



UNIVERSIDAD DE BURGOS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

FACULTAD DE CIENCIAS

**Nuevos métodos fluorimétricos para la detección de
compuestos orgánicos de alto interés toxicológico y
medioambiental: Aplicaciones a opiáceos y fullerenos**

TESIS DOCTORAL

Víctor García Calvo

2017



UNIVERSIDAD DE BURGOS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

FACULTAD DE CIENCIAS

D. Gabriel García Herbosa, Catedrático del Área de Química Inorgánica del Departamento de Química de la Universidad de Burgos,

D. Tomás Torroba Pérez, Catedrático del Área de Química Orgánica del Departamento de Química de la Universidad de Burgos,

Certifican:

Que el trabajo de investigación aquí presentado: **“Nuevos métodos fluorimétricos para la detección de compuestos orgánicos de alto interés toxicológico y medioambiental: Aplicaciones a opiáceos y fullerenos”** por el licenciado Víctor García Calvo para aspirar al título de Doctor en Química por la Universidad de Burgos, ha sido realizado bajo su dirección y autorizan la presentación como Tesis Doctoral.

Burgos a 30 de Mayo de 2017

Fdo: Gabriel García Herbosa

Fdo: Tomás Torroba Pérez

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mis agradecimientos a las siguientes personas por haber contribuido en esta tesis de una forma u otra a lo largo de estos años:

A mi director el Dr. Gabriel García Herbosa por haberme permitido realizar esta tesis en su grupo de investigación y su dedicación durante estos años para sacar el trabajo adelante.

A mi codirector el Dr. Tomás Torroba Pérez por haberme dirigido y haberme dado la oportunidad de investigar también en su grupo.

A Arancha y Asun con las que empecé con mi investigación cuando finalizaba el último curso de licenciatura y comienzos del máster, por haberme iniciado en este mundo de la investigación.

A José Vicente por haber estado ahí dispuesto a escuchar y ayudar siempre que me surgía una duda.

A Félix nuestro técnico de laboratorio siempre dispuesto a echar una mano para lo que se necesite.

A todos los compañeros de laboratorio que he tenido desde el principio en ambas áreas por todos los buenos ratos que hemos pasado, el apoyo y lo que hemos aprendido unos de otros durante estos años. En especial agradecer a Marta, Cristina, Patricia, Sergio, María Luz, Fuen, Esther y demás compañeros que seguro me dejo, por todo lo que hemos pasado y me habéis aportado.

A todos los demás profesores y compañeros de ambas áreas que se han portado muy bien conmigo y han colaborado de alguna forma en la realización de este trabajo.

Y como olvidar los cafés de inorgánica, esos ratos de descanso y de charlas sobre temas de actualidad o discusiones filosóficas.

A mi familia por estar siempre ahí todos los días apoyándome y en especial a mis padres por todo su cariño e ilusión aportados todo el tiempo sin perder la paciencia y que no te das cuenta, pero está ahí incondicionalmente; a mi hermana por su apoyo todos estos años; y sobre todo a mi hermano José quien siempre está ahí para escuchar todo lo que necesite y tanto me ha ayudado con esta tesis que no hubiera sido posible sin él.

Un agradecimiento especial para mi chica Patricia que me ha estado apoyando y animando, haciéndome mejor persona durante todos estos años, ayudándome con esta tesis y con todo lo demás, de la que he aprendido infinidad de cosas. No quiero olvidarme tampoco de su familia por todo su apoyo y cariño recibido durante este tiempo.

En general gracias a todos por vuestras aportaciones y también a la gente que no he incluido, pero me ha ayudado durante todo este viaje.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	7
OBJETIVOS	11
PRIMER OBJETIVO: fotosíntesis artificial	11
SEGUNDO OBJETIVO: detección de aminas terciarias.....	11
OBJETIVOS PARA EL CAPÍTULO DE PERILENOS.....	12
RESUMEN DE OBJETIVOS.....	12
0. INTRODUCCIÓN	15
0.1. Absorbancia y fluorescencia	15
0.1.1. Rendimiento cuántico, vida media y fosforescencia.....	22
0.2. Sensores químicos	24
1. COLORANTES PARA LA DETECCIÓN DE AMINAS TERCIARIAS.....	33
1.1. Introducción	33
1.2. Primeros experimentos para la de detección de aminas terciarias	38
1.2.1. Uso de diferentes compuestos como cromóforos y aceptores de electrones.....	42
1.3. Estudio teórico mediante cálculos mecanocuánticos	46
1.4. Estudio de la reacción fotoquímica entre el colorante y la amina.....	48
1.4.1. Deshalogenación fotoquímica	56
1.5. Estudio de la reacción fotoquímica entre el colorante y la amina. Dependencia con diversos factores.	59
1.5.1. Dependencia con el pH.....	59
1.5.2. Dependencia con la concentración de amina	61
1.5.3. Dependencia con el colorante.....	61
1.5.4. Pruebas en otros disolventes	62
1.5.5. Estudio de interferentes.....	63
1.5.6. Comparación de aminas:	70
1.6. Patente y estudio de viabilidad	86
1.7. Conclusiones.....	88
2. APLICACIONES DE DETECCIÓN.....	93
2.1 introducción:	93
2.2. Detección y cuantificación de heroína	95
2.2.1. Ecuación para el calibrado.....	96

2.2.2. Ajuste experimental y resultados.....	98
2.2.3. Conclusiones.....	104
2.3. Detección y cuantificación de pirrolizidinas en miel y polen	104
2.3.1. Relación entre la miel y los alcaloides de pirrolizidina.....	108
2.3.2. Toxicidad de los alcaloides de pirrolizidina	108
2.3.3. Límites máximos de consumo y en alimentos.....	109
2.3.4. Análisis polínico de las muestras de miel	110
2.3.5. Extracción de alcaloides de pirrolizidina mediante cartuchos de intercambio catiónico	110
2.3.6. Determinación del contenido en APs mediante UPLC/MS	113
2.3.7. Determinación del contenido en APs mediante espectrofotometría de fluorescencia	114
2.3.8. Resultados y discusión.....	116
2.3.9. Conclusiones.....	132
2.4. Detección de opiáceos en orina y saliva.....	132
2.4.1. Orina artificial	133
2.4.2. Orina real	137
2.4.3. Saliva.....	140
2.4.4. Conclusiones.....	141
2.5. Inclusión de los colorantes en polímeros	141
2.5.1. Polímero con 2 % de entrecruzante	141
2.5.2. Polímero con 5 % de entrecruzante	144
2.5.3. Conclusiones.....	147
2.6. Nanopartículas a partir de disoluciones de fluoresceína y eosina:	147
2.6.1. Nanopartículas de oro:	147
2.6.2. Nanopartículas de plata.....	152
2.6.3. Conclusiones.....	153
2.7. Nanopartículas de oro con los polímeros sintetizados:	153
2.7.1. Conclusiones.....	154
3. DISEÑO DE UN SISTEMA DE MICROFLUIDOS	159
3.1. Introducción	159
3.2. Primer dispositivo: prototipo	160
3.2.1. Diseño y componentes	161

3.2.2 Calibrado.....	162
3.3. Segundo dispositivo: introducción del diodo blanco	165
3.3.1. Diseño y componentes	165
3.3.2. Calibrado.....	166
3.3.3. Reacción con aminas terciarias	171
3.4. Tercer dispositivo: rediseño con policarbonato	179
3.4.1. Diseño y componentes	179
3.4.2. Calibrado.....	181
3.4.3. Reacción con aminas terciarias	182
3.5. Cuarto dispositivo: adición del capilar de vidrio y unión de las dos piezas del dispositivo	185
3.5.1. Diseño y componentes	185
3.5.2. Calibrado.....	187
3.5.3. Reacción con aminas terciarias	188
3.5.4. Prueba con cubetas	189
3.6. Experimentos futuros	193
3.7. Conclusión	193
4. SÍNTESIS DE UNA SONDA DE PERILENO COMO SENSOR DE FULLERENOS.....	197
4.1. Introducción	197
4.1.1. Perilenos	198
4.1.2. Fullerenos	201
4.2. Síntesis de la sonda PDI(Cor) ₄ para la detección de fullerenos	203
4.3. Pruebas de detección de fullerenos	206
4.3.1. Estudios por RMN	206
4.3.2. Estudios por fluorescencia	208
4.4. Cálculos mecanocuánticos sobre la interacción de la sonda con el C ₆₀	211
4.4.1. Estructura A	213
4.4.2. Estructura B	214
4.4.3. Estructura C	214
4.4.4. Estructura D	215
4.4.5. Estructura E	216
4.4.6. Estructura F.....	216
4.4.7. Estructuras con C ₆₀	217

4.4.8. Resultados	219
4.5. Conclusiones.....	226
5. PARTE EXPERIMENTAL.....	229
5.1. Técnicas y equipos utilizados.....	229
5.1.1. Disolventes	229
5.1.2. Reactivos.....	229
5.1.3 Cromatografía.....	229
5.1.4. Resonancia magnética nuclear (RMN)	229
5.1.5. Espectrometría de masas	230
5.1.6. SEM (microscopio electrónico de barrido) y TEM (microscopio electrónico de transmisión).....	230
5.1.7. Espectroscopía UV/Vis.....	230
5.1.8. Espectroscopía de luminiscencia.....	231
5.1.9. Estudios mecanocuánticos	233
5.1.10. Estudios cualitativos de interferentes catiónicos y aniónicos.....	234
5.1.11. Estudios cuantitativos de interferentes catiónicos y aniónicos	235
5.1.11.1. Valoración del analito de interés mediante el uso de absorbancia ultravioleta visible y/o fluorescencia	236
5.1.11.2. Valoración del analito de interés mediante el uso de ¹ H-RMN.....	237
5.1.12. Cálculo de las constantes de equilibrio	238
5.1.12.1. Complejos ML (1:1).....	238
5.1.12.2. Complejos M ₂ L (2:1)	241
5.1.12.3. Complejos ML ₂ (1:2)	241
5.1.13. Job's plot o método de la variación continua	241
5.2. Parte experimental del capítulo 2.	243
5.2.1. Extracción de las pirrolizidinas de miel y polen.....	243
5.2.2. Determinación del contenido en APs mediante UPLC/MS	244
5.2.3. Detección de opiáceos en orina y saliva.....	246
5.2.4. Proceso de extracción en orina real	247
5.2.5. Síntesis del polímero con 2 % de entrecruzante con eosina Y	248
5.2.6. Síntesis del polímero con 5 % de entrecruzante con eosina Y	253
5.3. Parte experimental del capítulo 3.	256
5.3.1. Diseño y construcción del dispositivo de policarbonato	256

