha desarrollado una metodología directa a temperaturas cercanas al ambiente, de bajo costo que representan un método alternativo con LOD mejores que otros reportados dentro de MCL para algunas jurisdicciones.



## **4. Parte experimental**

Esta sección detalla toda la instrumentación y procedimientos experimentales utilizados en el desarrollo y obtención de los resultados que se presentaron en este capítulo.

### **4.1. Instrumentación**

Las consideraciones instrumentales para este capítulo se detallaron anteriormente en la sección experimental del capítulo III.

### **4.2. Reactivos y Procedimientos**

En este capítulo se hizo uso de los mismos reactivos del capítulo III.

#### **4.2.1. Determinación de absortividades molares**

Para la determinación de los  $\epsilon$  de los cuatro N-metilcarbamatos en estudio, se prepararon soluciones madre de cada uno en metano con concentraciones aproximadas de 487,70  $\mu\text{M}$  de AC, 318,57  $\mu\text{M}$  de CF, 248,91  $\mu\text{M}$  de BC y 19,82  $\mu\text{M}$  de CY. A partir de estas soluciones se prepararon por duplicado cinco niveles de concentración asegurando que cada una tuviera un contenido de metanol equivalente al 40 %.

### **4.2.2. Soluciones estándar y sets de calibrado y predicción**

Para preparar las soluciones estándar se disolvió el pesticida inicialmente en un volumen de metanol equivalente al 35 % al volumen total de la solución a preparar, finalmente eran completadas con agua milli-Q.

Las muestras de los sets de calibrado y predicción se prepararon en matraces aforados de 2 mL, se mezclaron alícuotas de las soluciones estándar asegurando la obtención de las concentraciones predeterminadas por el diseño elegido. Estas muestras se pasaron por filtros de jeringa PTFE (diámetro = 13 mm, poro = 0,22  $\mu\text{m}$ ; GVS) antes de ser inyectadas en el equipo de HPLC.

### **4.2.3. Condiciones cromatográficas**

Los cromatogramas fueron tomados con un flujo isocrático de 0,7 mL/min, la fase móvil constaba de una mezcla al 65 % de agua-metanol y la temperatura de la columna fue 35.0 °C. El derivatizador fue configurado con un flujo isocrático de 0,6 mL/min y una temperatura de 25 °C.

## 5. Bibliografía

1. Sánchez-Brunete C, Albero B, Tadeo JL. High-performance liquid chromatography multiresidue method for the determination of N-methyl carbamates in fruit and vegetable juices. *J Food Prot.* 2004;67(11):2565-2569.
2. Pacioni NL, Veglia A V. Determination of carbaryl and carbofuran in fruits and tap water by  $\beta$ -cyclodextrin enhanced fluorimetric method. *Anal Chim Acta.* 2003;488(2):193-202.
3. Montemurro M, Pinto L, Véras G, de Araújo Gomes A; Culzoni MJ; Ugulino de Araújo MC; Goicoechea Héctor C. Highly sensitive quantitation of pesticides in fruit juice samples by modeling four-way data gathered with high-performance liquid chromatography with fluorescence excitation-emission detection. *Talanta.* 2016;154:208-218.
4. Tien CJ, Lin MC, Chiu WH, Chen CS. Biodegradation of carbamate pesticides by natural river biofilms in different seasons and their effects on biofilm community structure. *Environ Pollut.* 2013;179:95-104.
5. Khodadoust S, Hadjmohammadi M. Determination of N-methylcarbamate insecticides in water samples using dispersive liquid-liquid microextraction and HPLC with the aid of experimental design and desirability function. *Anal Chim Acta.* 2011;699(1):113-119.
6. Pacioni NL, Bracamonte AG, Veglia A V. Comparative effect of cyclodextrin nanocavities versus organic solvents on the fluorescence of

- carbamate and indole compounds. *J Photochem Photobiol A Chem.* 2008;198(2-3):179-185.
7. Deshpande D, Srivastava A. Method validation for simultaneous determination of pesticide residues in post-mortem samples by high-performance liquid chromatography- ultraviolet method. *Eur J Forensic Sci.* 2016;3(3):1.
  8. Abad A, Moreno MJ, Pelegrí R, et al. Determination of carbaryl, carbofuran and methiocarb in cucumbers and strawberries by monoclonal enzyme immunoassays and high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. An analytical comparison. *J Chromatogr A.* 1999;833(1):3-12.
  9. Office USEPA. Measurement of N-methyl carbamoyloximes and N-methyl carbamates in water by direct aqueous injection HPLC with postcolumn derivatization. In: *Technical Support Center Office of Ground Water and Drinking Water U.S. Environmental Protection Agency Cincinnati, Ohio.* ; 2001:1-38.
  10. Mao X, Wan Y, Yan A, Shen M, Wei Y. Simultaneous determination of organophosphorus, organochlorine, pyrethroid and carbamate pesticides in Radix astragali by microwave-assisted extraction/dispersive-solid phase extraction coupled with GC-MS. *Talanta.* 2012;97:131-141.
  11. Yang EY, Shin HS. Trace level determinations of carbamate pesticides in surface water by gas chromatography-mass spectrometry after derivatization with 9-xanthidol. *J Chromatogr A.* 2013;1305:328-332.
  12. Gonçalves V, Hazarbassanov NQ, de Siqueira A, et al. Development and validation of carbofuran and 3-hydroxycarbofuran analysis by high-pressure liquid chromatography with diode array detector (HPLC-DAD) for forensic Veterinary Medicine. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci.* 2017;1065-1066:8-13.

13. Tarhan Í. A new and rapid analysis method for the most important herbal squalene source: Comparison of UV–visible, fluorescence, and FTIR techniques for the quantification of squalene in amaranth seed oil. *Microchem J.* 2021;168.
14. Padró JM, Osorio Grisales J, Arancibia JA, Olivieri AC, Castells CB. Scope of partial least-squares regression applied to the enantiomeric composition determination of ketoprofen from strongly overlapped chromatographic profiles. *J Sep Sci.* 2015;38(14):2423-2430.
15. Grisales JO, Arancibia JA, Castells CB, Olivieri AC. Determination of enantiomeric composition of ibuprofen in pharmaceutical formulations by partial least-squares regression of strongly overlapped chromatographic profiles. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci.* 2012;910:78-83.
16. Sundaram KMS, Curry J. High-performance liquid chromatographic method for the analysis of aminocarb, mexacarbate and some of their N-methylcarbamate metabolites by post-column derivatization with fluorescence detection. *J Chromatogr A.* 1994;672(1-2):117-124.
17. Booth DE. *Chemometrics: Data Analysis for the Laboratory and Chemical Plant.* Vol 46.; 2004.
18. Olivieri AC, Goicoechea HC. La calibración en química analítica. *UNL, St Fe, Argentina.* Published online 2007.
19. Haaland DM, Thomas E V. Partial least-squares methods for spectral analyses. 1. Relation to other quantitative calibration methods and the extraction of qualitative information. *Anal Chem.* 1988;60(11):1193-1202.
20. Allegrini F, Olivieri AC. IUPAC-consistent approach to the limit of detection in partial least-squares calibration. *Anal Chem.* 2014;86:7858-7866.
21. Pacioni NL, Veglia A V. Determination of poorly fluorescent carbamate

- pesticides in water, bendiocarb and promecarb, using cyclodextrin nanocavities and related media. *Anal Chim Acta*. 2007;583(1):63-71.
22. Barrado E, Vega M, Pardo R, Grande P, Del Valle JL. Optimisation of a purification method for metal-containing wastewater by use of a Taguchi experimental design. *Water Res*. 1996;30(10):2309-2314.
  23. Banerjee S, Poria S, Sutradhar G, Sahoo P. Design of experiments analysis of friction behavior of Mg-WC nano-composites using taguchi methodology. *Mater Today Proc*. 2019;18:4026-4033.
  24. Allegrini F, Olivieri AC. An integrated approach to the simultaneous selection of variables, mathematical pre-processing and calibration samples in partial least-squares multivariate calibration. *Talanta*. 2013;115:755-760.
  25. Khajehsharifi H, Pourbasheer E, Tavallali H, Sarvi S, Sadeghi M. The comparison of partial least squares and principal component regression in simultaneous spectrophotometric determination of ascorbic acid, dopamine and uric acid in real samples. *Arab J Chem*. 2017;10:S3451-S3458.
  26. Mehmood T, Liland KH, Snipen L, Sæbø S. A review of variable selection methods in Partial Least Squares Regression. *Chemom Intell Lab Syst*. 2012;118:62-69.
  27. Olivieri AC. Practical guidelines for reporting results in single- and multi-component analytical calibration: A tutorial. *Anal Chim Acta*. 2015;868:10-22.
  28. Olivieri AC. Analytical figures of merit: From univariate to multiway calibration. *Chem Rev*. 2014;114(10):5358-5378.
  29. Gonçalves V, Hazarbassanov NQ, de Siqueira A, et al. Development and



- validation of carbofuran and 3-hydroxycarbofuran analysis by high-pressure liquid chromatography with diode array detector (HPLC-DAD) for forensic Veterinary Medicine. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci.* 2017;1065-1066(August):8-13.
30. Sousa ES, Schneider MP, Pinto L, de Araujo MCU, de Araújo Gomes A. Chromatographic quantification of seven pesticide residues in vegetable: Univariate and multiway calibration comparison. *Microchem J.* 2020;152:104301.
  31. Rodríguez-Cuesta MJ, Boqué R, Rius FX, Picón Zamora D, Martínez Galera M, Garrido Frenich A. Determination of carbendazim, fuberidazole and thiabendazole by three-dimensional excitation-emission matrix fluorescence and parallel factor analysis. *Anal Chim Acta.* 2003;491(1):47-56.
  32. Yuan YY, Wang ST, Liu SY, Cheng Q, Wang ZF, Kong DM. Green approach for simultaneous determination of multi-pesticide residue in environmental water samples using excitation-emission matrix fluorescence and multivariate calibration. *Spectrochim Acta - Part A Mol Biomol Spectrosc.* 2020;228:117801.
  33. Guo Z, Liu C, Yang R, et al. Detection of pesticide in water using two-dimensional fluorescence correlation spectroscopy and N-way partial least squares. *Spectrochim Acta - Part A Mol Biomol Spectrosc.* 2020;229:117981.
  34. Li Z, Jennings A. Global variations in pesticide regulations and health risk assessment of maximum concentration levels in drinking water. *J Environ Manage.* 2018;212:384-394.
  35. Valores Guía de residuos de plaguicidas en agua potable. Accessed April 7, 2021. <https://www.orooverdeservicios.com.ar/2018/11/09/valores-guia-de-residuos-de-plaguicidas-en-agua-potable/>



# CAPÍTULO V

---

**Fluorescencia sincrónica, química supramolecular y cuadrados mínimos parciales, un trabajo en conjunto para cuantificar la mezcla binaria de 3-metilindol y melatonina en muestras de orina**

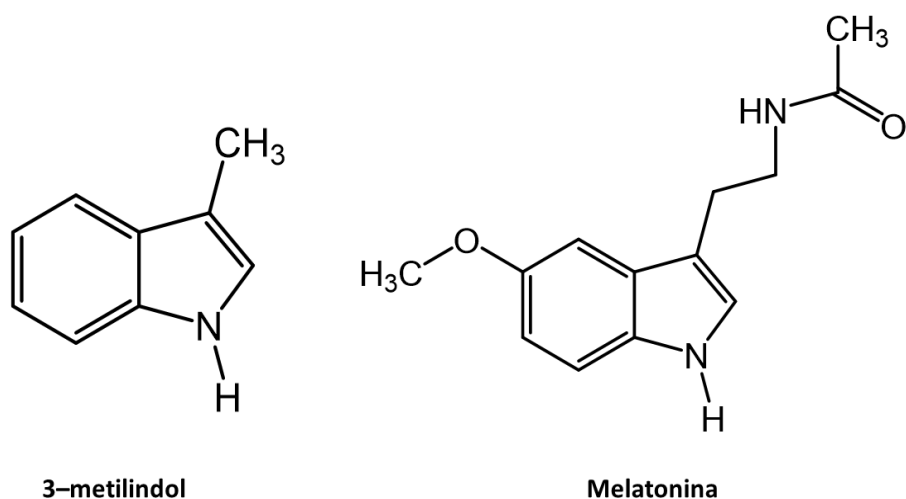
---



# 1. Introducción

El desarrollo de métodos analíticos para la identificación y cuantificación de mezclas de analitos en matrices complejas es uno de los desafíos más complejos en la química analítica. En este capítulo se muestra como la integración de tres metodologías analíticas como la fluorescencia sincrónica (FS), química supramolecular (QS) y calibración multivariada de primer orden mediante PLS permitieron desarrollar un método analítico para la cuantificación simultánea de 3MI y melatonina M en muestras de orina. Las estructuras de los dos analitos se muestran en la figura V.1.

Generalmente, las metodologías analíticas se desarrollan para determinar estos metabolitos individualmente, lo que requiere su purificación en muestras complejas, generando grandes limitaciones a la hora de detectarlos y cuantificarlos. Actualmente se dispone de pocos métodos para el análisis simultáneo de esta clase de analitos, entre los que se encuentran la cromatografía líquida acoplada a la espectrometría de masas,<sup>1</sup> la cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas,<sup>2,3</sup> la derivatización espectrofotométrica de paso por cero, la espectrofluorimetría con extracción previa de disolventes,<sup>4</sup> y la electroforesis capilar con detección electroquímica.<sup>5</sup> Estos métodos consumen mucho tiempo, requieren instrumentos complejos y costosos o, en algunos casos (métodos derivados), tienen baja sensibilidad.



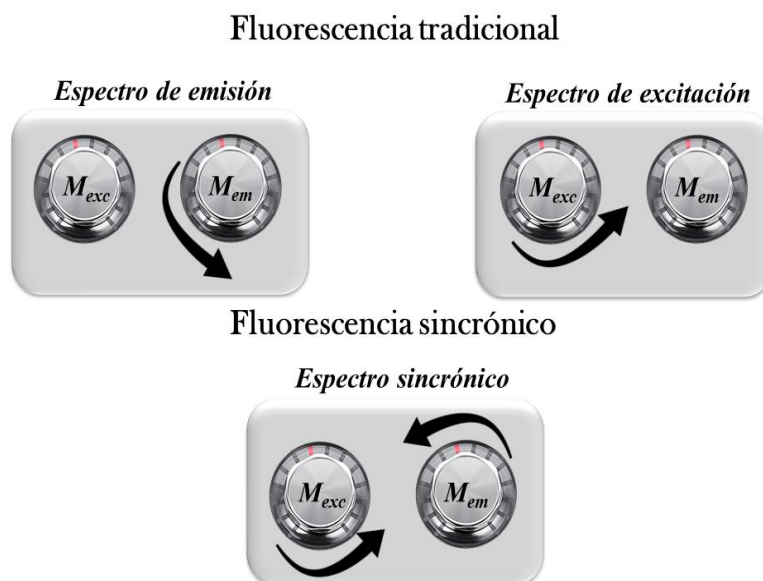
*Figura V.1. Estructura química del 3-metilindol y melatonina*

Se han reportado técnicas que involucran la determinación de algunos de estos analitos en mezclas por espectrofotometría, espectrofluorimetría y calibración multivariada,<sup>6</sup> además se han desarrollado nuevos métodos para el análisis de estos analitos utilizando plataformas modificadas y detección electroquímica.<sup>7</sup> Métodos que se detallan y comparan más adelante en este capítulo.

## 1.1. Fluorescencia sincrónica

El análisis de FS consiste en la obtención de espectros de fluorescencia mediante un barrido simultáneo de los monocromadores de excitación y emisión de un espectrofluorímetro con un intervalo constante entre la longitud de onda de excitación y la longitud de onda de emisión ( $\Delta\lambda$ ) como se muestra en la figura V.2. En los espectros de FS se mantiene la sensibilidad asociada a la fluorescencia del fluoróforo al tiempo que se obtienen varias ventajas como disminución en el tiempo de análisis de muestras multicomponentes, el estrechamiento de la bandas espectrales, aumento en la selectividad, conduce a una simplificación de los espectros y a una reducción o resolución en algunos casos de la superposición

espectral.<sup>8,9</sup> La ecuación V.1 representa la relación correspondiente a un espectro de fluorescencia sincrónica.



**Figura V.2.** Esquema ilustrativo de la variación de los monocromadores en la fluorescencia tradicional y fluorescencia sincrónica

$$I_s(\lambda, \lambda') = KcdE_{exc}(\lambda')E_{em}(\lambda) \quad \text{ec.V.1}$$

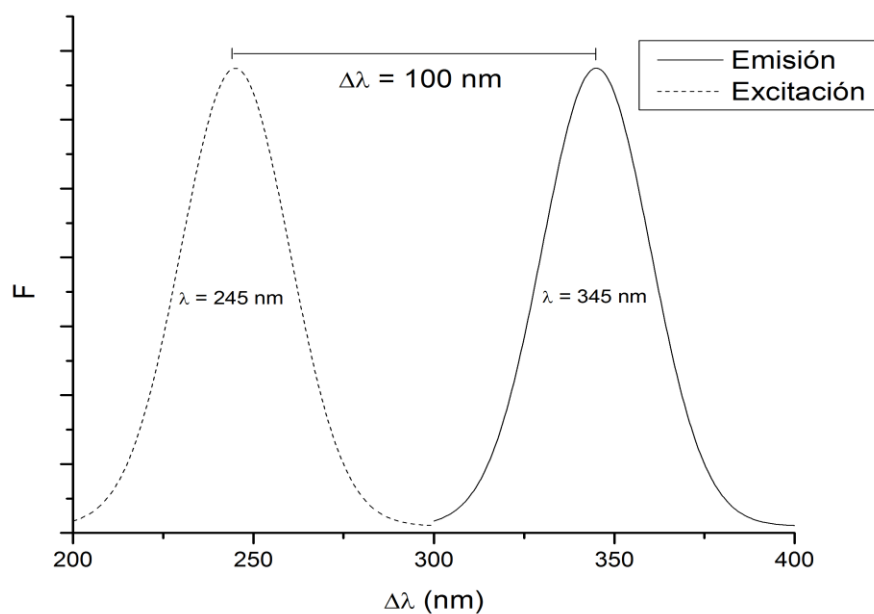
donde

$$\lambda = \lambda' + \Delta\lambda \quad \text{ec.V.2}$$

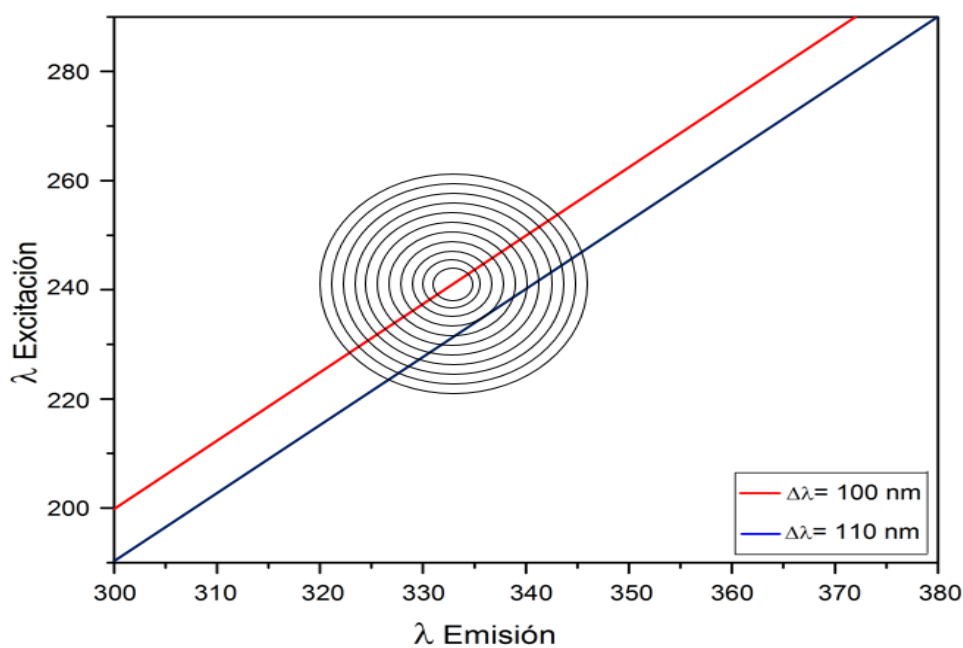
Donde  $I_s$  es la intensidad de luminiscencia sincrónica,  $\lambda$  y  $\lambda'$  son las longitudes de onda de emisión y excitación respectivamente,  $K$  es un factor constante,  $d$  es el paso óptico de la cubeta y  $E_{exc}$  y  $E_{em}$  son los espectros de fluorescencia de excitación y emisión. La FS es más sensible que la fluorescencia convencional dado que involucra en su obtención dos funciones de onda como se indica en la ecuación V.1. La selectividad de esta técnica también se ve favorecida gracias al parámetro  $\Delta\lambda$ , el cual puede ser manipulado por el analista.<sup>9</sup>

En la figura V.3 se muestra la forma más sencilla de elegir el valor de  $\Delta\lambda$ , la misma consiste en determinar el desplazamiento de Stokes entre el máximo del espectro de excitación y el máximo del espectro de emisión. Esto permite obtener un espectro con un ángulo de  $45^\circ$  sobre la superficie

espectral de fluorescencia del analito, que pasa por su máximo valor de intensidad, por lo tanto, el variar el  $\Delta\lambda$  permite modificar el camino sincrónico como se muestra en la figura V.4.



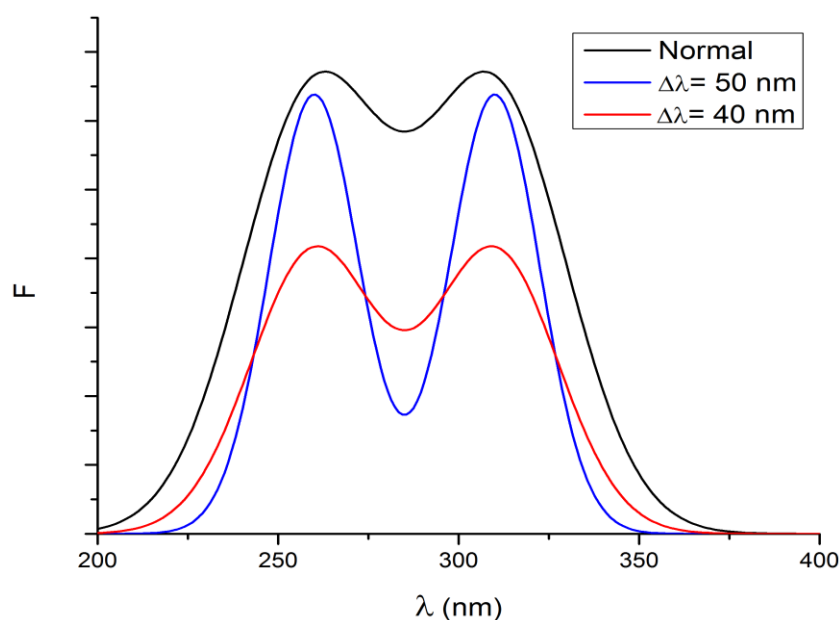
**Figura V.3.** Selección del intervalo constante entre la longitud de onda de excitación y la longitud de onda de emisión en fluorescencia sincrónica.



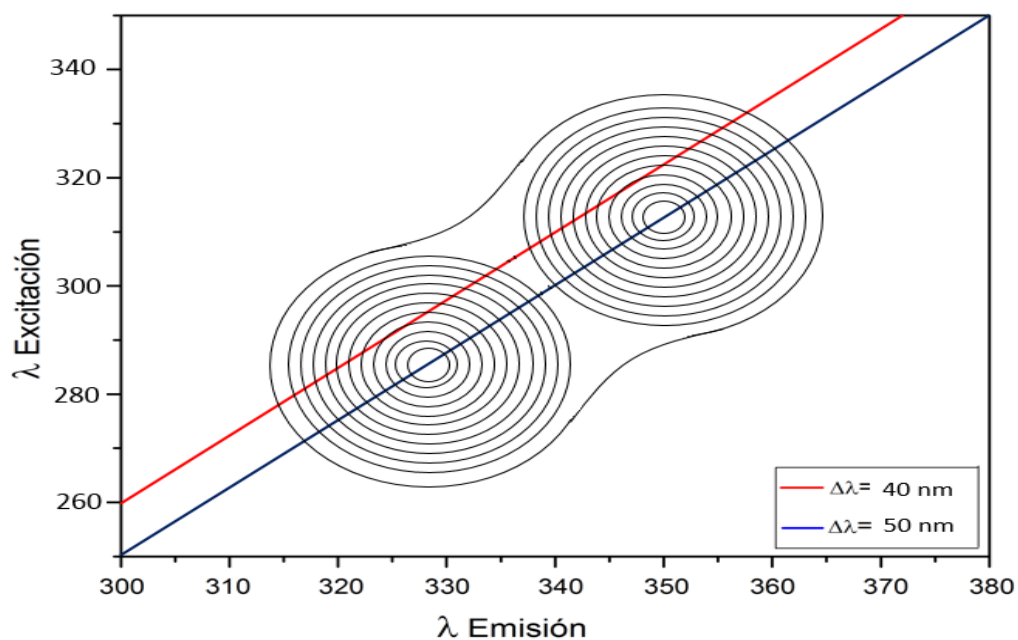
**Figura V.4.** Dependencia del camino sincrónico con el intervalo constante entre la longitud de onda de excitación y la longitud de onda de emisión



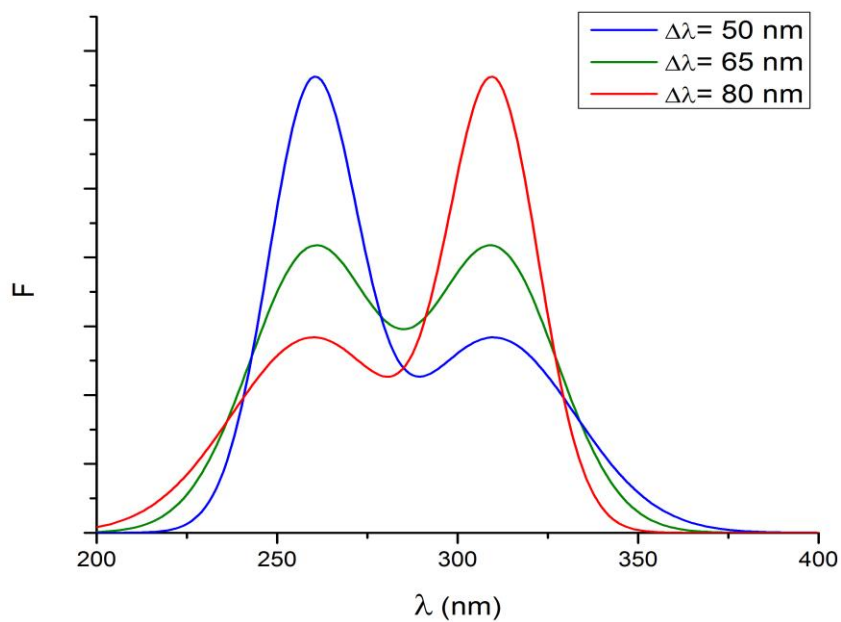
A la hora de evaluar soluciones en una mezcla binaria se pueden presentar dos posibles escenarios: el primero donde el  $\Delta\lambda$  de ambos analitos es igual, en este caso los espectros sincrónicos al  $\Delta\lambda$  óptimo pasan por el máximo de emisión de ambos analitos y son más finos que el espectro de fluorescencia convencional como se muestra en la figura V.5, un cambio de  $\Delta\lambda$  puede modificar la sensibilidad de la medida al cambiar el camino de FS sobre la superficie espectral, tal y como se puede ver en figura V.6.