5.4. Parte experimental del capítulo 4.	257
5.4.1. Síntesis de la sonda PDI(Cor) ₄ para el fullereno C ₆₀	257
5.5. Metodología experimental en la detección de aminas terciarias	266
5.5.1. Preparación de las disoluciones	266
5.5.2. Medidas en el fluorímetro: Procedimiento habitual de medida de determinación de aminas terciarias.....	269

ABREVIATURAS

A	Absorbancia
Å	10^{-10} m
APs	Alcaloides De Pirrolizidina
CONTAM	Panel Sobre Contaminantes En La Cadena Alimentaria
DABCO	1,4-diazobicyclo[2.2.2]Octano
d	Doblete
DCTB	Trans-2-[3-(4-Tert-Butilfenil)-2-Metil-2-Propenilideno]malononitrilo
dd	Doble Doblete
DFT	Teoría Del Funcional De La Densidad
DIT	Dithranol o antralina (1,8,9-Antracenetriol)
DMSO	Dimetilsulfóxido
D2O	Agua Deuterada
ECL	Electroquimioluminiscencia
EGDMA	Dimetilacrilato De Etilenglicol
ELISA	Ensayo Por Inmunoabsorción Ligado A Enzimas
EM	Espectrometría De Masas
EME	Enfoque Del Margen De Exposición
eq	Equivalente
ESI-MS	Espectrometría De Masas Mediante Ionización Con Electrospray
EtOH	Etanol
Et ₂ O	Éter Dietílico
FAB	Bombardeo Con Átomos Rápidos
FRET	Transferencia De Energía De Resonancia De Förster
Hz	Hercios
HOMO	Orbital Molecular Ocupado De Mayor Energía

8 | Abreviaturas

HPLC	Cromatografía Líquida De Altas Presiones
I	Intensidad De Fluorescencia
IDT	Ingesta Diaria Tolerable
IR	Infrarrojos
<i>J</i>	Constante De Acoplamiento
Kg	Kilogramo
LED	Diodo Emisor De Luz
LUMO	Orbital Molecular Desocupado De Menor Energía
M	Concentración Molar
m	Multiplete
M ⁺	Ión Molecular Positivo
m/z	Masa Por Unidad De Carga
M3G	Glucurónido-3-Morfina
mg	Miligramo
MV	Metil Viológeno
NBS	N-Bromosuccinimida
nm	10 ⁻⁹ m
mM	Milimolar
PET	Transferencia Electrónica Fotoinducida
PS	Fotosensibilizador
nM	Nanomolar
ppb	Partes Por Billón
ppm	Partes Por Millón
PQ	Paraquat
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
s	Singlete
t	Triplete

TBTA	Tris(benziltriazolilmetil)amina
TEM	Microscopio Electrónico De Transmisión
THF	Tetrahidrofurano
UPLC	Cromatografía Líquida De Ultra Altas Presiones
UV	Ultravioleta
V	Volumen
Vis	Visible
X	Fracción Molar
μ l	Microlitro
μ M	Micromolar
λ	Longitud De Onda
δ	Desplazamiento Químico
ϵ	Coefficiente De Extinción Molar
ϕ	Rendimiento Cuántico

OBJETIVOS

Esta tesis doctoral se orientó inicialmente hacia la investigación sobre fotosíntesis artificial y la reducción de dióxido de carbono, pero como a veces ocurre en investigación, se acabó yendo en otra dirección. Por eso se van a exponer a continuación los objetivos que se tenían al principio de la tesis y después los objetivos hacia los que se orientó la investigación y en los que se centra la mayor parte de esta tesis. Todo este proceso se irá explicando a lo largo de este trabajo, de cómo se pasó de la fotosíntesis artificial a la detección de aminas terciarias. También existe al final un capítulo dedicado a síntesis de perilenos para su actuación como sensores y para el que también se definieron sus propios objetivos.

PRIMER OBJETIVO: fotosíntesis artificial

En el capítulo 2 se habla sobre la importancia de la investigación sobre este tema y la gran repercusión que tendría. Durante muchos años se ha investigado cómo la naturaleza realiza este proceso para poder aprenderlo e imitarlo, ya que eso implicaría un método de almacenamiento de energía en forma de compuestos basados en hidratos de carbono u otras especies reducidas del carbono. Este grupo de investigación también se ha dedicado a investigar sobre la producción y almacenamiento de hidrógeno y se quisieron aprovechar esos conocimientos para abordar el tema. Por todo esto se expusieron una serie de propósitos para abordar en esta investigación:

- Síntesis de complejos metálicos útiles como catalizadores en la reducción del dióxido de carbono.
- Construcción de un sistema capaz de llevar a cabo la reducción del CO₂ con un rendimiento adecuado.
- Optimización de un método que sea un sistema respetuoso con el medio ambiente, es decir, usando como disolvente agua, sin producir residuos peligrosos, etc.

SEGUNDO OBJETIVO: detección de aminas terciarias

Para la detección de aminas terciarias se diseñaron unos objetivos propios que son enumerados a continuación:

- Creación de un sistema lo más sencillo y fiable posible capaz de detectar aminas terciarias.
- Optimización del sistema para que además de detectar sirva para determinar la concentración de aminas terciarias.

12 | Objetivos

- Aplicación de este sistema para la detección de aminas de alto interés tales como fármacos, drogas, venenos, etc. en muestras reales.
- Diseño de un dispositivo portátil en el que se pueda llevar a cabo la detección y determinación de las aminas terciarias.

OBJETIVOS PARA EL CAPÍTULO DE PERILENOS

El último capítulo se centra en el estudio de un sistema con potencial aplicación en detección de fullerenos mediante el uso de nuevos derivados de perilenos. Diferentes moléculas derivadas del perileno están siendo sintetizadas dentro del grupo de investigación para ser utilizadas en diferentes aplicaciones. Los objetivos concretos marcados fueron:

- Síntesis de derivados de perilenos capaces de interactuar con los fullerenos.
- Creación de una sonda fluorogénica o cromogénica para la detección de fullerenos tales como el C₆₀.

RESUMEN DE OBJETIVOS

Los objetivos se pueden resumir brevemente en el diseño de un método novedoso de determinación de aminas terciarias y construcción de un dispositivo con el que fuera del laboratorio se puedan realizar análisis de estas sustancias, así como el diseño de una sonda fluorescente de fullerenos tal como el C₆₀, derivada del perileno.

CAPÍTULO 0. INTRODUCCIÓN

0. INTRODUCCIÓN

0.1. Absorbancia y fluorescencia

Al abrir los ojos y observar todo lo que nos rodea uno se da cuenta de que existen multitud de seres vivos, materiales, y objetos cada uno de ellos con una infinidad de formas, tamaño y colores, tamaños y colores. Se suele escuchar el dicho: *Para gustos, los colores* y aunque este refrán no se refiera exactamente a esto, cierto es que cada uno tiene su preferencia en cuanto a los colores. Parece que esta preferencia es algo subjetivo, pero lo que no es así es la explicación de la aparición de la gama cromática que apreciamos por el sentido de la vista. Esta gran cantidad de colores aparece como consecuencia de la interpretación del cerebro al impactar un fotón, caracterizado por tener una energía de cierta región del espectro electromagnético, en la retina del ojo. De este modo, dependiendo de la energía que posea este fotón, veremos un color u otro. La siguiente figura recoge la región del espectro electromagnético visible que percibe el ojo humano y es interpretada por el cerebro para crear los diferentes colores. El rango de visión del ojo humano incluye aproximadamente las longitudes de onda que van de 400 nm hasta 750nm.¹

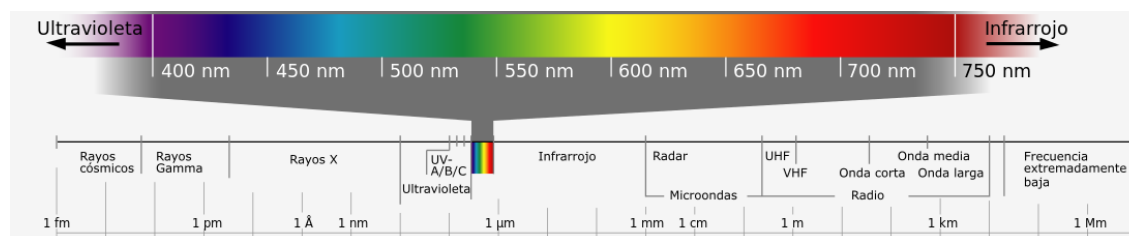


Figura 1. Región del espectro electromagnético conocida como región visible.

Estas ondas provenientes del Sol o de otro cuerpo que las haya emitido como por ejemplo, una bombilla, llegan hasta un objeto, interaccionan con los átomos o moléculas de este y nuestros ojos perciben el resultado de esta interacción. La luz proveniente del Sol es luz blanca que contiene combinadas todas las longitudes del espectro electromagnético visible. Al incidir esta luz en un objeto pueden ocurrir varias cosas, siendo una de ellas la absorción de parte de esta luz por parte de las moléculas que componen el objeto. Esto ocurre cuando dentro de la molécula un electrón es capaz de ser excitado por un fotón incidente y producir una transición entre el nivel electrónico fundamental en el que se encuentra y otro de mayor energía o excitado como se puede ver en la figura 2.

¹ Wald, G. *Science*. **1945**, 101 (2635), 653–658.

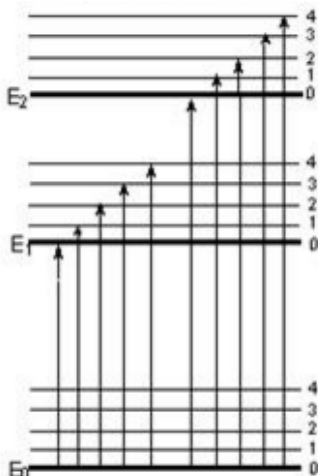


Figura 2. Diagrama de transiciones electrónicas que ocurren según la energía incidente. E_0 , E_1 , E_2 representan niveles electrónicos; de 0 a 4 se representan los niveles vibracionales dentro de cada nivel electrónico.

De este modo se puede comprender cómo una molécula absorbe selectivamente fotones de ciertas longitudes de onda dependiendo de la energía de separación entre los niveles electrónicos de los orbitales moleculares.² Como resultado de esta absorción, la luz no absorbida por parte de las moléculas que componen el objeto rebota o atraviesa el mismo. Así esta luz contiene los fotones no absorbidos de cierta energía que, al llegar al ojo, el cerebro interpreta la falta de esos fotones concretos en lo que se denominan colores complementarios. El significado de estos colores complementarios se muestra en la figura 3.

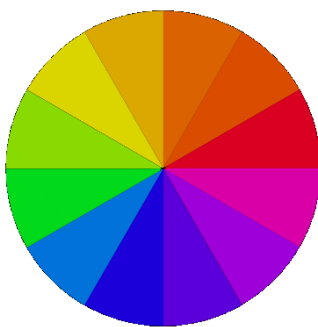


Figura 3. Círculo cromático en el que los colores complementarios se representan uno en frente del otro. Así por ejemplo se ve que el complementario del rojo es el verde.