**Figura V.5.** Diferencia entre espectro de fluorescencia tradicional y fluorescencia sincrónica de una mezcla binaria con mismo corrimiento de stokes



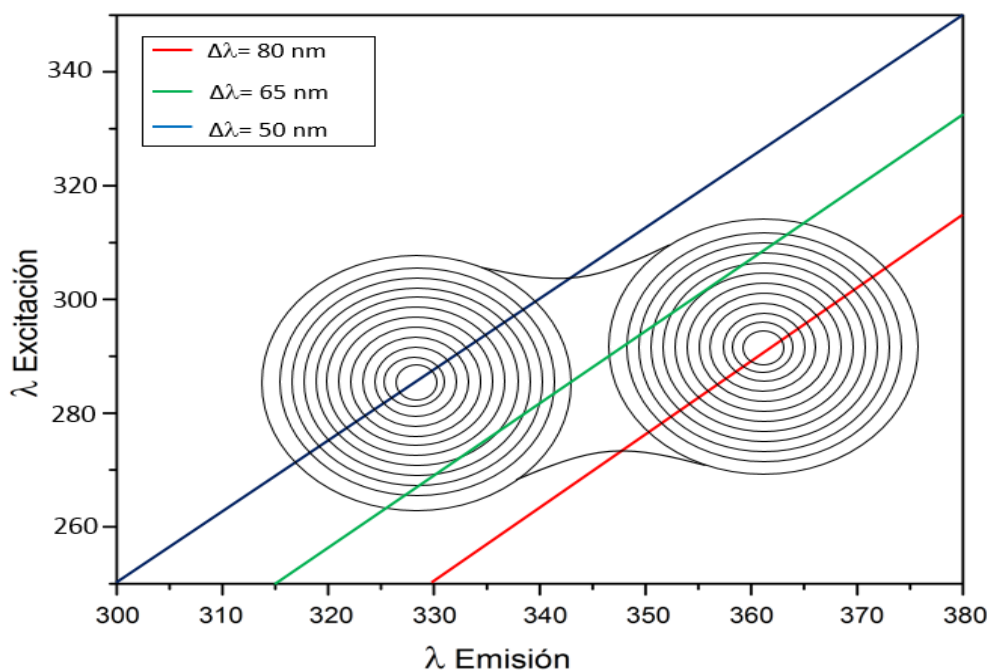
**Figura V.6.** Camino sincrónico en una mezcla binaria con mismo corrimiento de stokes



**Figura V.7.** Espectros de fluorescencia sincrónica de una mezcla binaria con diferente corrimiento de stokes

El segundo escenario presenta un sistema con dos analitos que poseen  $\Delta\lambda$  distintos, por lo que al variar este parámetro se puede aumentar la selectividad y sensibilidad del analito deseado como se muestra en la figura

V.7, este producto del paso del camino sincrónico por el máximo de intensidad del analito de interés como se observa en la figura V.8.



**Figura V.8.** Camino sincrónico en una mezcla binaria con distinto corrimiento de Stokes

Estas técnicas están siendo altamente utilizadas para el análisis de diferentes analitos en mezcla. Algunos ejemplos de esto son la implementación de fluorescencia sincrónica para el estudio de la adulteración del tahini (pasta elaborada con semillas de sésamo molido, también conocida como ajonjolí), método consiste en la adquisición de datos sincrónicos de segundo orden para su tratamiento por diferentes métodos de calibración multivariada.<sup>10</sup> Se han desarrollado métodos por FS para la cuantificación de diferentes especies de aceite crudo en diferentes muestras de petróleo crudo.<sup>11</sup> Se reporta el desarrollo de un método para la determinación simultánea de difenilamina (DPhA) y nitrosodifenilamina (NDPhA) por FS con un  $\Delta\lambda$  de 127,0 nm para el NDPhA y 75,0 nm para el DPhA,<sup>12</sup> entre otros.<sup>13,14,15</sup>

## 1.2. Cuadrados mínimos parciales PLS

Mediante métodos quimiométricos es posible tratar los datos experimentales adquiridos de tal manera que la contribución a la señal analítica de los componentes interferentes pueda eliminarse o al menos ser minimizada.

Esto puede realizarse haciendo uso de algoritmos de calibración tales como PLS, adicionalmente este algoritmo es ampliamente utilizado para resolver señales analíticas fuertemente solapadas.<sup>16,17</sup> Dentro de la literatura podemos citar un trabajo que hace uso de PLS para identificar y cuantificar derivados de indoles como la melatonina en presencia de otros fármacos en preparaciones farmacéuticas.<sup>6</sup>

Una de las ventajas de usar PLS es la posibilidad de construir curvas de calibración desde la muestra de orina, evitando la necesidad de considerar interferencias o de pretratar la mezcla y/o separar algún analito, como se ha reportado en desarrollos analíticos en muestras de orina.<sup>18</sup>

Asimismo, se han reportado trabajos en los que se combina PLS con fluorescencia sincrónica para cuantificar mezclas de fenol, resorcinol e hidroquinona en muestras de aire y la determinación de tahini adulterado en muestras de aceite.<sup>10,19</sup>

## 1.3. Química supramolecular de indoles

La formación de complejos supramoleculares entre diferentes especies químicas con receptores macrociclos tales como la HP $\beta$ CD, se han utilizado para desarrollar metodologías analíticas más sensibles, gracias a los efectos espectroscópicos que estos macrociclos generan en la fluorescencia nativa de los analitos.<sup>20,21,22</sup>

La interacción entre derivados indólicos como la triptamina, 5-metoxitriptamina, M, indolacético, 6-hidroximelatonina, 3MI, ácido 5-hidroxitriptamínico y la HP $\beta$ CD en medio acuoso genera en la gran mayoría

de los casos una exaltación de la señal de fluorescencia de los analitos. Este fenómeno se da producto del aumento de la relación de rendimientos cuánticos entre el complejo y el sustrato libre. Los estudios que reportan este comportamiento reportan un aumento de la sensibilidad del sistema, lo que permitió obtener mejores LOD.<sup>23,24,25,26</sup>

El sistema planteado en este estudio evaluó el efecto de la HP $\beta$ CD sobre la señal de FS de la mezcla de 3MI y M. Las ventajas de los complejos supramoleculares y de la FS ya han sido combinadas para desarrollar metodologías analíticas selectivas y sensibles.<sup>27</sup>

El desarrollo de sistemas de análisis para la cuantificación de derivados indólicos, es una práctica muy común debido a la importancia biológica de estos compuestos químicos, en nuestro laboratorio se ha diseñado una metodología para la cuantificación en mezcla binarias de diferentes pares de indoles mediante la primera derivada espectrofluorimétrica en presencia y ausencia de HP $\beta$ CD.<sup>23</sup> En este trabajo se estudiaron mezclas entre el 3MI, M, ácido 3-indolil acético (IA) y el 5-metoxi-3-(2-aminoetil) indol (5M), de éstas fue posible resolver en ausencia de HP $\beta$ CD los pares M + 5M con LOD de 5,8 ng/mL y 4,43 ng/mL respectivamente, y el par 3MI + IA con LOD de 32,8 ng/mL y 8,55 ng/mL respectivamente. Con respecto al sistema en presencia de HP $\beta$ CD se pudieron resolver los pares 5M + IA cuyos LOD se reportaron en 3,27 ng/mL y 4,97 ng/mL respectivamente, y 3MI + M con LOD de 3,08 ng/mL y 2,72 ng/mL respectivamente. En este sistema, la adición de la HP $\beta$ CD ayudó a poder cuantificar pares que en buffer no fue posible, esto producto de un cambio en los máximos de fluorescencia de las mezclas que contenían la HP $\beta$ CD.



## **2. Resultados y análisis**

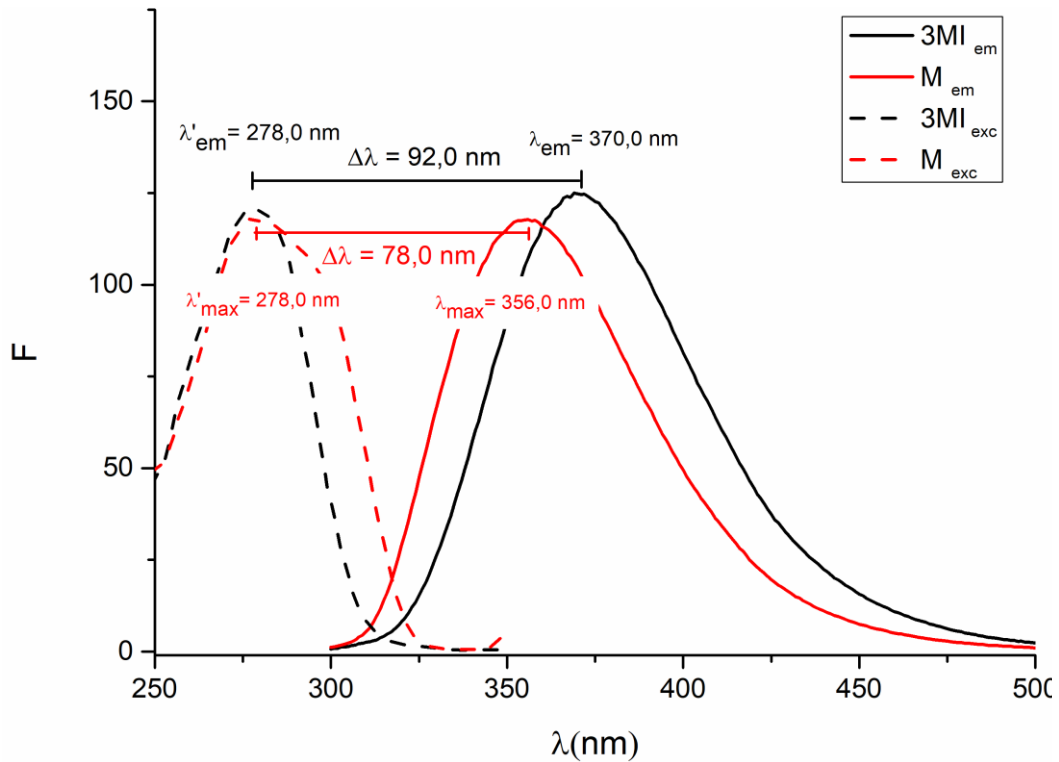
En la siguiente sección se muestran los resultados y consideraciones para el desarrollo de una metodología analítica para la cuantificación de una mezcla binaria de 3MI y M en muestras de orina mediante fluorescencia sincrónica, química supramolecular y PLS.

### **2.1. Características fluorescentes de los indoles en estudio**

#### **2.1.1. Espectros de excitación y emisión del 3–metilindol y melatonina**

Los espectros de excitación y emisión de fluorescencia de 3MI y M en tampón fosfato pH = 6,994 y  $\mu = 0,124$  M se muestran en la figura V.9. El 3MI y el M presentan una longitud de onda de excitación máxima ( $\lambda_{max}$ ) a 278,0 nm, sus espectros de emisión muestran máximos ( $\lambda'_{em}$ ) a 356,0 nm y 370,0 nm respectivamente. Como se puede observar, los perfiles espectroscópicos de los analitos muestran un alto solapamiento, lo que hace imposible su identificación y cuantificación en mezcla por fluorescencia convencional.

La fluorescencia sincrónica y el PLS1 son métodos que se han implementado para la cuantificación de diferentes analitos en mezclas con fuerte solapamiento espectral.<sup>10,13,17,19,28</sup>



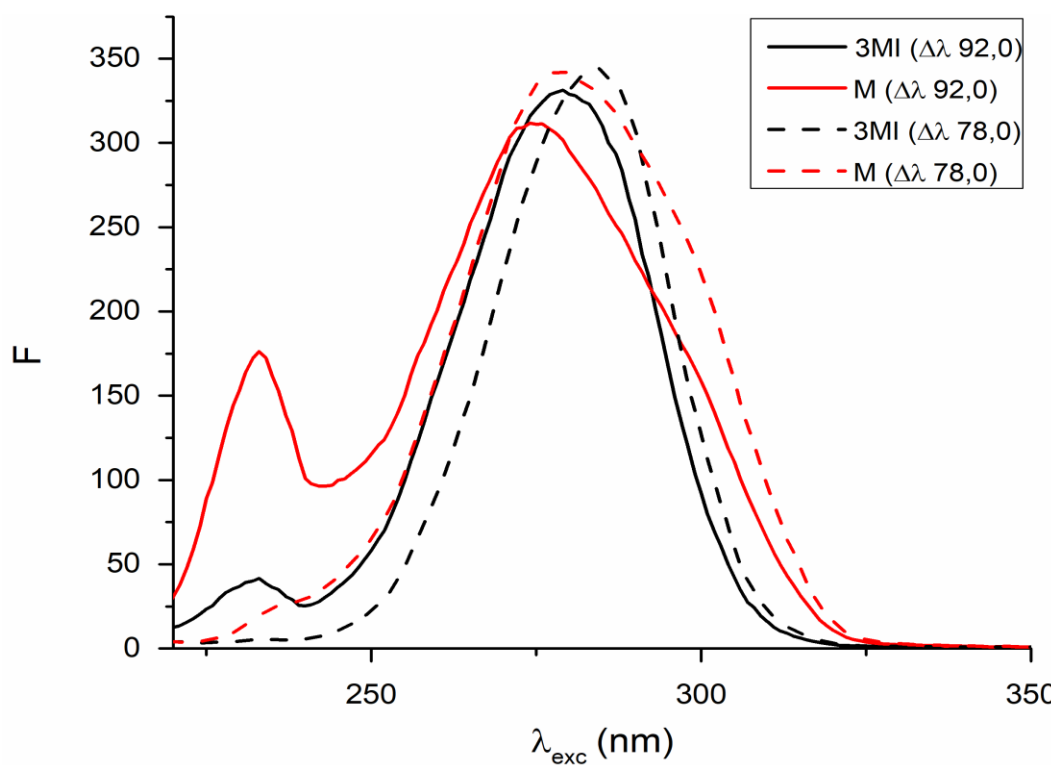
*Figura V 9. Espectros de emisión y excitación de 3-metilindol y melatonina*

### 2.1.2. Selección de desplazamiento de stokes

La elección de  $\Delta\lambda$ , es el factor más influyente a la hora de realizar un espectro sincrónico, la elección correcta de permite mejorar la sensibilidad, la resolución y las características del espectro.<sup>12</sup>

Una forma sencilla de elegir el  $\Delta\lambda$ , es tomar la diferencia entre ( $\lambda_{\max}$ ) y ( $\lambda'_{em}$ ). Inicialmente se realizaron los espectros sincrónicos de los analitos por separado, como se muestra en la figura V.10, los  $\Delta\lambda$  seleccionados fueron 92,0 nm y 77,0 nm, respectivamente para el 3MI y M.

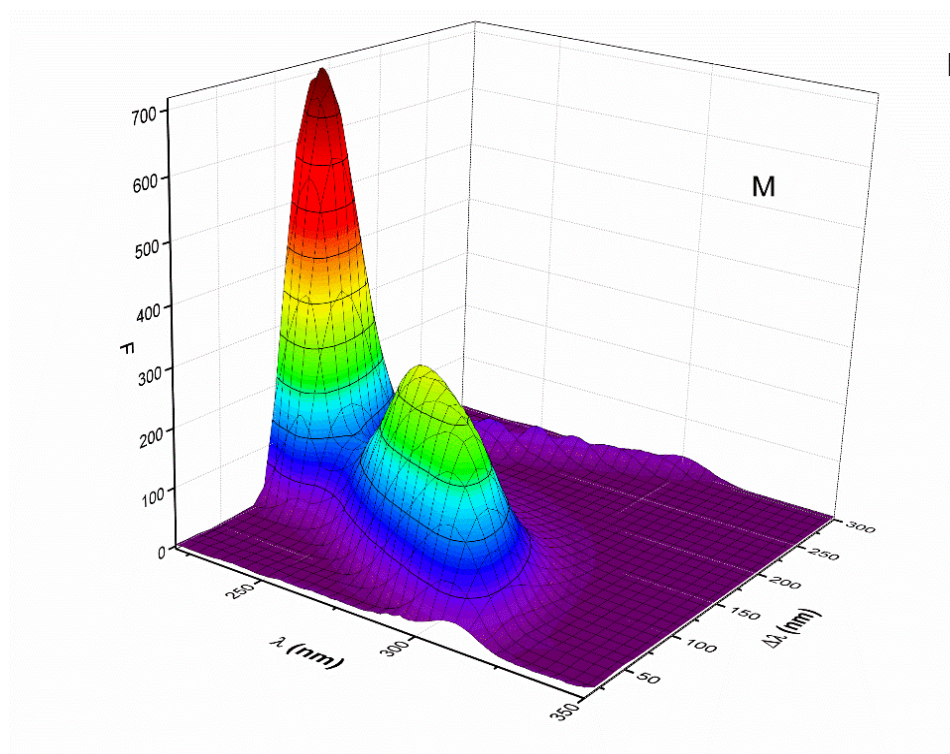
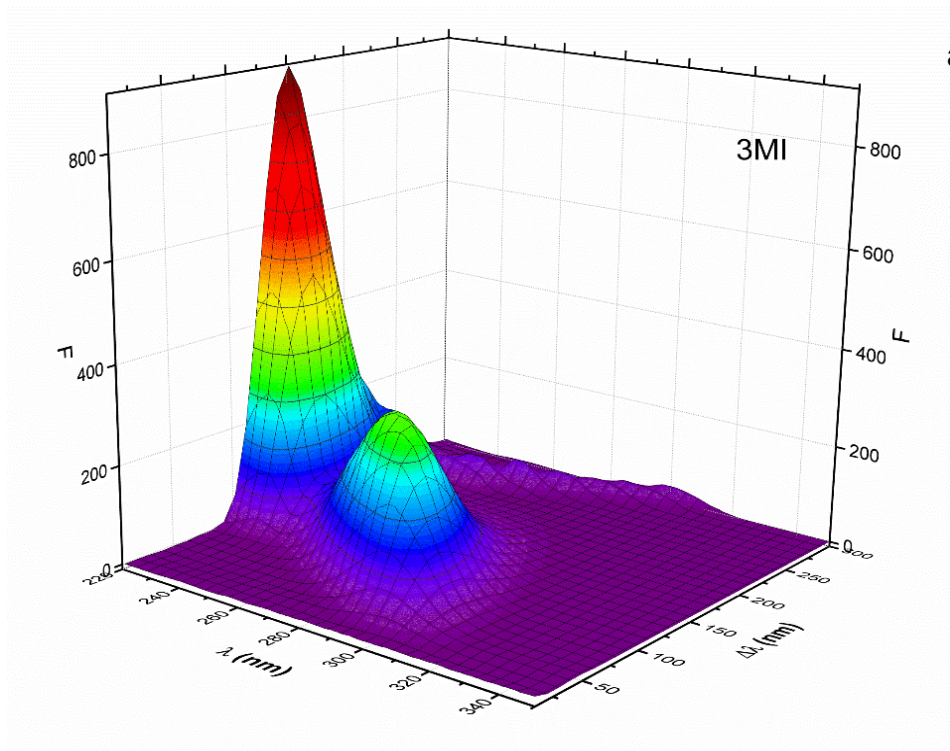




**Figura V.10.** Espectros de fluorescencia sincrónica de 3-metilindol y melatonina a  $\Delta\lambda$  78,0 nm and 92,0 nm

La figura V.10 muestra los espectros de fluorescencia sincrónica para 3MI y M en ambos  $\Delta\lambda$ , los espectros obtenidos siguen mostrando un gran solapamiento espectral, por lo que se realizó un espectro de fluorescencia sincrónica 3D para cada analito como se puede ver en la figura V.11 con el ánimo de encontrar el mejor  $\Delta\lambda$ .

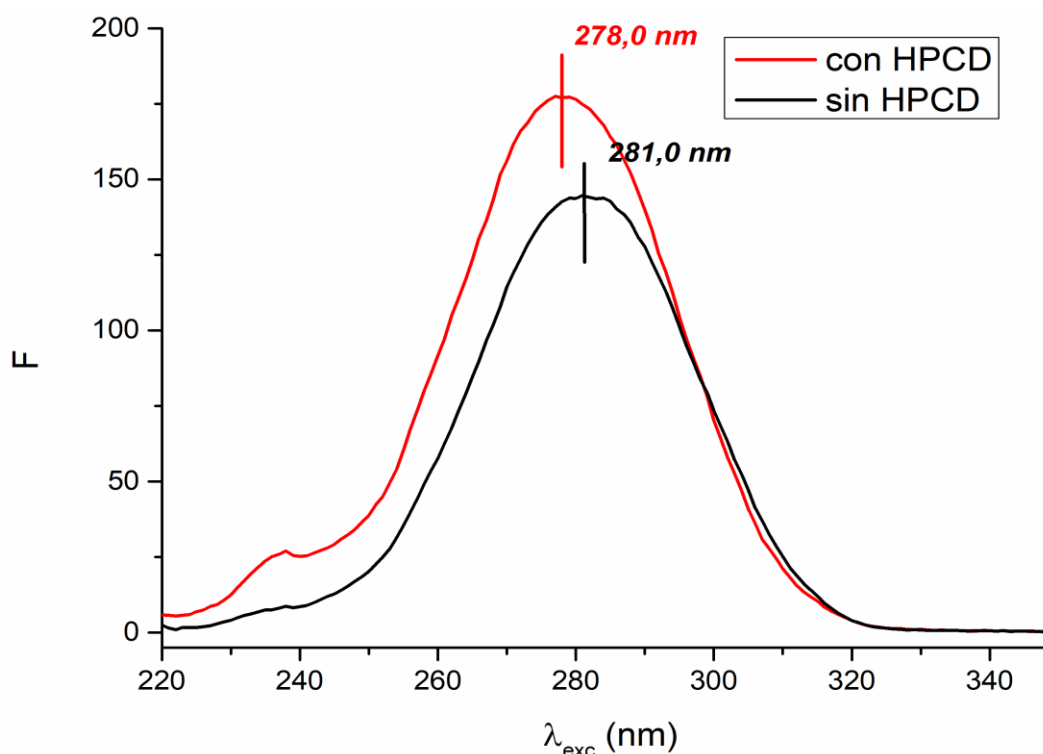
Los espectros 3D de fluorescencia sincrónica fueron configurados con  $\Delta\lambda$  entre 10,0 nm y 300,0 nm, el análisis de los espectros confirma que el mejor delta de trabajo es de 78,0 nm, en este valor se observa una banda a 235,0 nm propia de M, que ayuda a la selectividad del diseño analítico.



**Figura V.11.** Espectros de superficie sincrónica. **a)** 3–metilindol **b)** melatonina

## 2.2. Efecto de hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina sobre el espectro de fluorescencia sincrónica de la mezcla de 3-metilindol y melatonina

La figura V.12 muestra los espectros de fluorescencia sincrónica de la mezcla 3MI y M sin adición de HP $\beta$ CD en negro, y con la adición de HP $\beta$ CD en rojo. La adición de una concentración 10 mM de HP $\beta$ CD en las soluciones genera una exaltación de la fluorescencia sincrónica; lo anterior concuerda con lo informado previamente en nuestro laboratorio donde se determinaron las  $K_A$  de los analitos de interés y la HP $\beta$ CD, encontrándose éstas en el orden de  $10^2 \text{ M}^{-1}$ .<sup>23,24</sup> Así mismo se estudió el efecto del macrociclo en la fluorescencia convencional de 3MI y M, arrojando rendimientos cuánticos de 2,1 y 1,48.<sup>23,24</sup>



**Figura V 12.** Espectro de fluorescencia sincrónica de la mezcla de 3-metilindol y melatonina sin y con adición de hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina.

Además, se observa un desplazamiento hipsocrómico de 3,0 nm en el máximo de emisión de la mezcla, reforzando la hipótesis de la formación de un complejo entre los analitos y el macrociclo.

En cuanto a los derivados indólicos se reportan estudios entre la HP $\beta$ CD con la serotonina (5HT), y el ácido 5-hidroxitriptolilacético (5HTA), cuyos LOD pasaron de 0,90 ng/mL en buffer a 0,75 ng/mL en presencia de HP $\beta$ CD para el 5HTA a pH = 6,994; y de 0,550 ng/mL en ausencia de HP $\beta$ CD a 0,370 ng/mL en presencia de HP $\beta$ CD a pH = 2,000, denotando la importancia de la acidez en la interacción de especies que presentan grupos ionizables con el macrociclo.<sup>25</sup> Otro estudio demuestra como la interacción de la 6-hidroxitriptonina con la HP $\beta$ CD genera que el LOD de este derivado indólico pasara de 1,02 ng/mL en buffer a 0,71 ng/mL en presencia de HP $\beta$ CD.<sup>26</sup>

### **2.3. Selección de variables latentes**

Una ventaja del algoritmo PLS es su capacidad de modelar sistemas complejos sin sobre ajustar los datos de concentración. Para ello, es necesario seleccionar el número de CV óptimo para el modelo.<sup>29</sup> Otra ventaja es la posibilidad de seleccionar vectores de carga individualmente para cada analito de interés en el sistema. Así, para los sistemas químicos estudiados en este trabajo, los vectores de carga para cada analito fueron seleccionados por validación cruzada (*leave-one-out*), tanto para el sistema sin HP $\beta$ CD, como para aquel que contenía la HP $\beta$ CD. La forma correcta de calcular los vectores de carga es a partir de la PRESS para las concentraciones en todas las muestras de calibración.<sup>17,30</sup>

### **2.4. Set de calibrado y predicción**

Las concentraciones de 3MI y M en las mezclas preparadas para el test de calibración y predicción del método sin y con adición de HP $\beta$ CD se eligieron mediante el uso del diseño experimental de Taguchi (ver

capítulo IV, sección 2.3) los niveles de concentración para este trabajo se indican en la tabla V 1.