² Nassau, K. *The Physics and Chemistry of Color: The Fifteen Causes of Color*, 2nd Edition, **2001**, Wiley.

En el caso de que alguna sustancia u objeto se vea de color blanco significa que no absorbe ninguna longitud de onda del espectro visible y si por el contrario se ve negro es porque absorbe todas ellas. Esta característica de las moléculas de absorber ciertos fotones de determinadas longitudes de onda se puede cuantificar y se conoce como absorbancia. La absorbancia se suele representar frente a la longitud de onda utilizada para obtener el espectro correspondiente que indica cuáles son las probabilidades de que un fotón de cierta longitud de onda sea absorbido. La siguiente ecuación muestra la fórmula que se usa para la representación de los espectros de absorbancia conocida como ley de Lambert-Beer.

$$A = \epsilon l C$$

Ecuación 1. Ley de Lambert-Beer. A es la absorbancia, ϵ es el coeficiente de extinción molar que depende de la longitud de onda utilizada, l es la longitud del camino óptico de la cubeta y C es la concentración.

En la ecuación anterior se puede comprobar que hay una relación lineal entre la absorbancia A y el coeficiente de extinción molar ϵ , la concentración C del compuesto y la longitud de la cubeta llamado camino óptico. La absorbancia también se puede definir como el logaritmo negativo de la transmitancia T la cual es el cociente entre la intensidad final I y la inicial I_0 antes de atravesar la muestra, como se muestra en la ecuación 2 y la figura 4.

$$A = -\log(T) = -\log \frac{I}{I_0}$$

Ecuación 2. Definición de la absorbancia.

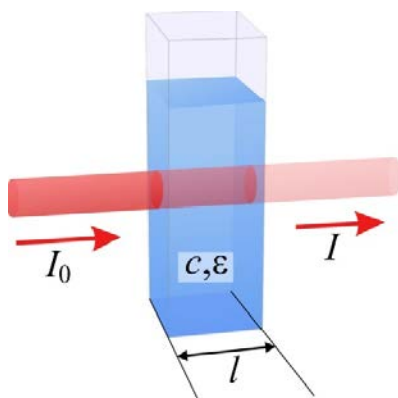


Figura 4. Absorción de un rayo de luz incidente a través de una cubeta por parte de la muestra.

La ley de Lambert-Beer sólo se cumple cuando se usa una única longitud de onda ya que ϵ depende de esta, debiendo elegir la longitud de onda del máximo de absorbancia para cometer el menor error, y para concentraciones bajas ya que a medida que aumenta la concentración se dan fenómenos de agregación de moléculas, dispersión de la luz y otros efectos.³

La molécula o parte de la molécula que causa de aparición del color se denomina cromóforo. Estos pueden ser de naturaleza orgánica o inorgánica y se usan en la industria para proporcionar el color deseado al objeto en cuestión. En el caso del laboratorio lo interesante de los cromóforos es que pueden ser de mucha ayuda en la construcción de sensores o sondas químicas como se hablará más adelante. Los cromóforos se pueden modificar al interactuar con ellos otros grupos funcionales de diferentes moléculas o incluso por distintos disolventes.

También existen las llamadas transferencias de carga intramoleculares en las que ocurre una transferencia electrónica entre diferentes niveles electrónicos de la molécula al producirse la absorción. El estado excitado de la molécula al que se llega por transferencia de carga puede verse estabilizado por la polaridad del disolvente o por el contrario perjudicado y a este fenómeno se le conoce como solvatocromismo provocando desplazamientos de la zona de absorción hacia el rojo o hacia el azul según sea estabilizado o todo lo contrario.⁴ Este fenómeno es muy común por ejemplo en compuestos de coordinación y organometálicos de metales de transición en los que se produce una transferencia de carga entre el metal y los ligandos.⁵

Se ha hablado de cómo una molécula puede absorber un fotón y promocionar un electrón a un nivel energético mayor, pero este electrón acaba regresando al estado fundamental del que partió. Los caminos para regresar al estado fundamental son varios y para ilustrarlo se suele usar un diagrama de Jablonski como se muestra en la siguiente figura.

³ a) Douglas A. Skoog, Donald M. West, F. James Holler. *Analytical Chemistry: An Introduction*, Séptima edición. **1999**. Brooks Cole. b) Douglas A. Skoog, Donald M. West, F. James Holler, Stanley R. Crouch. *Fundamentals of Analytical Chemistry*, octava edición. **2003**. Brooks Cole.

⁴ Reichardt, Christian; Welton, Thomas. *Solvents and solvent effects in organic chemistry*, cuarta edición. **2010**. Wiley-VCH.

⁵ Loukova, G. V; Milov, A. A.; Vasiliev, V. P.; Minkin, V. I. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2016**, *18* (27), 17822–17826.

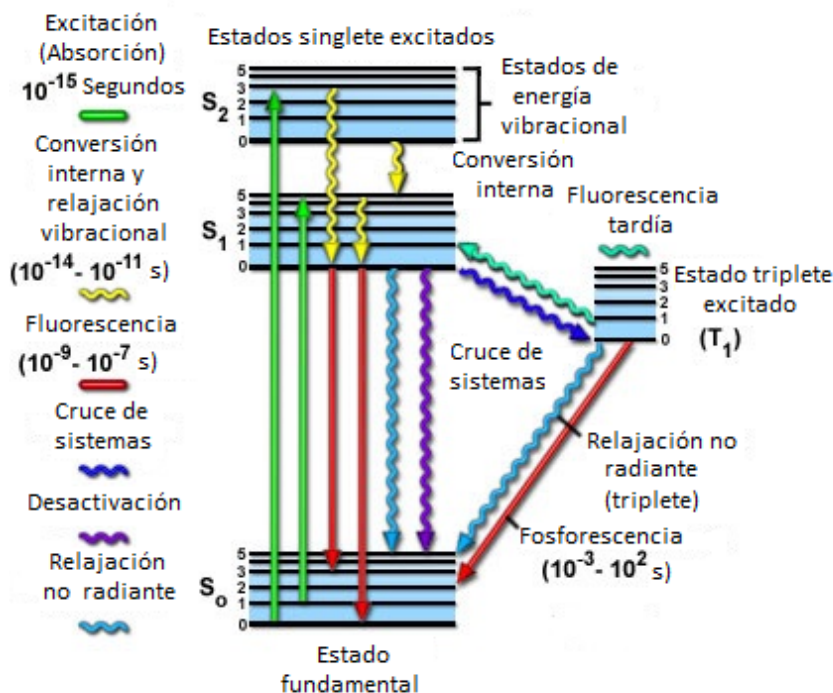


Figura 5. Diagrama de Jablonski para un sistema que parte de un estado singlete fundamental.

Los estados S son los estados singletes en los cuales los electrones están apareados y la multiplicidad de espín es 1. Los estados T son aquellos que se llaman estados triplete en los que dos electrones no se encuentran apareados y la multiplicidad de espín es 3. Las transiciones no radiantes, que no producen luminiscencia, se indican mediante flechas onduladas, y las radiantes son las que se indican con flechas rectas. Los estados vibracionales se indican con los distintos números del 0 al 5.

Cuando se produce el fenómeno de absorción, el electrón pasa del estado fundamental S_0 a uno de mayor energía S_1, S_2, \dots . Al retorno del electrón excitado al estado fundamental mediante una transición radiante entre estados electrónicos de la misma multiplicidad se le denomina fluorescencia. La fluorescencia ocurre desde el estado excitado de menor energía (regla de Kasha).⁶ Por lo tanto, en este primer caso los electrones pueden volver al estado fundamental de dos formas: radiante (fluorescencia) o no radiante (relajamiento vibracional).

⁶ A. D. McNaught and A. Wilkinson. IUPAC. *Compendium of Chemical Terminology*, segunda edición. (the "Gold Book"), 1997. Blackwell Scientific Publications

Este último proceso se puede dar mediante choques entre las moléculas y con el disolvente si se encuentra en disolución.

Otro proceso existente, como se puede observar en el diagrama de Jablonski, es la conversión interna que implica la pérdida de energía del electrón pasando a estados menos energéticos mediante transferencias vibracionales por emisión de calor. La conversión interna se basa en el solapamiento de los estados vibracionales más altos de un estado S_n con el estado fundamental (también vibracional) de un estado S_{n+1} .

Existe otro proceso muy interesante llamado cruce de sistemas que también sigue un mecanismo no radiante. Este transcurre desde el nivel vibracional menos energético de un estado singlete excitado al nivel vibracional superior de un estado triplete T_1 , sin emisión de radiación y seguido de relajación vibracional hasta el estado fundamental de vibración de T_1 . Es un proceso prohibido por espín y las transiciones para caer desde T_1 al estado singlete fundamental S_0 son más lentas, dando lugar a la fosforescencia. La prohibición de spin puede superarse por ejemplo mediante el acoplamiento espín-órbita que puede causar un cambio del espín durante las transiciones radiantes y las no radiantes. Se trata de un efecto que se ve mejorado por la presencia de átomos pesados, como los halógenos grandes (Br o I), y cuya influencia se mide por la constante de acoplamiento espín-órbita. Este fenómeno es lo que se denomina efecto del átomo pesado.⁷

Los llamados mecanismos radiantes en los que la molécula excitada vuelve al estado fundamental son conocidos por el término luminiscencia. Esta luminiscencia se puede clasificar en varias categorías según el origen de la fuente de excitación teniendo por ejemplo fotoluminiscencia cuando el origen es la absorción de fotones, quimioluminiscencia cuando se produce por causa de una reacción química, bioluminiscencia en los seres vivos, etc.

Al igual que se ha dicho que las moléculas o las partes de ellas que son las responsables de absorber la radiación y dar color se les llama cromóforos, para el caso de producir luminiscencia se les denomina fluoróforos. La fluorescencia se caracteriza porque la longitud de onda del fotón emitido es mayor que la del absorbido. La separación que se encuentra entre el máximo de absorción y el de emisión se llama desplazamiento de Stokes como se puede ver en la figura 6 y puede ir desde unos pocos nanómetros hasta 200 nanómetros.⁸

⁷ Ermler, W. C.; Ross, R. B.; Christiansen, P. A. In *Adv. Quantum. Chem.*; **1988**; Vol. 19, pp 139–182.

⁸ W. T. Mason, *Fluorescent and Luminescent Probes for Biological Activity*, London: Academic Press, Chapter 2, pp. 29-37, **1999**.