**Tabla V 1.** Concentraciones de 3-metilindol y melatonina en los sets de calibración y set de predicción para los sistemas sin y con adición de hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina

Set de calibrado ( $\mu M$ )			Set de predicción ( $\mu M$ )		
Set	3MI	M	Set	3MI	M
<b>C1</b>	0,475	0,486	<b>P1</b>	1,900	0,243
<b>C2</b>	1,900	0,486	<b>P2</b>	1,900	0,973
<b>C3</b>	1,900	0,000	<b>P3</b>	0,950	1,946
<b>C4</b>	1,900	1,946	<b>P4</b>	0,238	3,892
<b>C5</b>	0,475	1,946	<b>P5</b>	0,238	1,946
<b>C6</b>	0,000	0,486	<b>P6</b>	0,950	3,892
<b>C7</b>	3,800	1,946	<b>P7</b>	1,900	0,000
<b>C8</b>	3,800	0,486	<b>P8</b>	0,000	0,973
<b>C9</b>	0,475	3,892	<b>P9</b>	1,900	1,946
<b>C10</b>	0,000	0,000	<b>P10</b>	0,950	0,243
<b>C11</b>	3,800	0,000	<b>P11</b>	0,000	3,892
<b>C12</b>	0,000	1,946	<b>P12</b>	3,800	0,000
<b>C13</b>	0,475	0,000	<b>P13</b>	3,800	0,973
<b>C14</b>	3,800	3,892			
<b>C15</b>	0,000	3,892			
<b>C16</b>	1,900	3,892			
<b>C17</b>	1,900	1,946			
<b>C18</b>	1,900	1,946			

## 2.5. Parámetros analíticos

Los parámetros analíticos para los sistemas desarrollados en buffer y HP $\beta$ CD se muestran en la tabla V.2. El RMSEP es una medida de la variabilidad de la diferencia entre los valores predichos y los nominales para

un conjunto de muestras de prueba, de esta forma proporciona una idea de la incertidumbre y el sesgo de la predicción.

**Tabla V.2.** *Parámetros analíticos por cuadrados mínimos parciales para la mezcla de 3-metilindol y melatonina sin y con adición de HPβCD*

<b>Parámetros</b>	<b>Buffer</b>		<b>HPβCD</b>	
	<b>3MI</b>	<b>M</b>	<b>3MI</b>	<b>M</b>
<b>CV</b>	2	2	6	4
<b>RMSEP<sup>a</sup></b>	0,03	0,04	0,03	0,06
<b>SEN.Ana</b>	43,28	52,01	15,73	7,91
<b>LOD<sub>min</sub> (ng/mL)</b>	0,93	1,63	0,33	0,60
<b>LOD<sub>max</sub> (ng/mL)</b>	1,36	2,42	0,55	0,79

<sup>a</sup> RMSEP: Error cuadrático medio de predicción

Como se observa en la figura V 4, hay evidencia de un aumento en la señal de fluorescencia sincrónica debido al efecto de la HPβCD, este efecto se ve acompañado de una disminución de aproximadamente el 70 % de los valores del LOD para ambos analitos, valores que están en el rango de ng/mL. Es importante aclarar que para estos métodos de calibración se reporta un rango de LOD<sub>min</sub> y LOD<sub>max</sub>.<sup>31,32</sup>

En la tabla V.3 y tabla V.4 se presentan los parámetros analíticos sin y con adición de HPβCD en la matriz de 0,1 % v/v de orina sin pretratamiento/agua milli-Q y en la matriz al 1 % v/v de orina extraída en éter y retomada en metanol/agua milli-Q.

La presencia de la matriz de orina en la muestra genera que los LOD varíen con respecto a los determinados en ausencia de la matriz. No obstante, la adición de la HPβCD genera una mejora en los LOD con relación al sistema sin adición del macrociclo aún en presencia de la matriz de orina.

**Tabla V.3.** Parámetros analíticos por cuadrados mínimos parciales para la mezcla de 3-metilindol y melatonina sin y con adición de HPβCD en matriz de orina al 0,1 %

Parámetros	Buffer		HPβCD	
	3MI	M	3MI	M
CV	4	3	3	5
RMSEP <sup>a</sup>	0,11	0,03	0,11	0,03
SEN.Ana	7,81	43,79	23,44	48,32
LOD <sub>min</sub> (ng/mL)	1,77	1,63	1,02	1,79
LOD <sub>max</sub> (ng/mL)	2,95	6,11	1,01	4,30

<sup>a</sup> RMSEP: Error cuadrático medio de predicción

**Tabla V.4.** Parámetros analíticos por cuadrados mínimos parciales para la mezcla de 3-metilindol y melatonina sin y con adición de HPβCD en matriz al 1 % de orina extraída en éter y retomada en metanol.

Parámetros	Sin HPβCD		Con HPβCD	
	3MI	M	3MI	M
CV	3	3	5	5
RMSEP <sup>a</sup>	0,04	0,09	0,11	0,06
SEN.Ana	33,15	12,04	8,47	22,56
LOD <sub>min</sub> (ng/mL)	1,68	1,63	1,14	1,81
LOD <sub>max</sub> (ng/mL)	3,04	6,48	2,62	3,76

<sup>a</sup> RMSEP: Error cuadrático medio de predicción

La identificación y cuantificación de los niveles de 3MI y M en humanos es de gran interés debido a su estrecha relación con los trastornos del ritmo circadiano, y éste a su vez con diferentes patologías relacionadas con las alteraciones del sueño. Se ha planteado que la exposición a la luz artificial en turnos de trabajo nocturno afecta la producción de M, aumenta la probabilidad de sufrir de cáncer. Se han desarrollado estudios donde se evalúa la producción de este metabolito por 24 hs en pacientes con turnos de trabajo nocturnos y diurnos. Los niveles de M fueron medidos mediante test de ELISA, estos métodos se caracterizan por su sensibilidad, pero demandan equipamiento, reactivos y conocimiento específicos en inmunoensayos.<sup>33,34</sup>

Los métodos implementados para la determinación de este analito en diferentes fluidos corporales son bastante complejos, entre estos encontramos:

- ✚ La cromatografía líquida acoplada a un espectrómetro masa–masa (LC–MS/MS) donde se hace uso de una columna C<sub>18</sub> 2,1 mm x 50 mm 2,6 µm Kinetex, un gradiente lineal por 3 min de corrida pasando de 10 % a 100 % de metanol en la fase móvil y una detección mediante espectrometría de masa, reportando un LOD de 3,73 pmol/mL.
- ✚ Análisis electroquímicos donde se han fabricado películas copoliméricas de poli–melanina depositada sobre un electrodo. Este desarrollo reporta LOD = 660 ng/mL en muestras de orina humana.
- ✚ Se reportan desarrollos de plataformas electroquímicas impresas con grafito y barniz sobre papel adhesivo. Mediante procesos de oxidación de M se obtienen voltamperogramas que permiten conocer los valores de este metabolito en muestras biológicas y formulaciones farmacéuticas. Para este trabajo se reportan LOD de 255 ng/mL.<sup>7,35</sup>

Estos métodos requieren de procesos tecnológicos de alto control a diferencia del método presentado en esta tesis, así mismo se ve claramente que los LOD obtenidos por el método desarrollado son más bajos que los reportados en la literatura aquí citada.

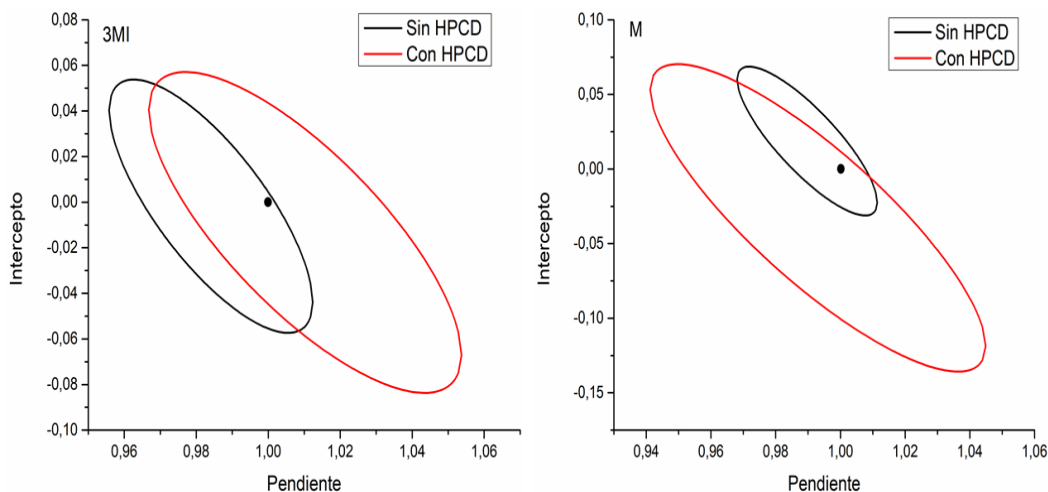
En cuanto al 3MI, se han validado métodos basados en:

- ✚ Cromatografía de masas para detectar este analito en matrices de orina de cerdo como una forma de evaluar patologías hepáticas. El método de análisis cromatográfico consiste en un flujo en gradiente de 0,6 mL/min y una fase móvil compuesta por metanol, agua y 10,0 mM de ácido acético. Este método reporta un LOD del orden de 20 ng/mL,<sup>1</sup> valor que es más alto que el reportado en este trabajo de tesis, siendo este último más sencillo metodológicamente y menos demandante energéticamente.



## 2.6. Análisis de la región elíptica de confianza conjunta

Los gráficos de la EJCR para 3MI y M sin HP $\beta$ CD y con la adición de HP $\beta$ CD se muestran en la figura V 5.



**Figura V 5.** Gráficos EJCR, análisis de punto ideal de la pendiente e intercepto para la detección y cuantificación de 3MI y M sin HP $\beta$ CD (elipse negra) y con la adición de HP $\beta$ CD (elipse roja).

La prueba EJCR permite mediante una inspección visual de los valores de la pendiente (1) y el intercepto (0) concluir que los métodos desarrollados son exactos con una precisión del 95 %.

## 2.7. Recuperación de 3MI y M en matrices fortificadas de orina humana

Las recuperaciones de los indoles analizados se realizaron fortificando por triplicado muestras que contenían 0,1 % de orina sin pretratamiento, y en muestras que contenían 1 % de orina extraída con éter y retomada en metanol de acuerdo al protocolo desarrollado en el laboratorio para indoles neutros.<sup>23,36</sup> El análisis se realizó en tres niveles de concentración para cada indol y las recuperaciones se presentan en las tablas V.5 y tabla V.6 para los métodos desarrollados sin y con adición de HP $\beta$ CD.

**Tabla V.5.** Recuperaciones promedio de 3-metilindol y melatonina en muestras al 0,1 % de orina sin pretratamiento con y sin adición de hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina

Muestra	Analito	Sin HP $\beta$ CD			Con HP $\beta$ CD		
		Adicionado ( $\mu$ M)	Recuperado ( $\mu$ M)	% R (SD)	Adicionado ( $\mu$ M)	Recuperado ( $\mu$ M)	% R (SD)
	3MI	0,80	0,79	99,5(0,9)	0,40	0,38	96 (6)
		1,50	1,46	97 (7)	1,50	1,51	100(1)
		5,00	5,07	101(4)	5,00	4,96	99 (3)
Orina 0,1 %	M	0,80	0,80	100 (2)	0,40	0,43	106(5)
		1,50	1,55	103 (2)	1,50	1,56	103(1)
		5,00	4,99	99 (1)	5,00	5,01	102(1)

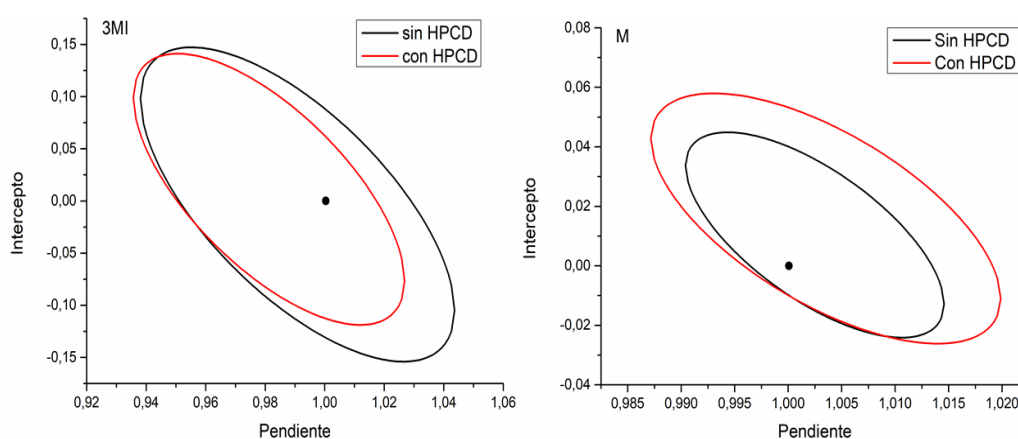
**Tabla V.6.** Recuperaciones promedio de 3-metilindol y melatonina con y sin adición de hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina en muestras al 1 % de orina extraída en éter y retomada en metanol

Muestra	Analito	Sin HP $\beta$ CD			Con HP $\beta$ CD		
		Adicionado ( $\mu$ M)	Recuperado ( $\mu$ M)	%R (SD)	Adicionado ( $\mu$ M)	Recuperado ( $\mu$ M)	%R (SD)
	3MI	0,80	0,81	101(1)	0,40	0,41	101(2)
		1,50	1,57	105(3)	1,50	1,61	107(2)
		5,00	5,04	101(3)	5,00	5,09	102(3)
Orina extraída	M	0,80	0,78	98(4)	0,40	0,40	100(8)
		1,50	1,55	103(1)	1,50	1,52	101(2)
		5,00	4,98	99,7(0,4)	5,00	5,00	100(1)

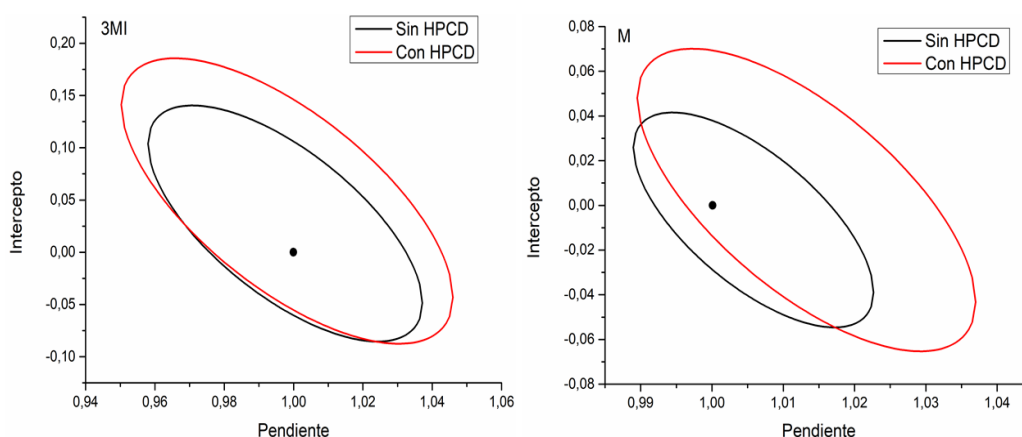
Todas las recuperaciones en las muestras fortificadas con los dos indoles tanto en la muestra al 0,1 % v/v de orina sin pretratamiento y en la muestra al 1 % de orina extraída en éter y retomada en metanol fueron superiores al 95 %. Los valores de SD no superan el 8 % para los métodos con y sin adición de HP $\beta$ CD. Los resultados obtenidos muestran un efecto matriz en los dos métodos desarrollados, generando un cambio en la sensibilidad de los sistemas y en la exactitud evaluada mediante el análisis de la EJCR. Este efecto hace necesario incluir la matriz de orina en los test de calibración, logrando así que el algoritmo de PLS modele los interferentes de la muestra.

## 2.8. Análisis de la región elíptica de confianza conjunta de 3-metilindol y melatonina en muestra reales

Las recuperaciones de los analitos por los métodos desarrollados en ambas muestras fortificadas se evaluaron mediante la región elíptica de confianza conjunta (EJCR).



**Figura V 6.** Gráficos región elíptica de confianza conjunta, análisis de punto ideal de la pendiente e intercepto para la detección y cuantificación de 3-metilindol y melatonina sin hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina (elipse negra) y con la adición de hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina (elipse roja) en matriz al 0,1 % v/v de orina sin pretratamiento.



**Figura V.7.** Gráficos región elíptica de confianza conjunta, análisis de punto ideal de la pendiente e intercepto para la detección y cuantificación de 3-metilindol y melatonina sin hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina (elipse negra) y con la adición de hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina (elipse roja) en matriz al 1 % v/v de orina extraída en éter y retomada en metanol.

El análisis visual de las figuras V.6 y figura V.7 concluye que los métodos desarrollados son exactos con una precisión del 95 % en ambas matrices.

Los valores normales de M varían a lo largo del día, oscilando en un adulto sano entre aproximadamente 100 pg/mL y 200 pg/mL en las horas de la tarde.<sup>37</sup> Cabe destacar que los niveles de M disminuyen desde la pubertad hasta la edad adulta en un 80 %, <sup>38</sup> por lo que el método desarrollado podría ser evaluado en estudios de control de M en niños púberes.

En cuanto al 3MI, aunque es un metabolito generado en el intestino, su estudio en orina puede ser útil a la hora de evaluar problemas de metabolización, como se ha demostrado en estudios realizados en cerdos.<sup>1</sup> Es por ello que poder cuantificar simultáneamente estos analitos genera un aporte de gran interés y puede ser evaluado como un potencial método de estudio en el campo de la salud.

### 3. Conclusiones

Se desarrolló un método para la detección y cuantificación simultánea de 3MI y M mediante la utilización de diferentes técnicas enfocadas en la resolución de muestras complejas, por la superposición de señales espectroscópicas de interés y la presencia de interferentes.

El uso combinado de técnicas como la FS, la cual ha demostrado tener gran utilidad a la hora de adquirir información específica y detallada de un analito junto con PLS, un algoritmo que permite en análisis de señales aun cuando presenten gran superposición, permitió desarrollar una metodología directa, selectiva y sensible para poder cuantificar estos analitos en una matriz tan compleja como la orina.

Las interacciones supramoleculares entre los indoles evaluados y la HP $\beta$ CD mejoraron las sensibilidades de los analitos, generando también la mejora del LOD de ambos analitos. Los métodos desarrollados con o sin HP $\beta$ CD son precisos en base al análisis de la EJCR.

Las recuperaciones en muestras al 0,1 % de orina sin pretratamiento y al 1 % de orina extraída en éter demuestran que el método desarrollado es exacto y preciso en muestras biológicas complejas. Estos métodos son sencillos y representan métodos alternativos con LOD adecuados para su evaluación en estudios de estos metabolitos.



## 4. Parte experimental

En esta sección se detalla toda la instrumentación utilizada y procedimientos experimentales aplicados en el desarrollo y obtención de los resultados que se presentaron en este capítulo.

### 4.1. Instrumentación

La preparación de las soluciones estándar utilizó un sonicador Arcano modelo PS-10A, con el fin de asistir la disolución de los analitos en el buffer.

El control del pH del buffer fosfato realizó con un pH-metro Thermo Orion modelo 520 A equipado con un electrodo Orion con sistema Ross. Previo a la primera medida del día el equipo era calibrado y verificado usando soluciones estándar de pH = 4,008 y pH = 6,994, las cuales se prepararon según lo reportado en la literatura.<sup>39</sup>

El control de las concentraciones en las soluciones estándar se realizó mediante espectros de absorción UV-visible, estas medidas se realizaron usando un espectrofotómetro Shimadzu 1800 de doble haz, equipado con un baño termostático con circulación Haake a 25,0 °C, en todos los experimentos se utilizaron celdas de cuarzo con paso óptico de 1 cm.

Los espectros de emisión de fluorescencia, excitación de fluorescencia y fluorescencia sincrónica se recolectaron en un espectrofluorímetro CARY Eclipse, con anchos de rendija de emisión y de excitación de 10,0 nm, una velocidad de barrido de 500,0 nm/min y una potencia de 435 v. El control de temperatura se realizó mediante el Single Peltier CARY conectado a la porta

celda; las celdas usadas para todas las medidas fueron de cuarzo y paso óptico de 1 cm.

Los datos adquiridos tanto para los espectros de absorbancia y fluorescencia se procesaron y graficaron mediante OriginPro 9.0.0 (64 bit) SR2 b87. En cuanto al procesado de datos por PLS se llevó a cabo mediante el programa MVC1, programado en MATLAB.

## **4.2. Reactivos y procedimientos**

Todos los reactivos empleados en este estudio fueron de grado analítico y se controlaron por UV-visible, 3MI marca (Sigma-Aldrich), M marca (ICN Biomedicals), y la HP $\beta$ CD tenía un grado de sustitución de 0,61 marca (Roquette). El agua MilliQ se obtuvo de un equipo Millipore y su resistividad  $\sim 18 \text{ M}\Omega \text{ cm}$  a  $25,0 \text{ }^\circ\text{C}$ . El buffer fosfato pH = 6,994 se preparó como se recomienda en la literatura.<sup>23</sup>

Se prepararon soluciones madre de M y 3MI en concentraciones del orden de  $10^{-4} \text{ M}$  en buffer fosfato pH = 6,994, la absorción de estas soluciones se controló con frecuencia para garantizar que no se descompusieran. Se obtuvieron soluciones estándar de M y 3MI del orden de  $10,0 \text{ }\mu\text{M}$  a partir de la dilución adecuada de las soluciones madre y se utilizaron para preparar las diferentes mezclas utilizadas en los test de calibración y predicción. La solución patrón de HP $\beta$ CD se preparó en buffer fosfato pH = 6,994.

Las mezclas para los test de calibración y predicción se diseñaron con Minitab 17 versión 1.0, aplicando un diseño experimental completo de 4 niveles y 3 puntos centrales, las mezclas se prepararon a partir de las soluciones estándar, y las concentraciones de trabajo de M y 3MI se controlaron por UV-visible para garantizar absorbancias  $<0,05$  con el fin de evitar el efecto de filtro interno.<sup>12</sup>



Los espectros de fluorescencia sincrónica se adquirieron en el rango de  $\lambda_{exc}$  entre (220,0–350,0) nm con una longitud de onda constante  $\Delta\lambda$  de 78,0 nm.

#### **4.2.1. Recuperación de 3–metilindol y melatonina en matrices fortificadas de orina humana**

Las pruebas de recuperación se realizaron en matrices de orina humana recolectada durante 24 h. Antes de la toma de la muestra, el paciente se sometió a una dieta para minimizar la posibilidad de falsos positivos en el ensayo. La muestra se utilizó al 0,1 % sin pretratamiento y al 1 % de orina extraída con éter y retomada en metanol.

Para obtener la matriz al 0,1 % se tomaron 100  $\mu$ L de la muestra de orina filtrada en un filtro de jeringa de PTFE y tamaño de poro de 0,22  $\mu$ m, esta alícuota fue aforada con buffer fosfato pH = 6,994 hasta 100 mL. En cuanto a la matriz al 1 %, se tomaron 2 mL de muestra de orina filtrada como se indicó anteriormente y se realizaron 3 extracciones sucesivas con 2 mL cada una de éter, posteriormente el éter fue evaporado y la muestra se retomó con metanol. De esta muestra se tomó 1 mL y se aforó a 100 mL con buffer fosfato pH = 6,994.

Se evaluaron tres niveles de fortificado por triplicado para cada muestra real, las mezclas se prepararon tomando alícuotas adecuadas de soluciones madre de cada analito.



## 5. Bibliografía

1. Brunius C, Vidanarachchi JK, Tomankova J, Lundström K, Andersson K, Zamaratskaia G. Skatole metabolites in urine as a biological marker of pigs with enhanced hepatic metabolism. *Animal*. 2016;10(10):1734-1740.
2. Nuñez-Vergara LJ, Squella JA, Sturm JC, Baez H, Camargo C. Simultaneous determination of melatonin and pyridoxine in tablets by gas chromatography-mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal*. 2001;26(5-6):929-938.
3. Ma Q, Li Y, Meng N, Wang J. Occurrence, impacts, and microbial transformation of 3-methylindole (skatole): A critical review. *Nano Energy*. Published online 2020:105526.
4. Abdine HH, Gazy AA, Abdel-Hay MH. Simultaneous determination of melatonin-pyridoxine combination in tablets by zero-crossing derivative spectrophotometry and spectrofluorimetry. *J Pharm Biomed Anal*. 1998;17(3):379-386.
5. Chen G, Ding X, Cao Z, Ye J. Determination of melatonin and pyridoxine in pharmaceutical preparations for health-caring purposes by capillary electrophoresis with electrochemical detection. *Anal Chim Acta*. 2000;408(1-2):249-256.
6. Sorouraddin MH, Rashidi MR, Ghorbani-Kalhor E, Asadpour-Zeynali K. Simultaneous spectrofluorimetric and spectrophotometric determination of melatonin and pyridoxine in pharmaceutical preparations by multivariate calibration methods. *Farmaco*. 2005;60(5):451-458.
7. Freitas RC, Orzari LO, Ferreira LMC, Paixao TRLC; Coltro WKT; Vicentini FC; Janegitz BC. Electrochemical determination of melatonin using

- disposable self-adhesive inked paper electrode. *J Electroanal Chem.* 2021;897:115550.
8. Dankowska A, Domagała A, Kowalewski W. Quantification of *Coffea arabica* and *Coffea canephora* var. *robusta* concentration in blends by means of synchronous fluorescence and UV-Vis spectroscopies. *Talanta.* 2017;172:215-220.
  9. Pacheco ME, Bruzzone L. Synchronous fluorescence spectrometry: Conformational investigation or inner filter effect? *J Lumin.* 2013;137:138-142.
  10. Temiz HT, Tamer U, Berkkan A, Boyaci IH. Synchronous fluorescence spectroscopy for determination of tahini adulteration. *Talanta.* 2017;167:557-562.
  11. Wang C, Li W, Luan X, Liu Q, Zhang J, Zheng R. Species identification and concentration quantification of crude oil samples in petroleum exploration using the concentration-synchronous-matrix-fluorescence spectroscopy. *Talanta.* 2010;81(1-2):684-691.
  12. Alizadeh N, Farokhcheh A. Simultaneous determination of diphenylamine and nitrosodiphenylamine by photochemically induced fluorescence and synchronous fluorimetry using double scans method. *Talanta.* 2014;121:239-246.
  13. Liu X, Wan Y. Simultaneous determination of 2-naphthoxyacetic acid and indole-3-acetic acid by first derivation synchronous fluorescence spectroscopy. *Spectrochim Acta - Part A Mol Biomol Spectrosc.* 2013;111:230-236.
  14. Wu J, Qu Y, Wang L, et al. Dipyriddyphenylamine-based chemodosimeter for sulfite with optimizing ratiometric signals via synchronous fluorescence spectroscopy. *Dye Pigment.* 2017;136:175-181.
  15. Reynolds DM. Rapid and direct determination of tryptophan in water using synchronous fluorescence spectroscopy. *Water Res.* 2003;37(13):3055-3060.