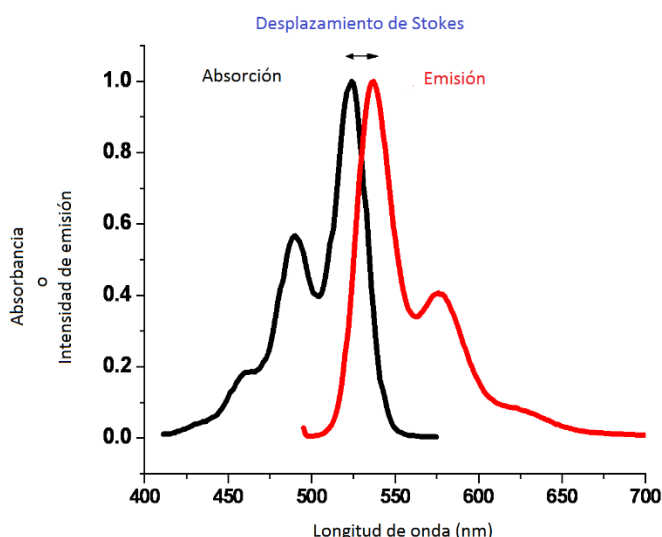


Figura 6. Ejemplo del desplazamiento de Stokes.

En lugar de usar el espectro de absorción también se puede obtener el de excitación que se corresponde con las longitudes de onda que provocan una emisión luminiscente en el compuesto. Aunque suelen coincidir el espectro de absorción y el de excitación esto no siempre es así puesto que no todas las absorciones van a dar como resultado una relajación radiante.

Diversos factores pueden afectar a la fluorescencia ya sean internos de la propia molécula como la estructura o conformación, pero sobre todo externos tales como el disolvente, el pH⁹, la presencia de oxígeno¹⁰, la temperatura¹¹ y también la concentración¹². Para el caso de la concentración es importante saber que se debe trabajar con muestra diluidas ya que se pueden dar fenómenos de autoapagado de la fluorescencia por choques entre las moléculas existentes en disolución o incluso de absorción de la emisión por parte de las otras moléculas si los picos están solapados. Otro fenómeno que se puede producir es la formación de excímeros o exciplejos.¹³ Los primeros se forman cuando choca una molécula excitada con otra igual en su estado fundamental dando lugar a un dímero con la energía de excitación deslocalizada entre ambos. Para el caso de los exciplejos es lo mismo, pero siendo dos moléculas distintas las implicadas. Estas formaciones también se ven favorecidas por el aumento de temperatura y la viscosidad del disolvente.

⁹ Campbell, T. N.; Choy, F. Y. M. *Mol. Biol. Today* **2001**, 2, 1–4.

¹⁰ a) Kautsky, H. *Trans. Faraday Soc.* **1939**, 35 (216), 216. b) Lakowicz, J. R.; Weber, G. *Biochemistry* **1973**, 12 (21), 4161–4170.

¹¹ Giri, R. *Spectrochim. Acta Part A Mol. Spectrosc.* **1992**, 48 (6), 843–848.

¹² Fonin, A. V.; Sulatskaya, A. I.; Kuznetsova, I. M.; Turoverov, K. K. *PLoS One* **2014**, 9 (7), e103878.

¹³ Kalinowski, J. *Materials Science-Poland*, **2009**, Vol. 27, No. 3

0.1.1. Rendimiento cuántico, vida media y fosforescencia

Dos factores muy importantes que afectan a la fluorescencia son el tiempo de vida medio y el rendimiento cuántico.

El rendimiento cuántico ϕ de un fluoróforo se puede definir como la proporción de fotones emitidos en relación con los fotones absorbidos. El valor de este cociente se encuentra entre 0 y 1 y se representa con la siguiente ecuación.

$$\Phi = \frac{k_r}{k_r + k_{nr}}$$

Ecuación 3. Ecuación del rendimiento cuántico

Donde k_r es la constante de velocidad para la relajación por vía radiante que puede ser fluorescencia o fosforescencia, de la que se hablará más adelante, y k_{nr} es la constante de velocidad para la relajación por vía no radiante que engloba todas las desactivaciones tales como la conversión interna, cruce de sistemas y demás desactivaciones intra o intermoleculares que no emiten luz.

El tiempo de vida medio se puede definir como el tiempo promedio que permanece la molécula en el estado excitado antes de producirse la relajación. Este se puede expresar de la siguiente forma como muestra la ecuación 4.

$$\tau = \frac{1}{k_r + k_{nr}}$$

Ecuación 4. Tiempo de vida medio.

Las constantes son las mismas que para el caso del rendimiento cuántico. Otra manera de expresar el tiempo de vida medio con el que calcularlo experimentalmente se muestra en la siguiente ecuación.

$$I = I_0 e^{-\frac{t}{\tau}}$$

Ecuación 5. Expresión para calcular tiempos de vida medios experimentalmente.

La muestra se excita mediante un pulso de radiación electromagnética ultra rápida para lo que normalmente se utiliza un láser. Esto provoca que la fluorescencia llegue al máximo y entonces decaiga rápidamente hasta cero. Así se pueden encontrar fluoróforos de largos tiempos de vida y de cortos tiempos de vida.

Representado la intensidad de emisión frente al tiempo se obtiene la figura 7 en la que se puede observar cómo se calcula el tiempo de vida medio.

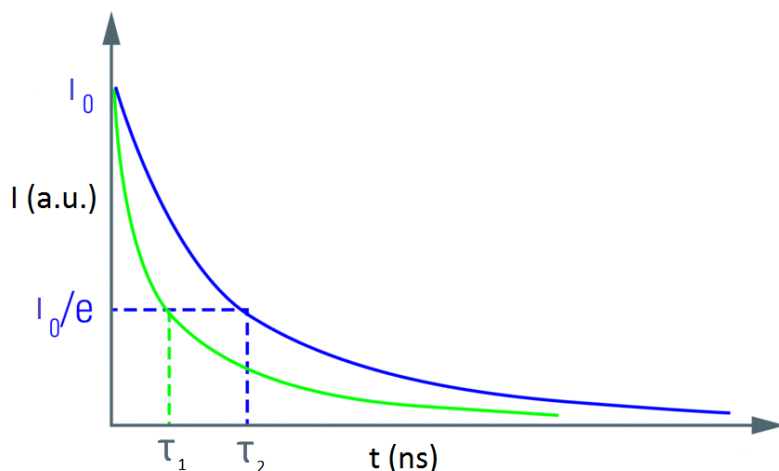


Figura 7. La intensidad inicial decae y el valor I_0/e es el valor del tiempo de vida medio. En esta figura se puede observar un ejemplo de dos tiempos de vida medio, uno más largo que el otro.

La fosforescencia se produce después de un cruce de sistemas con la sucesiva relajación desde ese estado triplete hasta el estado singlete fundamental. Como es una transición prohibida por espín, la escala de tiempo para este fenómeno suele ser mayor que el de la fluorescencia. Las longitudes de onda de los fotones emitidos por este proceso también serán mayores que los de la fluorescencia ya que la energía del estado triplete es menor que la del estado excitado singlete y es más susceptible de ser interferido por procesos no radiantes o colisiones moleculares. Como se ha dicho antes la existencia de átomos pesados puede producir acoplamiento espín-órbita que ayuden al cruce de sistemas.

0.2. Sensores químicos

Lo que acabamos de describir es el conocimiento básico necesario para la preparación de sensores o sondas moleculares como las preparadas en nuestro grupo de investigación.¹⁴ Estas sondas se basan en la afinidad por un sustrato o analito y en el cambio que se produce al interaccionar con este. Para construir estos sensores hay que tener en cuenta las propiedades del sustrato tales como el tamaño, carga, forma, etc. La interacción del sensor con el analito de interés puede ser irreversible, en cuyo caso sería mejor emplear dicho sensor para la extracción de sustancias interferentes o dañinas del medio o por el contrario una interacción más débil y reversible que sirve mejor como transportador de ese analito o como sensor. Las principales características que debería tener un buen sensor son: alta sensibilidad, alta especificidad, estabilidad en el medio de detección, ser barato y que tenga respuesta rápida.

Los sensores químicos se componen de dos partes: el receptor que interacciona y detecta el analito de la muestra y la parte que produce la señal que indica la detección llamada transductor. El analito puede interactuar con el receptor de una forma química si se produce una reacción con este produciendo la señal correspondiente o alterando alguna propiedad física.¹⁵

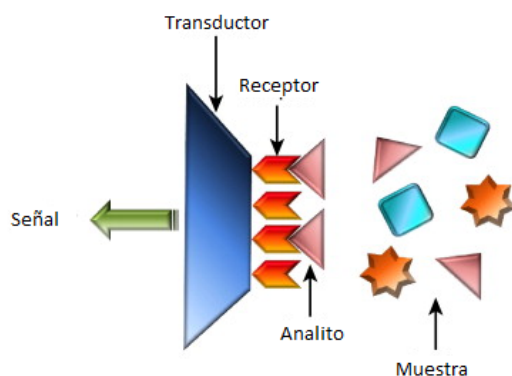


Figura 8. Esquema de un sensor químico.

¹⁴ J. L. Barrio-Manso, P. Calvo, F. C. García, J. L. Pablos, T. Torroba, J. M. García, *Polym. Chem.* **2013**, *4*, 4256-4264; (b) T. Gómez, D. Moreno, B. Díaz De Greñu, A. C. Fernández, T. Rodríguez, J. Rojo, J. V. Cuevas, T. Torroba, *Chem. Asian J.* **2013**, *8*, 1271-1278; (c) D. Moreno, B. Díaz De Greñu, B. García, S. Ibeas, T. Torroba, *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 2994-2996; (d) D. Moreno, J. V. Cuevas, G. García-Herbosa, T. Torroba, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 3183-3185. (e) E. Ballesteros, D. Moreno, T. Gómez, T. Rodríguez, J. Rojo, M. García-Valverde, T. Torroba, *Org. Lett.* **2009**, *11*, 1269-1272; (f) O. Del Campo, A. Carbayo, J. V. Cuevas, A. Muñoz, G. García-Herbosa, D. Moreno, E. Ballesteros, S. Basurto, T. Gómez, T. Torroba, *Chem. Commun.* **2008**, *38*, 4576-4578; (g) S. Basurto, O. Riant, D. Moreno, J. Rojo, T. Torroba, *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 4673-4688.

¹⁵ A. Hulanicki, S. Glab, F. Ingman, *Pure & Appl. Chem.* **1991**, *63*, 1247-1250.

Las señales producidas por el transductor pueden ser de varios tipos: colorimétrica, eléctrica, luminosa, etc. Así se pueden clasificar los sensores químicos en varias categorías dependiendo de la respuesta como se puede ver en la figura 9.

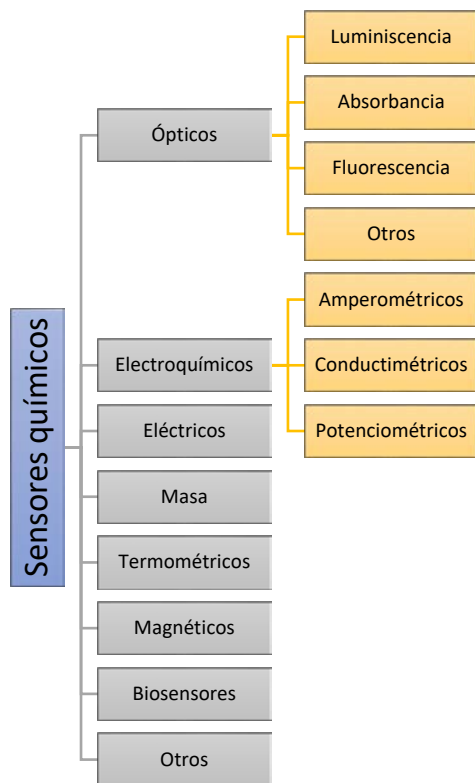


Figura 9. Esquema de la clasificación para los sensores químicos.¹⁶

En este trabajo se van a usar las señales luminosas producidas por fluoróforos que actúan como transductores. Esto es así porque existen varias ventajas con respecto a otros métodos como son: la gran sensibilidad de la técnica de fluorescencia, la gran velocidad de respuesta y la simplicidad de medida, ya que para leer la señal se necesita un fluorímetro, el cual actualmente puede encontrarse fácilmente en el mercado incluso en forma portátil. A la hora de calificar un buen sensor hay que tener en cuenta factores como son: ciclos de vida, límite de

¹⁶ P. Gründler, Chemical Sensors: An Introduction for Scientists and Engineers, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Chapter 6, pp. 133-136, 2007.

detección, histéresis, rango dinámico, linealidad, precisión, reproducibilidad, resolución, tiempo de respuesta, selectividad, sensibilidad, estabilidad y veracidad.

Los sensores fluorescentes pueden funcionar de varias formas ya sea apagándose y entonces se denomina sonda on-off o siendo las más interesantes las que llevan al fluoróforo de un estado apagado que pasa a otro encendido al interactuar con el analito, lo que se llaman sondas off-on. Existen tres mecanismos que proporcionan este resultado y se citan a continuación.

- Desactivación dinámica o por choques y desactivación estática: la desactivación dinámica ocurre como consecuencia del paso de la energía del estado excitado del fluoróforo al analito de interés por colisión. Es un proceso controlado por difusión y consigue una disminución de la intensidad o apagado del fluoróforo y el tiempo de vida medio de este. La pérdida de energía del fluoróforo transcurre mediante una transición no radiante hasta el estado fundamental. La disminución de la intensidad de fluorescencia y el tiempo de vida están relacionados con la concentración de un agente desactivante (quencher) a través de la ecuación de Stern-Volmer:

$$\frac{F_0}{F} = \frac{\tau_0}{\tau} = 1 + k_q \tau_0 [Q] = 1 + K[Q]$$

Ecuación 6. Ecuación de Stern-Volmer.

En esta ecuación $F_0(\tau_0)$ es la intensidad (tiempo de vida) en ausencia del agente desactivante Q, $F(\tau)$ es la intensidad (tiempo de vida) en presencia del agente desactivante, K es la constante de Stern-Volmer, y k_q es la constante de velocidad de desactivación, la cual en el caso de una completa desactivación sería igual a la constante de difusión de este agente desactivante.

La desactivación estática se basa en la formación de un complejo no fluorescente entre el fluoróforo y el analito de interés al unirse. Esto conlleva la disminución de la intensidad de fluorescencia, pero no el tiempo de vida medio. Estos dos procesos son reversibles y ocurren sin producirse reacción química. Para poder diferenciar ambos efectos en una muestra basta con realizar un estudio de la respuesta a diferentes temperaturas ya que en el caso de desactivación dinámica aumentará al incrementar esta, mientras que en el caso de la desactivación estática disminuirá al aumentar la temperatura ya que se rompe la interacción entre el fluoróforo y el analito de interés.¹⁷ Esta desactivación por choques puede ser utilizada para varias

¹⁷ J. R. Lakowicz, Principles of Fluorescence Spectroscopy, tercera edición, capítulo 9, 265, 2006. Springer.

aplicaciones¹⁸ como la detección de oxígeno o para determinar el coeficiente de difusión de un analito desactivante.

- Transferencia de la energía de resonancia (RET) o la transferencia de la energía de resonancia de Forster (FRET): este mecanismo está basado en el aporte de la energía del fluoróforo en estado excitado a una sustancia aceptora. Esta última suele ser también una molécula fluorescente por lo que al excitar al primer fluoróforo se consigue que el que acabe emitiendo sea este segundo. El proceso se puede observar en la siguiente figura.

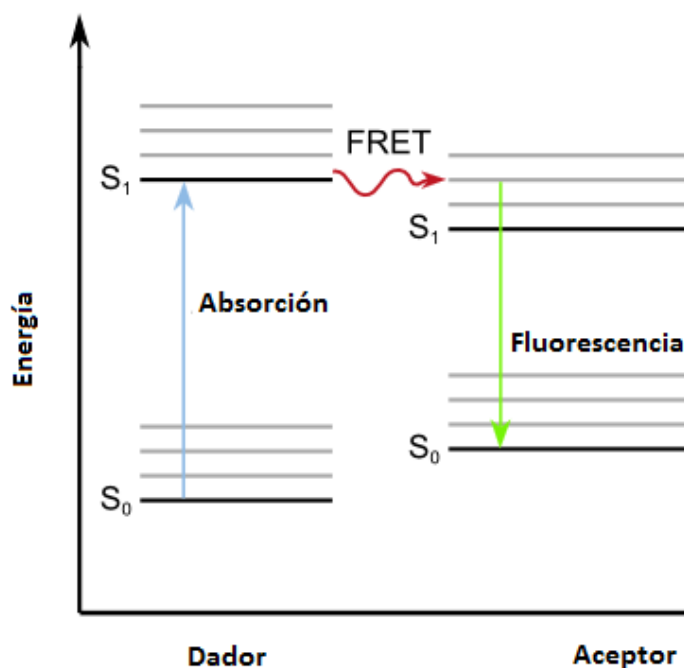


Figura 10. Esquema de un proceso FRET para los niveles energéticos del dador y el aceptor.

Como resultado de este proceso el dador de la energía experimenta un descenso en la intensidad de emisión y el tiempo de vida mientras que la intensidad de emisión del aceptor es incrementada. Para conseguir un mejor efecto FRET se pueden seguir ciertas recomendaciones como son: el solapamiento de las bandas de emisión del dador y la de absorción del aceptor, un gran rendimiento cuántico del dador, un coeficiente de absorción alto para el aceptor y la proximidad entre las dos especies.

¹⁸ J. R. Lakowicz, Principles of Fluorescence Spectroscopy, tercera edición, capítulo 1, 11, 2006. Springer.

- Procesos de transferencia fotoinducidos: son procesos en los que al unirse el analito al receptor de la sonda produce un cambio en esta y altera sus propiedades electrónicas, activando o modificando la fluorescencia. Pueden darse tres casos A, B y C que analizamos a continuación.

A) Procesos de transferencia de electrón fotoinducida (PET): es un proceso que tiene lugar en un sistema entre un dador y un aceptor de electrones. La transferencia tiene lugar entre el fluoróforo y la parte de la molécula encargada de interactuar con el analito de interés que se llama receptor. El HOMO de este receptor debe encontrarse por encima del HOMO del fluoróforo, por lo que al producirse la excitación compete la fluorescencia con el paso de un electrón del HOMO del receptor al HOMO del fluoróforo por vía no radiante. Este mecanismo permite la creación de un sensor del tipo off-on ya que al aparecer el analito de interés e interactuar con el receptor provoca un descenso en la energía del HOMO por debajo de la del fluoróforo y activa la fluorescencia. En la siguiente figura se ilustra visualmente el proceso.

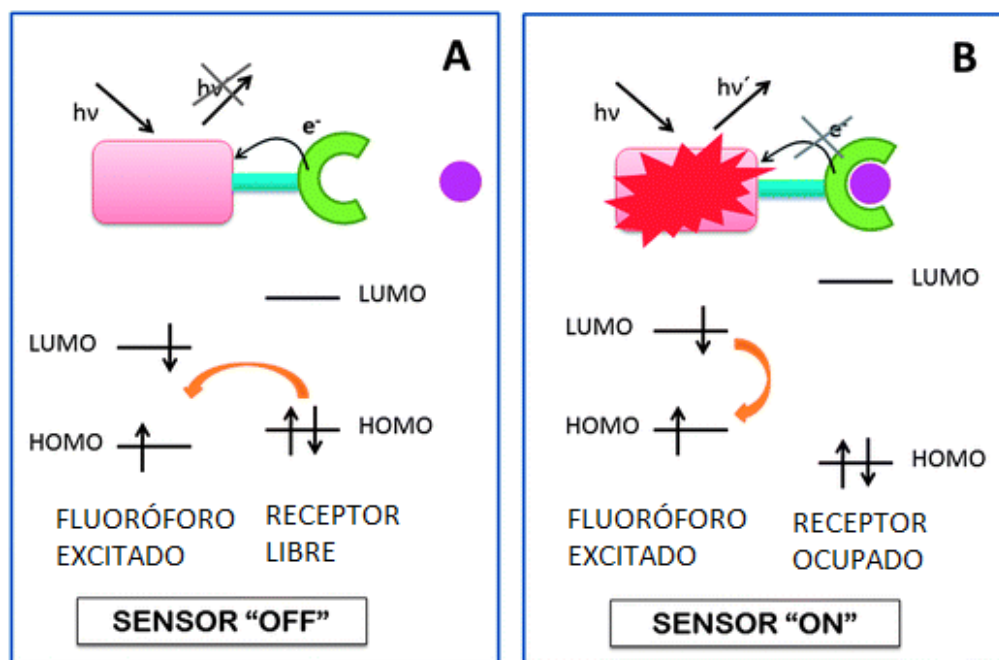


Figura 11. Ejemplo de proceso PET.¹⁹

¹⁹ Culzoni, M. J.; Muñoz de la Peña, A.; Machuca, A.; Goicoechea, H. C.; Babiano, R. *Anal. Methods*, **2013**, 5 (1), 30–49.

B) Transferencia de carga fotoinducida (PCT):²⁰ un fluoróforo compuesto por un grupo dador de electrones como por ejemplo una amina, está conjugado con un grupo aceptor de electrones, el cual mediante irradiación puede ser excitado y experimentar una transferencia de carga desde el dador alterando el momento dipolar de la molécula. Este cambio resulta en un desplazamiento de Stokes que depende del disolvente. Por ejemplo, un catión o ácido de Lewis puede interactuar con la parte dadora del fluoróforo produciendo un desplazamiento hacia el azul de la absorción o si interactúa con la parte del grupo aceptor se producirá un desplazamiento hacia el rojo.