16. Ni Y, Xiao W, Kokot S. Application of chemometrics methods for the simultaneous kinetic spectrophotometric determination of aminocarb and carbaryl in vegetable and water samples. *J Hazard Mater.* 2009;168(2-3):1239-1245.
17. Khajehsharifi H, Pournasheer E, Tavallali H, Sarvi S, Sadeghi M. The comparison of partial least squares and principal component regression in simultaneous spectrophotometric determination of ascorbic acid, dopamine and uric acid in real samples. *Arab J Chem.* 2017;10:S3451-S3458.
18. Bautista Jiménez RD, Jiménez Abizanda AI, Jiménez Moreno F, Arias León JJ. Evaluation of multicomponent fluorimetric analytical data by use of partial least-squares calibration. Application to the determination of codeine and ephedrine in urine. *Clin Chim Acta.* 1996;249(1-2):21-36.
19. Pistonesi MF, Nezio D, Centuri E, Palomeque ME, Lista AG, Fern BS. Determination of phenol, resorcinol and hydroquinone in air samples by synchronous fluorescence using partial least-squares (PLS). *Talanta.* 2006;69:1265-1268.
20. Rima J, Aoun E, Hanna K. Effect of n-alkyl chain length on the complexation of phenanthrene and 9-alkyl-phenanthrene with  $\beta$ -cyclodextrin. *Spectrochim Acta - Part A Mol Biomol Spectrosc.* 2004;60(7):1515-1521.
21. Pacioni NL, Veglia A V. Determination of poorly fluorescent carbamate pesticides in water, bendiocarb and promecarb, using cyclodextrin nanocavities and related media. *Anal Chim Acta.* 2007;583(1):63-71.
22. Galian RE, Veglia a V, de Rossi RH. Cyclodextrin enhanced fluorimetric method for the determination of tryptamine. *Analyst.* 1998;123(7):1587-1591.
23. Galian RE, Bracamonte AG, Veglia A V. Hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin effect on the fluorescence of auxin and skatole and on the simultaneous determination of binary mixtures of indole compounds in urine by first

- derivative spectrofluorimetry. *Anal Chim Acta*. 2005;540(2):393-401.
24. Galian RE, Veglia A V, de Rossi RH. Hydroxypropyl-beta-cyclodextrin enhanced fluorimetric method for the determination of melatonin and 5-methoxytryptamine. *Analyst*. 2000;125(8):1465-1470.
  25. Bracamonte AG, Veglia A V. Spectrofluorimetric determination of serotonin and 5-hydroxyindoleacetic acid in urine with different cyclodextrin media. *Talanta*. 2011;83(3):1006-1013.
  26. Bracamonte AG, Miñambres GG, Veglia A V. Supramolecular analytical chemistry: Spectrofluorimetric determination of 6-hydroxymelatonin with hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin. *Arkivoc*. 2011;2011(7):439-4449.
  27. Hua G, Broderick J, Semple KT, Killham K, Singleton I. Rapid quantification of polycyclic aromatic hydrocarbons in hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin (HPCD) soil extracts by synchronous fluorescence spectroscopy (SFS). *Environ Pollut*. 2007;148(1):176-181.
  28. Sádecká J, Jakubíková M, Májek P, Kleinová A. Classification of plum spirit drinks by synchronous fluorescence spectroscopy. *Food Chem*. 2016;196:783-790.
  29. Allegrini F, Olivieri AC. An integrated approach to the simultaneous selection of variables, mathematical pre-processing and calibration samples in partial least-squares multivariate calibration. *Talanta*. 2013;115:755-760.
  30. Mehmood T, Liland KH, Snipen L, Sæbø S. A review of variable selection methods in Partial Least Squares Regression. *Chemom Intell Lab Syst*. 2012;118:62-69.
  31. Olivieri AC. Practical guidelines for reporting results in single- and multi-component analytical calibration: A tutorial. *Anal Chim Acta*. 2015;868:10-22.
  32. Allegrini F, Olivieri AC. IUPAC-consistent approach to the limit of detection in partial least-squares calibration. *Anal Chem*. 2014;86:7858-7866.

33. Dumont M, Lanctôt V, Cadieux-viau R, Paquet J. Melatonin production and light exposure of rotating night workers. 2012;29(2):203-210.
34. Wei T, Li C, Heng Y, et al. Association between night-shift work and level of melatonin: systematic review and meta-analysis. *Sleep Med.* 2020;75:502-509.
35. Kumar N, Goyal RN. Simultaneous determination of melatonin and 5-hydroxytryptophan at the disposable poly- ( melamine )/ poly- ( o-aminophenol ) composite modified screen printed sensor. *J Electroanal Chem.* 2020;874:114458.
36. Kumar N, Goyal RN. Simultaneous determination of melatonin and 5-hydroxytryptophan at the disposable poly-(melamine)/poly-(o-aminophenol) composite modified screen printed sensor. *J Electroanal Chem.* 2020;874:114458.
37. D.K. Aswal , Ajay Singh, Shahswati Sen, Manmeet Kaur, C.S. Viswandham, G.L. Goswami SKG. Melatonina en los trastornos de sueño. *Eff grain boundaries paraconductivity YBCO.* 2002;1(1):1-11.
38. Abad Pérez EI. Descripción y análisis de los niveles de melatonina en la evolución de la sepsis neonatal. Published online 2014.
39. Strauts C, Gilfillan J, Wilson H. *Analytical Chemistry: The Working Tools.* Vol 1. Oxford University press; 1958.





# CAPÍTULO VI

---

## Conclusiones generales

---



Este trabajo de tesis se basó en estudios previos de nuestro laboratorio en los cuales se reportan las ventajas analíticas de la interacción de diferentes pesticidas carbamatos y algunos derivados indólicos con macrociclos como la ciclodextrina y la hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina.

Lo anterior permitió desarrollar una metodología analítica en flujo que permitió identificar y cuantificar simultáneamente cuatro pesticidas N-metilcarbamatos mediante cromatografía líquida de alto rendimiento, con un sistema de derivatización poscolumna con hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina, detección fluorimétrica y articulado con calibración multivariada de primer orden, más específicamente por cuadrados mínimos parciales.

El desarrollo general de esta investigación permitió optimizar un sistema cromatográfico mediante el cual se identificaron los pesticidas aminocarb, bendiocarb, carbofuran y carbaryl. De igual manera se logró obtener un ambiente que fomentara la formación de complejos supramoleculares poscolumna entre los analitos y la hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina, lo que conlleva un gran reto puesto que es conocido que a mayor porcentaje de solvente orgánico menor es la constante de asociación entre los pesticidas y el macrociclo.

Adicional a todo esto fue de gran importancia el hacer uso de métodos analíticos como PLS, el cual más allá de permitir obtener LOD y LOQ más bajos, permite realizar análisis de datos en señales fuertemente superpuestas, como es el caso de las señales cromatográficas de bendiocarb y carbofuran las cuales producto de tener estructuras químicas similares no fue posible obtener su completa resolución mediante el proceso cromatográfico.

A lo largo de este trabajo de tesis se lograron obtener diferentes conclusiones, las cuales se detallan a continuación.

En función de ampliar los antecedentes relacionados con la interacción supramolecular de pesticidas N-metilcarbamatos con compuestos macrocíclicos, se llevó a cabo el estudio entre las especies neutra y ácida

del aminocarb con la hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina, obteniendo de este estudio las siguientes conclusiones:

- ✚ El análisis de los espectros de fluorescencia de aminocarb a pH ácido y neutro reflejó que el pKa del analito es mucho más ácido en el estado excitado, ( $pK_a = 5,69$  y el  $pK_a^* = 2,81$ ).
- ✚ La interacción de la hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina con la especie neutra y ácida del aminocarb produjo una exaltación de fluorescencia para el aminocarb neutro y un quenching para el caso del aminocarb ácido, con una relación  $K_A^+ / K_A = 53$  indicando una mayor afinidad del macrociclo con el analito protonado.

La optimización del sistema cromatográfico junto con la evaluación del efecto de la adición poscolumna de la hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina sobre las señales cromatográficas fluorescentes de los analitos, permitió concluir lo siguiente:

- ✚ Dado que el rendimiento cuántico de fluorescencia del bendiocarb es considerablemente menor al de carbofuran, sumado al fuerte solapamiento de ambas señales hizo necesario el uso del algoritmo de cuadrados mínimos parciales, el cual permitió cuantificar ambos analitos aun cuando sus señales no estaban resueltas en los cromatogramas.
- ✚ Al comparar los rendimientos cuánticos de los complejos formados en nuestro desarrollo, con los reportados en literatura donde se utilizaron porcentajes de metanol del 2,0 %, es notoria la disminución para los complejos entre bendiocarb, carbofuran y carbaryl y la hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina debido a la competencia que existe por la cavidad del macrociclo entre el metanol y el pesticida. Caso contrario sucede con el aminocarb donde el rendimiento cuántico de fluorescencia al formar el complejo con un mayor porcentaje de metanol aumentó producto de la

estabilización de la estructura, que fue interpretado como la formación de un complejo terciario entre las tres especies.

La evaluación de las cifras de mérito del sistema analítico desarrollado mediante HPLC con derivatización poscolumna y calibración multivariada de primer orden mediante el algoritmo de cuadrados mínimos parciales permitió concluir lo siguiente:

- ✚ La exaltación de las intensidades de fluorescencia producto de las interacciones supramoleculares entre pesticidas carbamato con hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina en un reactor poscolumna, mejoraron las sensibilidades de los analitos evaluados, y como consecuencia de ello se obtuvo una mejora en los LOD del aminocarb, carbofuran y bendiocarb.
- ✚ El análisis de la región elíptica de confianza permitió concluir que los métodos analíticos desarrollados para los cuatro analitos con o sin adición poscolumna de hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina son exactos.
- ✚ La metodología analítica desarrollada es sencilla, directa, específica y de bajo costo, representando una alternativa para la cuantificación de estos pesticidas, los LOD obtenidos se encuentran dentro del rango o incluso por debajo de los ya reportados y exigidos en algunas jurisdicciones.
- ✚ El estudio de recuperaciones en agua domiciliaria da veracidad a lo antes expuesto, y da soporte a la utilidad de la metodología desarrollada.

De igual forma mediante un sistema estático que hizo uso de las ventajas de la fluorescencia sincrónica, cuadrados mínimos parciales y la interacción supramolecular entre el 3-metilindol y la melatonina se desarrolló una metodología alternativa para la detección y cuantificación de estos

metabolitos en una muestra biológica de gran complejidad como lo es la orina.

- ✚ La fluorescencia sincrónica es una técnica muy útil a la hora de analizar analitos fluorescentes cuyos espectros se superponen fuertemente y que mediante fluorescencia tradicional no es posible diferenciar, en este caso se logró obtener espectros que permitían asociar bandas específicas a uno de los analitos.
- ✚ Las ventajas del uso de cuadrados mínimos parciales en sistemas complejos con alto solapamiento espectral fueron de gran ayuda para poder cuantificar ambos analitos en la mezcla.
- ✚ La intensificación de las señales fluorescentes de los analitos por el uso de la hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina y la formación de los complejos supramoleculares generó una mejora considerable en los LOD para ambos analitos.
- ✚ El método fue validado en muestras de orina humana al 0,1 % sin pretratamiento y al 1,0 % de una extracción con éter y retomada en MeOH, las recuperaciones en ambas muestras demostraron que este método podría adoptarse como un método alternativo para estos metabolitos.
- ✚ Las pruebas de la región elíptica de confianza conjunta en todos los casos demostraron que el método desarrollado para estos derivados indólicos es exacto con un nivel de confianza del 95,0 %.

## Proyecciones

Como proyecciones de este trabajo de tesis se plantean dos desarrollos analíticos:

- ✚ El primero se basa en la adición de la hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina en la fase móvil del sistema, el promover la formación de los complejos previo a la columna podría generar un cambio en la interacción que estos analitos presentan con la fase estacionaria, favoreciendo o no su separación.
- ✚ El segundo desarrollo consiste en modificar una columna con hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina, evaluar su efecto en la separación de los analitos y posteriormente evaluar el efecto de la derivatización poscolumna del sistema.





## Producciones científicas

### Artículos publicados

- ✚ “Improved quantification of N-methylcarbamates combining supramolecular post-column derivatization-fluorescence detection-high performance liquid chromatography and partial least squares analysis.” Johannes S. Ramírez Carvajal, Alicia V. Veglia. *Microchemical Journal* 169 (2021) 106550. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2021.106550>.