C) Transferencia protónica fotoinducida (PPT):²¹ se suele dar en disoluciones acuosas. Un fluoróforo excitado puede actuar desprotonando moléculas de agua o protonándolas dependiendo de sus propiedades con la consiguiente variación de la densidad de carga.

El método de detección y cuantificación de aminas terciarias que se describe en esta Tesis se basa en la exaltación de la luminiscencia que muestran algunos fluoróforos (moléculas basadas en esqueleto xanteno) en presencia del analito (amina terciaria). La exaltación de la luminiscencia se provoca mediante iluminación, es decir, fotoquímicamente. El origen de la exaltación de la luminiscencia radica en la deshalogenación que experimentan los fluoróforos. Se trata por lo tanto de una modificación química del fluoróforo, en la que desaparecen enlaces carbono-halógeno y se forman enlaces carbono-hidrógeno. El estado excitado triplete del fluoróforo experimenta una transferencia electrónica con la amina terciaria que se comporta como dador de electrones y tiene lugar una transferencia electrónica intermolecular del analito al fluoróforo (sensor). En sentido estricto, el procedimiento encontrado para detectar aminas terciarias no encaja con ninguno de los procesos de interacción sensor-analito comentados anteriormente, pero contiene aspectos conceptuales de muchos de ellos. Es por ello que se puede describir este resultado del proceso de interacción sensor-analito en el que se produce una transferencia electrónica que lleva a una reacción química irreversible que aumenta la fluorescencia del fluoróforo significando la detección del analito.

²⁰ Valeur, B.; Leray, I.; *New Trends in Fluorescence Spectroscopy* Volume 1 capítulo 10, **2001**, Springer Berlin Heidelberg.

²¹ Chou, P.-T.; Solntsev, K. M. *J. Phys. Chem. B* **2015**, *119* (6), 2089–2089.

CAPÍTULO 1. COLORANTES PARA LA DETECCIÓN DE AMINAS TERCIARIAS

1. COLORANTES PARA LA DETECCIÓN DE AMINAS TERCIARIAS

Este capítulo está dedicado a la detección de aminas terciarias mediante el uso de colorantes. Esta investigación surgió a raíz del interés por abordar la fotosíntesis artificial, llevando finalmente a desarrollar una nueva línea de investigación sobre sensores para la detección y cuantificación de aminas.

1.1. Introducción

Las aminas terciarias son compuestos que tienen variadas aplicaciones como productos farmacéuticos, pesticidas y surfactantes además de venenos y drogas. Por esto se requiere un método de análisis y determinación de estas sustancias, especialmente en disolución acuosa. Las trialkilaminas son compuestos difíciles de detectar ya que no suelen absorber en la región UV/Vis del espectro electromagnético, exhibiendo bajos coeficientes de absorción, y siendo compleja su derivatización.²²

Desde las publicaciones pioneras de Noffsinger and Danielson,²³ la detección y la determinación analítica de las aminas terciarias a partir de la electroquimioluminiscencia del complejo $[\text{Ru}(\text{bipy})_3]^{3+}$ ha sido estudiada y tratada con detalle.²⁴ La reacción de detección está basada en la oxidación de $[\text{Ru}(\text{bipy})_3]^{2+}$ a $[\text{Ru}(\text{bipy})_3]^{3+}$, seguida de una reacción de transferencia electrónica entre $[\text{Ru}(\text{bipy})_3]^{3+}$ y un dador de electrones (amina terciaria). Esta reacción de transferencia suele venir acompañada de una emisión de luz (electroquimioluminiscencia, ECL). El mecanismo global de este proceso ha sido ampliamente estudiado.²⁵

²² Knight, A. W.; Greenway, G. M. *Analyst*. **1996**, *121* (11), 101R.

²³ (a) Noffsinger, J. B.; Danielson, N. D. *Anal. Chem.* **1987**, *59* (6), 865–868. (b) Noffsinger, J. B.; Danielson, N. D. *J. Chromatogr. A* **1987**, *387* (C), 520–524.

²⁴ Yuan, Y.; Han, S.; Hu, L.; Parveen, S.; Xu, G. *Electrochim. Acta* **2012**, *82* (0), 484–492.

²⁵ Miao, W. J.; Choi, J. P.; Bard, A. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124* (48), 14478–14485.

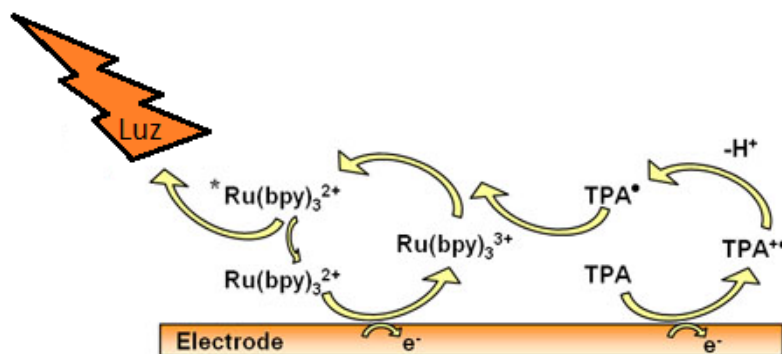


Figura 12. Ejemplo de proceso de ECL (electroquimioluminiscencia) en un electrodo entre el complejo de rutenio y una amina terciaria como es la TPA (tripropilamina).

Sin embargo, uno de los inconvenientes de este método es la baja selectividad debida a la gran cantidad de especies que pueden actuar como dadores de electrones al $[\text{Ru}(\text{bipy})_3]^{3+}$. Así, las aminas primarias, secundarias y terciarias dan ECL, aunque la intensidad decrece en el orden: terciaria>secundaria>primaria.²³ Los péptidos, aminoácidos, ácidos nucleicos, NADH, alcaloides (codeína, heroína, morfina, dextrometorfano) y casi cualquier producto farmacéutico, pesticida y surfactante que contenga un grupo amina es susceptible de presentar ECL. Pero no solo los compuestos basados en nitrógeno dan esta señal, incluso compuestos basados en oxígeno reductores como ácidos carboxílicos, alcoholes, cetonas, oxalatos, etc.²⁴ La razón de esta falta de selectividad es el gran potencial de reducción del par redox $[\text{Ru}(\text{bipy})_3]^{3+/2+}$ ($E^{\circ} = +1,26 \text{ V}$ versus NHE), el cual significa que cualquier compuesto con un potencial $E^{\circ} < +1,26 \text{ V}$ será susceptible de producir ECL. Afinar estos potenciales de reducción entre el dador y el aceptor de electrones es de especial interés para ayudar a mejorar la selectividad del proceso.

La alta sensibilidad es común en los métodos de luminiscencia y no es complicado llegar a límites de detección bajos como el nivel micromolar o menor. Es más, la representación de la intensidad frente a la concentración resulta en una gráfica lineal durante varios órdenes de magnitud en la concentración y en condiciones controladas se observa una alta selectividad y repetibilidad.²⁶ Previos resultados en el grupo de investigación muestran que las moléculas luminiscentes pueden ser utilizadas como sensores para diferentes analitos.²⁷ Dicho esto, sería

²⁶ Kulmala, S.; Suomi, J. *Anal Chim Acta* **2003**, *500*, 21-69.

²⁷ (a) Ballesteros, E.; Moreno, D.; Gomez, T.; Rodriguez, T.; Rojo, J.; Garcia-Valverde, M.; Torroba, T. *Org Lett* **2009**, *11*, 1269-1272. (b) Basurto, S.; Miguel, D.; Moreno, D.; Neo, A. G.; Quesada, R.; Torroba, T. *Org Biomol Chem* **2010**, *8*, 552-558. (c) del Campo, O.; Carbayo, A.; Cuevas, J. V.; Munoz, A.; Garcia-Herbosa, G.; Moreno, D.; Ballesteros, E.; Basurto, S.; Gomez, T.; Torroba, T. *Chemical Communications* **2008**, 4576-4578. (d) Fuertes, P.; Moreno, D.; Cuevas, J. V.; Garcia-Valverde, M.; Torroba, T. *Chem-Asian J* **2010**, *5*,

deseable encontrar un sensor que reaccionara con las aminas terciarias y provocara una modificación de la fluorescencia o activación de esta.

Por otra parte, las aminas terciarias han sido utilizadas como eficientes dadores de electrones de sacrificio en sistemas de fotosíntesis artificial o sistemas moleculares para la producción de hidrógeno a partir de luz.²⁸ Estos sistemas están formados por un fotosensibilizador (PS), un catalizador y un gran exceso de un dador de electrones. En algunos casos el mecanismo de la reacción ocurre a través de una desactivación oxidante (*oxidative quenching*) del estado excitado del ³PS* mediante una amina terciaria (TEOA).²⁹ La transferencia electrónica debe ser lo suficientemente rápida para que ocurra antes de la desactivación (radiante o no) del estado excitado PS*. Como se conoce por la ecuación Rhem-Weller y la teoría de Marcus, en la región normal la velocidad de las trasferencias electrónicas aumenta cuando crece ΔE , que es la diferencia entre los potenciales de reducción del dador y el aceptor $\Delta E = E_{\text{dador}} - E_{\text{aceptor}}$. Los potenciales de reducción de las aminas alifáticas siguen el orden: terciaria < secundaria < primaria³⁰ y como consecuencia las aminas secundarias y primarias no son útiles como dadores de electrones de sacrificio en estos sistemas.

Como extensión de este comportamiento (trasferencia de electrones entre el estado excitado de un colorante y el dador de electrones) se pensó en usar los estados excitados de diversos colorantes para detectar y distinguir las aminas terciarias de las secundarias y las primarias e incluso entre las aminas terciarias entre sí encontrando diferencias para discriminarlas.

A efectos comparativos se procedió a elegir un número de aminas como ejemplos representativos por ser de las más importantes ahora mismo en el terreno de su detección por los peligros e interés farmacológico, sanitario, etc. que conllevan. Así se elaboró una lista de 14 aminas que se muestra en la figura 13 y se describen a continuación:

1692-1699. (e) Gomez, T.; Moreno, D.; de Grenu, B. D.; Fernandez, A. C.; Rodriguez, T.; Rojo, J.; Cuevas, J. V.; Torroba, T. *Chem-Asian J* **2013**, *8*, 1271-1278. (f) Moreno, D.; Cuevas, J. V.; Garcia-Herbosa, G.; Torroba, T. *Chemical Communications* **2011**, *47*, 3183-3185. (g) Moreno, D.; de Grenu, B. D.; Garcia, B.; Ibeas, S.; Torroba, T. *Chemical Communications* **2012**, *48*, 2994-2996.

²⁸ Eckenhoff, W. T.; Eisenberg, R. *Dalton T* **2012**, *41*, 13004-13021.

²⁹ (a) Shimidzu, T.; Iyoda, T.; Koide, Y. *J Am Chem Soc* **1985**, *107*, 35-41. (b) Lazarides, T.; McCormick, T.; Du, P. W.; Luo, G. G.; Lindley, B.; Eisenberg, R. *J Am Chem Soc* **2009**, *131*, 9192-9194. (c) McCormick, T. M.; Calitree, B. D.; Orchard, A.; Kraut, N. D.; Bright, F. V.; Detty, M. R.; Eisenberg, R. *J Am Chem Soc* **2010**, *132*, 15480-15483. (d) Han, Z. J.; McNamara, W. R.; Eum, M. S.; Holland, P. L.; Eisenberg, R. *Angew Chem Int Edit* **2012**, *51*, 1667-1670.

³⁰ Volke, J.; Liška, F. *Electrochemistry in Organic Synthesis*; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, **1994**.

- Monocrotalina y retrorsina: estas aminas son alcaloides derivados de la familia de las pirrolizidinas. Son compuestos provenientes del metabolismo de algunas plantas y tienen efectos carcinogénicos en el ser humano.³¹ De esto se tratará más a fondo en el capítulo de las aplicaciones.
- Escopolamina: también conocida como hioscina es un alcaloide tropánico, metabolito secundario que se encuentra en las plantas de la familia de las solanáceas como por ejemplo, el estramonio. Es una droga altamente tóxica que actúa como depresor del sistema nervioso y del cerebro. También induce la dilatación de las pupilas, la contracción de los vasos sanguíneos, la reducción de las secreciones salival y estomacal y otros fenómenos resultado de la inhibición del parasimpático. Se usa como preventivo de las náuseas y vómitos por ejemplo después de una operación con anestesia general.³²
- Atropina: es un alcaloide tropánico, metabolito secundario que se extrae de la planta llamada belladona. Los efectos son similares a los de la escopolamina.
- Cocaína: es un alcaloide tropánico, metabolito secundario que se encuentra en la planta de la coca. Es un estimulante del sistema nervioso central y un supresor del apetito. Actúa mediante la inhibición de la recaptación de la serotonina, la norepinefrina y la dopamina; esto se traduce en mayores concentraciones de estos tres neurotransmisores en el cerebro. Es muy utilizado como droga recreativa y es la segunda más consumida en el mundo después del cannabis.³³
- Brucina: es un alcaloide que se encuentra en la nuez vómica. Es un compuesto neurotóxico que tiene efectos similares a la estricnina, que ha sido utilizada como veneno para animales.³⁴
- Vincamina: es un alcaloide con actividad vasodilatadora que se extrae de la planta Vinca minor. La vincamina facilita la circulación a nivel cerebral.³⁵
- Yohimbina: es un alcaloide indol extraído de la corteza del árbol *Pausinystalia johimbe* en África central. Se utiliza principalmente como tratamiento para la disfunción eréctil.³⁶
- Opiáceos: La morfina, codeína y el derivado sintético conocido como heroína son de gran interés por su efecto psicotrópico. Se tratará con más en profundidad en el capítulo siguiente de aplicaciones.
- Nicotina: es un alcaloide encontrado principalmente en la planta del tabaco. Es una sustancia estimulante y relajante dependiendo de la dosis y muy adictiva. También

³¹ EFSA. *EFSA J.* **2011**, 9 (11), 2406.

³² Ebert, U.; Siepmann, M.; Oertel, R.; Wesnes, K. a; Kirch, W. *J. Clin. Pharmacol.* **1998**, 38 (8), 720–726.

³³ Zimmerman, J. L. *Crit. Care Clin.* **2012**, 28 (4), 517–526.

³⁴ Teske, J.; Weller, J.-P.; Albrecht, U.-V.; Fieguth, A. *J. Anal. Toxicol.* **2011**, 35 (4), 248–253.

³⁵ Koch-Weser, J.; Cook, P.; James, I. *N. Engl. J. Med.* **1981**, 305 (26), 1560–1564.

³⁶ a) Millan, M. J.; Newman-Tancredi, A.; Audinot, V.; Cussac, D.; Lejeune, F.; Nicolas, J.-P.; Cogé, F.; Galizzi, J.-P.; Boutin, J. A.; Rivet, J.-M.; Dekeyne, A.; Gobert, A. *Synapse* **2000**, 35 (2), 79–95. b) Saenz de Tejada, I.; Kim, N. N.; Goldstein, I.; Traish, A. M. *Int. J. Impot. Res.* **2000**, 12 (s1), S20–S25.

puede producir disminución de peso por su efecto de eliminación del apetito y aumento del metabolismo.³⁷

- TEOA y DEOA: se escogieron como ejemplos sencillos de una amina terciaria y otra secundaria similar a la terciaria para usarlas como patrones en los experimentos realizados.

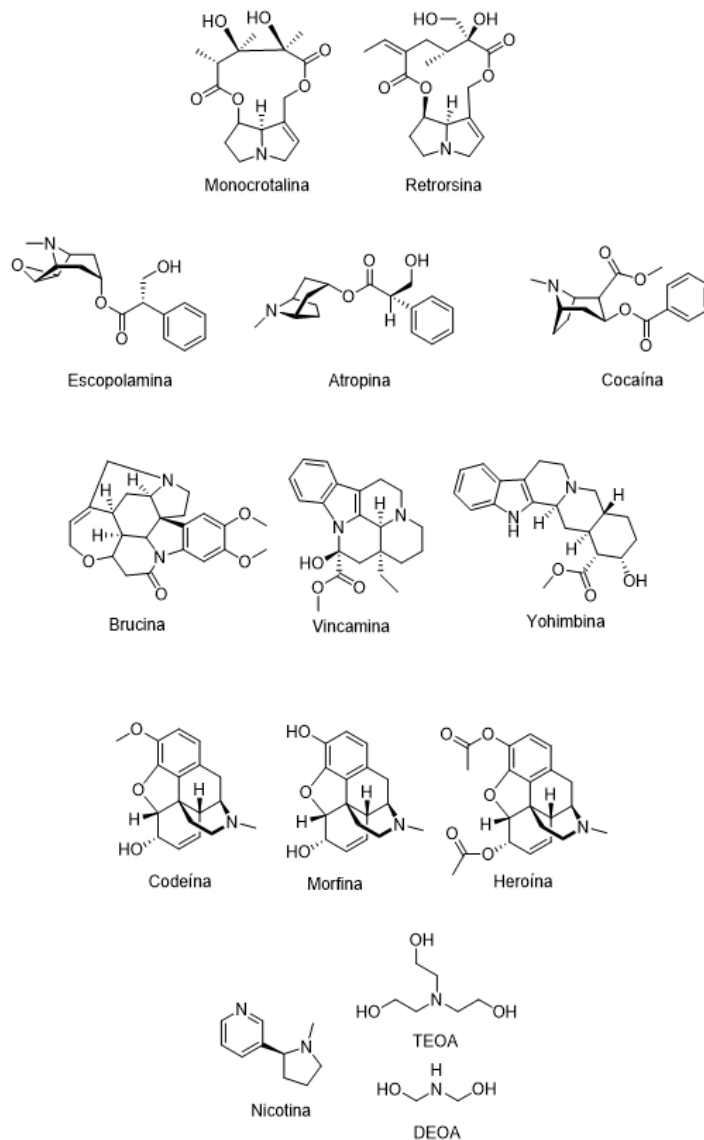


Figura 13. Estructuras de las 14 aminas estudiadas.

³⁷ Chen, H.; Vlahos, R.; Bozinovski, S.; Jones, J.; Anderson, G. P.; Morris, M. J. *Neuropsychopharmacology* **2004**, 30 (4), 713–719.

1.2. Primeros experimentos para la de detección de aminas terciarias

Para iniciar el estudio de la utilización de estados excitados en la detección de aminas terciarias se llevaron a cabo experimentos que consistían en la mezcla de una serie de reactivos. Inicialmente fueron: $[\text{Ru}(\text{bipy})_3]\text{Cl}_2$ + metil viológeno también conocido como paraquat (PQ^{2+}) + trietanolamina (TEOA), todo ello disuelto en agua.

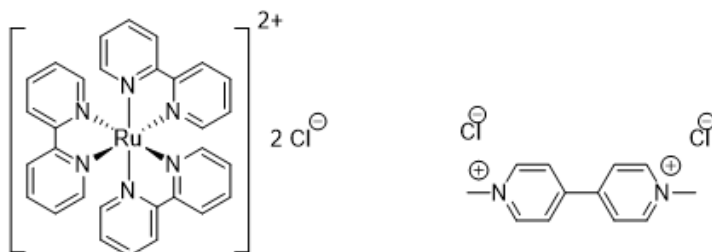


Figura 14. Estructuras moleculares de $[\text{Ru}(\text{bipy})_3]\text{Cl}_2$ y paraquat.

El modo de detección propuesto se basa en el sistema de tres componentes para la producción de hidrógeno mediante descomposición fotoquímica de agua, desarrollado por Kalyanasundaram, K et al³⁸, en el cual se usa $[\text{Ru}(\text{bipy})_3]\text{Cl}_2$ como cromóforo y TEOA como dador de electrones de sacrificio.

La innovación de esta propuesta con respecto al sistema de producción de hidrógeno consiste en que mientras en la producción de hidrógeno el dador de sacrificio se utiliza en grandes cantidades, aquí la amina terciaria se encuentra en muy pequeña concentración, como es natural para un proceso de detección y análisis. La detección se basa en la aparición de color correspondiente a la reducción del metil viológeno que pasa de ser incoloro a tener un color azul. Así, por absorbancia, se puede seguir la aparición de este compuesto en su forma reducida con el objetivo de comprobar si es proporcional o tiene correlación con la cantidad de amina en disolución tanto para la detección como para la cuantificación de esta.

El procedimiento experimental que se realizó fue el siguiente:

La reacción comienza con la iluminación de la disolución consiguiendo la formación del estado excitado del complejo de rutenio como se ilustra en la Figura 15. El estado excitado se apaga por oxidación transfiriendo un electrón al paraquat PQ^{2+} reduciéndolo a PQ^+ que es de color azul. El complejo de rutenio oxidado $[\text{Ru}(\text{bipy})_3]^{3+}$ regresa al estado de oxidación anterior $[\text{Ru}(\text{bipy})_3]^{2+}$ oxidando la amina terciaria que descompone rápidamente (Esquema 1). Así el

³⁸ Kalyanasundaram, K.; Kiwi, J.; Gratzel, M. *Helv. Chim. Acta* **1978**, 61 (7), 2720–2730.

complejo de rutenio queda regenerado y puede volver a excitarse con la luz y ceder un electrón de nuevo. Esto se seguirá produciendo siempre y cuando siga habiendo amina terciaria en disolución y no se haya reducido todo el paraquat.