### Artículos en redacción

- ✚ Simultaneous quantification of 3-methylindol and melatonin by synchronous fluorescence and partial least squares regression (PLS). Johannes S. Ramírez Carvajal, Alicia V. Veglia.
- ✚ Salas, Santiago D; Ramírez Carvajal, Johannes S; Veglia, Alicia V; Use of macrocyclic receptors for the direct and indirect quantification of aminocarb



## Presentación a reuniones científicas

1. XI Congreso Argentino de Química Analítica (organizado por AAQA). *Estrategias analíticas supramoleculares y quimiométricas para la cuantificación simultánea de pesticidas en agua de red y derivados indólicos en muestras de orina*. Johannes S. Ramírez Carvajal, Alicia V. Veglia. Corrientes–Argentina. 30 de noviembre al 3 de diciembre de 2021.
2. XXII Simposio Nacional de Química Orgánica (Organizado por SAICO). *“Evaluación del pKa en el estado excitado del aminocarb por diferentes metodologías”*. Johannes S. Ramírez Carvajal, Alicia V. Veglia. Córdoba–Córdoba–Argentina. 15 de noviembre al 18 de noviembre de 2021.
3. XX Congreso Argentino de Físico-Química y Química Inorgánica. *“Estrategia quimiométrica y supramolecular para la cuantificación por HPLC de N-metilcarbamatos”*. Johannes S. Ramírez Carvajal, Alicia V. Veglia. La Plata–Argentina. 19 de abril al 29 de abril de 2021.
4. XXII Simposio Nacional de Química Orgánica (Organizado por SAICO). *“Aplicación de ciclodextrinas funcionalizadas”*. Hugo M. Elero, Johannes S. Ramírez Carvajal, A. Guillermo Bracamonte, Alicia V. Veglia. Mendoza–Mendoza–Argentina.
5. X Congreso Argentino de Química Analítica (Organizado por AAQA). *“HPLC con derivatización supramolecular poscolumna y detección fluorescente para la cuantificación de N-metilcarbamatos”*. Johannes S.

Ramírez Carvajal, Alicia V. Veglia. Santa Rosa–La Pampa - Argentina.  
17 de septiembre al 20 de septiembre de 2019.

6. IX Congreso Argentino de Química Analítica (Organizado por AAQA).  
*“Cuantificación simultánea de 3-metilindol y melatonina mediante fluorescencia sincrónica y cuadrados mínimos parciales”* Johannes S. Ramírez Carvajal, Alicia V. Veglia. Sociedad Rural; Río Cuarto–Córdoba–Argentina. 7 de noviembre al 10 de noviembre de 2017.
  
7. XX Congreso Argentino de Físico–Química y Química Inorgánica.  
*“Desarrollos analíticos basados en química supramolecular”* Santiago D Salas., Hugo M Elero., Johannes S Ramírez Carvajal., Guillermo Bracamonte A., Alicia V Veglia. Hotel el lago; Carlos Paz–Córdoba - Argentina. 16 de mayo al 19 de mayo de 2017.

## Anexo I

# 1. Fundamentos de cromatografía líquida de alto rendimiento

### 1.1. Naturaleza de la fase móvil

Dentro de esta categoría encontramos dos subcategorías, la cromatografía gaseosa (GC), donde la fase móvil es un gas y la cromatografía líquida (LC) donde la fase móvil es un líquido. A este último grupo corresponden la cromatografía líquida en capa delgada (TLC), cromatografía líquida en columna abierta y cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC).<sup>1</sup>

Estas cromatografías presentan grandes diferencias, sin embargo, los principios de separación en ambas son los mismo. Estas diferencias permiten separar compuestos de diferente naturaleza, en el caso de GC es apropiada para analizar compuestos volátiles y no es eficiente cuando el analito presenta altos pesos moleculares y/o se descompone a altas temperaturas.<sup>1</sup>

Otra diferencia importante es el tipo de detector usado en una y otra, en GC es mucho más fácil ya que es posible utilizar un gas inerte y por ende se puede utilizar como detector cualquier instrumento que mida una propiedad física del analito: conductividad térmica, ionización en llama, captura de electrones. Por otro lado, en la LC es necesario utilizar un instrumento que permita diferenciar entre el solvente de la fase móvil y el analito, para estos casos los más utilizados son la detección UV-visible y por fluorescencia.<sup>1</sup>

En cuanto a la importancia de la fase móvil en el proceso de separación se evidencia una clara diferencia en ambas cromatografías, en GC la fase móvil es un simple transportador (*Carrier*) que hace fluir la muestra a través

de la columna, a diferencia de la LC, donde variar la composición de la fase móvil influye directamente en la retención de los analitos puesto que este es el parámetro esencial que gobierna la separación.<sup>1</sup>

## **1.2. Naturaleza de la fase estacionaria**

La fase estacionaria puede ser sólida o líquida, de esta forma si se emplea una fase móvil líquida se pueden desarrollar procesos cromatográficos de tipo líquido-líquido (LLC) o líquido-sólido (LSC), y si por el contrario hablamos de una fase móvil de naturaleza gaseosa, estaríamos hablando de cromatografía gas-sólido (GSC) o gas-líquido (GLC).<sup>1</sup>

La fase estacionaria suele ser sílice tratada con clorosilano de cadena variable ( $R_3SiCl$ ), donde R es una cadena alquílica, siendo la más común y utilizada las cadenas de 18 carbonos ( $C_{18}H_{37}$ ).<sup>1</sup> No obstante, a lo largo de los años se han desarrollado gran variedad de fases estacionarias donde las cadenas carbonas son modificadas o remplazadas por diferentes grupos funcionales en la búsqueda siempre de mejorar la selectividad y aumentar el ya amplio abanico de compuestos que pueden ser separados, identificados y cuantificados por HPLC.<sup>3,4,5,6</sup>

## **1.3. Cantidad de muestra aplicada**

Si en el proceso cromatográfico la muestra no se destruye como es el caso de TLC, HPLC o cromatografía en columna abierta, se pueden obtener al final de la columna los analitos puros. La cantidad de muestra determinará el tipo de cromatografía que se llevará a cabo, si las cantidades van de los (pg) a los ( $\mu$ g) se denomina cromatografía analítica, si va de los ( $\mu$ g) a los (g) hablamos de cromatografía semi-preparativa y si por el contrario se analizan cantidades superiores al (g) la cromatografía se conoce como preparativa.<sup>1</sup>

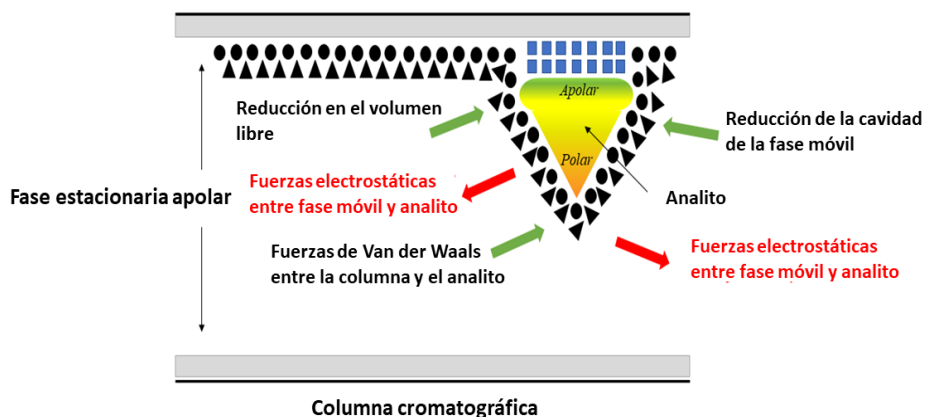
## 1.4. Fenómeno que ocurre dentro de la columna

En la figura A.I. 1 se muestra una ilustración de la interacción entre un analito y las especies químicas que conforman la columna cromatográfica. Se representan con flechas verdes las fuerzas de atracción entre el analito y la fase estacionaria, dentro de estas fuerzas podemos contemplar fuerzas de Van der Waals entre las cadenas carbonadas apolares y el analito, la reducción de la cavidad del disolvente producto del efecto hidrofóbico, entre otras. Así mismo se representan con flechas rojas las fuerzas repulsión entre ambas especies; aquí se consideran principalmente fuerzas de Van der Waals e interacciones electrostáticas entre el analito y la fase móvil.<sup>7</sup>

En base a todo lo anterior sabemos que una separación cromatográfica óptima dependerá de un adecuado equilibrio entre las polaridades de las tres especies involucradas en el proceso; así, la elección de una columna con características afines al analito es crucial a la hora de poder variar los tiempos de retención de los analitos variando la polaridad de la fase móvil.

*Tabla A.I. 1. Polaridad de los grupos funcionales más relevantes*

<i>Grupos funcionales</i>	<i>Momento dipolar</i>
<i>Amina</i>	<i>0,8 a 1,4</i>
<i>Éter</i>	<i>1,2</i>
<i>Sulfuro</i>	<i>1,4</i>
<i>Tiol</i>	<i>1,4</i>
<i>Ácido carboxílico</i>	<i>1,7</i>
<i>Hidroxilo</i>	<i>1,7</i>
<i>Halógenos</i>	<i>1,6 a 1,8</i>
<i>Éster</i>	<i>2,3</i>
<i>Aldehído</i>	<i>2,5</i>
<i>Cetona</i>	<i>2,7</i>
<i>Nitro</i>	<i>3,2</i>
<i>Nitrilo</i>	<i>3,5</i>
<i>Sulfóxido</i>	<i>3,5</i>



**Figura A.I. 1.** Ilustración de la asociación entre un analito que posee una parte polar y otra apolar con una cadena hidrocarbonada de la fase estacionaria, efecto solvóforo. Las flechas en color verde indican las fuerzas que tienden a unir y las flechas en color rojo, las fuerzas que tienden a separar.

Dentro de la cromatografía de afinidad se conocen varias clases, entre ellas encontramos la cromatografía de intercambio iónico, cromatografía en fase normal y cromatografía en fase reversa (FR-HPLC). Esta última se basa en una fase estacionaria apolar y una fase móvil.<sup>1</sup>

## 1.5. Cromatografía líquida de alto rendimiento en fase reversa

En la FR-HPLC los compuestos más polares eluyen primero que aquellos que posean una menor polaridad. Así, una buena separación cromatográfica requiere un equilibrio adecuado entre las fuerzas intermoleculares existentes entre el analito, la fase móvil y la fase estacionaria. Estas fuerzas intermoleculares se describen cualitativamente en términos de polaridad relativa de cada uno de los reactivos.

Las polaridades en orden creciente para varios grupos funcionales del analito son: hidrocarburos < éteres < ésteres < cetonas < aldehídos < amidas < aminas < alcoholes. La polaridad de los distintos grupos funcionales se muestra en la tabla A.I. 1.



Teniendo en cuenta que los compuestos menos polares se retienen en la columna por su afinidad con la fase estacionaria, y que aquellos que poseen mayor polaridad eluyen con la fase móvil, se plantea que una forma de aumentar la retención en la columna de un analito hidrofóbico es aumentar el porcentaje de agua en la fase móvil. Como se ha planteado, el mecanismo de la cromatografía en fase reversa opera con el principio de fuerzas hidrofóbicas, de tal manera que la interacción del analito a la fase estacionaria es proporcional a la superficie de contacto alrededor del segmento apolar del analito en asociación con el ligando en la fase móvil acuosa. Este efecto se denomina solvóforo.

Mientras que la fase móvil eluyen de la columna arrastra consigo cantidades muy diferentes de solutos, estos pasan en diferente orden a través de un sistema que detecta la presencia del soluto, esta señal es convertida en una señal que es tratada por el procesador de datos que representa gráficamente la señal obtenida frente al tiempo o al volumen de elución. Los solutos se representan en el cromatograma como una serie de picos que pueden identificarse por su anchura, altura, área o tiempo de retención, siendo este último el tiempo en el cual la señal del pico presente su valor máximo.

Cada componente de una muestra a analizar mediante HPLC–FR tiene unas características de retención determinadas bajo ciertas condiciones cromatográficas, el objetivo es encontrar las condiciones ideales donde la migración del componente de interés y la de los contaminantes a través de la columna sea lo suficientemente distinta para que dicho compuesto sea separado de los demás, y así permitir su posterior identificación y cuantificación; a este proceso se le denomina purificación.



## 2. Bibliografía

1. Quattrocchi OA, Abelaira SI, Laba RF. Introducción a la HPLC: aplicación y práctica. Published online 1992:405.
2. Greer B, Chevallier O, Quinn B, Botana LM, Elliott CT. Redefining dilute and shoot: The evolution of the technique and its application in the analysis of foods and biological matrices by liquid chromatography mass spectrometry. *TrAC - Trends Anal Chem.* 2021;141:116284.
3. Speltini A, Merlo F, Maraschi F, Villani L, Profumo A. HA-C@silica sorbent for simultaneous extraction and clean-up of steroids in human plasma followed by HPLC-MS/MS multiclass determination. *Talanta.* 2021;221:121496.
4. Hosseini ES, Heydar KT. Silica modification with 9-methylacridine and 9-undecylacridine as mixed-mode stationary phases in HPLC. *Talanta.* 2021;221:121445.
5. Wang W, Wang Y, Chen F, Zheng F. Comparison of determination of sugar-PMP derivatives by two different stationary phases and two HPLC detectors: C18 vs. amide columns and DAD vs. ELSD. *J Food Compos Anal.* 2021;96:103715.
6. Baczek T, Kaliszan R, Novotná K, Jandera P. Comparative characteristics of HPLC columns based on quantitative structure-retention relationships (QSRR) and hydrophobic-subtraction model. *J Chromatogr A.* 2005;1075(1-2):109-115.
7. Horváth C, Melander W, Molnár I. Solvophobic interactions in liquid chromatography with nonpolar stationary phases. *J Chromatogr A.* 1976;125(1):129-156.