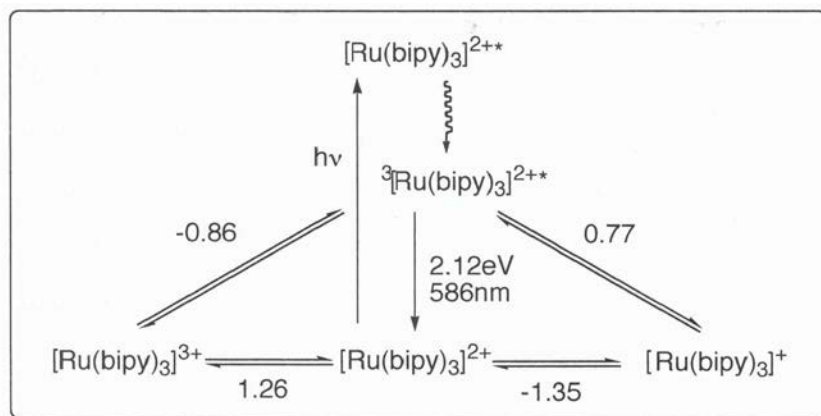
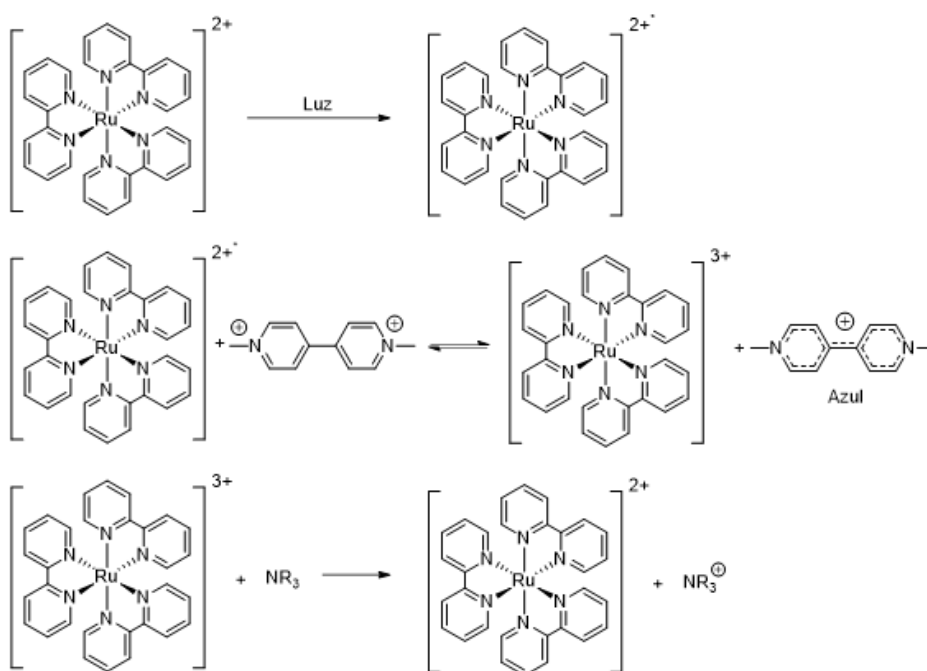


Figura 15. Esquema de los estados de oxidación del complejo de rutenio, así como el estado excitado que presenta. Los números entre los distintos estados de oxidación representan los potenciales de reducción en V.



Esquema 1. Reacciones implicadas en el sistema de detección basado en $[Ru(bipy)_3]^{2+}$, PQ y TEOA; todo ello disuelto en agua.

40 | Capítulo 1. Colorantes para la detección de aminas terciarias

La diferencia entre la disolución inicial y la que contiene el metil viológeno reducido queda reflejada en la figura 16.



Figura 16. Fotografía de dos tubos de ensayo conteniendo el primero a la izquierda contiene la disolución con los tres componentes antes de iluminar y a la derecha el tubo después de iluminar.

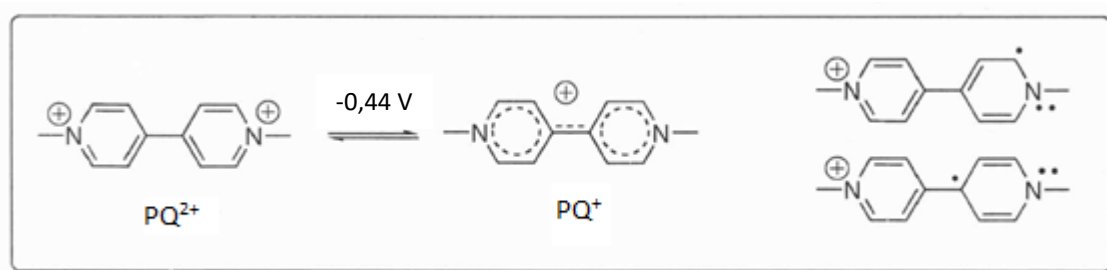


Figura 17. Paraquat en sus dos estados de oxidación implicados en el sistema.

La amina terciaria es llamada dador de electrones de sacrificio porque es un reactivo que se consume en el sistema permitiendo regenerar $[\text{Ru}(\text{bipy})_3]^{2+}$ al tiempo que impide que la reacción $[\text{Ru}(\text{bipy})_3]^{3+} + \text{PQ}^+$, termodinámicamente muy favorable, tenga lugar.¹⁷ Después de la oxidación la amina acaba sufriendo un proceso de descomposición dando como resultado una amina secundaria y un aldehído como se ilustra en la figura 18.

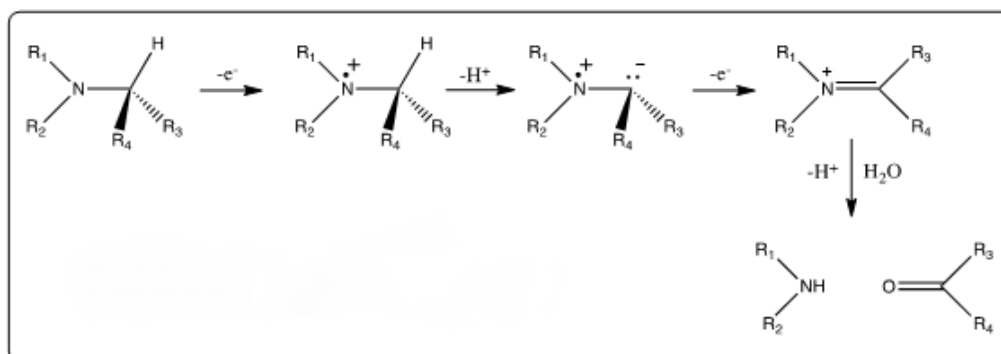
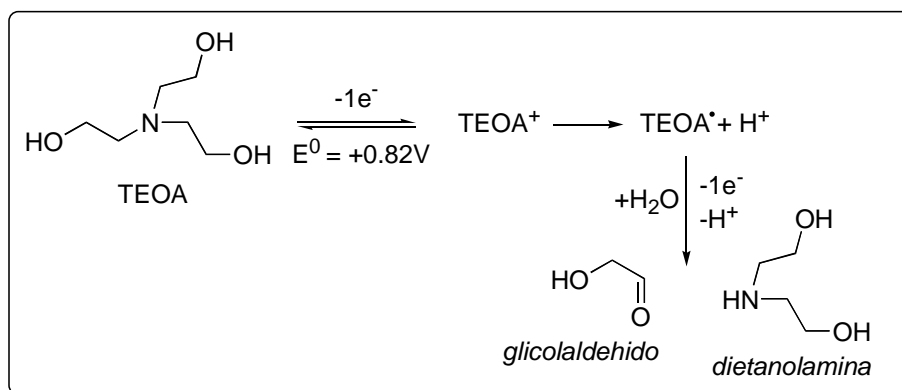


Figura 18. Descomposición de la trietanolamina (válido para cualquier alquilamina terciaria en general) como consecuencia de su oxidación en este proceso.³⁹

En una primera aproximación, los experimentos iniciales fueron realizados con concentraciones altas de paraquat y sobre todo de amina para comprobar visualmente la reacción y el cambio de color del paraquat. Los valores usados fueron $2,5 \cdot 10^{-5}$ M para el complejo de rutenio, paraquat 10^{-3} M y trietanolamina 0,1 M. Con estas concentraciones se pone la disolución bajo luz solar y en poco tiempo comienza la aparición del color azul de la reducción del paraquat. Midiendo esta muestra en un espectrofotómetro de absorción se encuentran dos picos característicos para este compuesto que son a 395 nm y a 603 nm. El problema es que a estas concentraciones al detector no llega apenas luz dando valores de absorbancia elevados ($\epsilon_{603} = 13700 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)⁴⁰ y no permite hacer mediciones, por lo que se procedió a disminuir la concentración de paraquat.

³⁹ Smith, P. J.; Mann, C. K. J. *Org. Chem.* **1969**, 34 (6), 1821–1826.

⁴⁰ Watanabe, T.; Honda, K. J. *Phys. Chem.* **1982**, 86 (14), 2617–2619.

42 | Capítulo 1. Colorantes para la detección de aminas terciarias

Para no tener que depender de la luz solar se usó una lámpara halógena en el proceso de iluminación y se comprobó que funcionaba de la misma forma. Se redujo diez veces la concentración de paraquat pero se encontró que la formación de color azul (PQ^+) tardaba mucho más tiempo y además, pequeñas cantidades de oxígeno disuelto en el agua oxidan al PQ^+ formado debiendo desaparecer el oxígeno para poder apreciar el color azul. Esto se solucionó trabajando bajo atmósfera de nitrógeno. Las disoluciones azules que contienen el paraquat reducido se decoloran cuando se agitan al aire.

Tras estos resultados se intercambiaron la TEOA por otras aminas para comprobar si tenía lugar la reacción: 1,4-bis(2-hidroxietil)piperazina, 1-metil-2-piperidinmetanol, 1-dimetilamino-2-propanol, (dimetilamino)acetona, piperidina, anilina, trietilamina, dipropilamina, dietanolamina, dietilamina, DABCO (1,4-diazabicyclo[2.2.2]octano), trifetilamina, diisopropil etil amina, tertbutilamina, etanolamina, trietanolamina, DBU (1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno), DBN (1,5-Diazabicyclo[4.3.0]non-5-eno) y DMAP(4-Dimetilaminopiridina). Así, se llegó a la conclusión de que la reacción funcionaba bien con las aminas terciarias sin impedimento estérico, peor con todas las secundarias y con las terciarias con impedimento y finalmente, ni las aminas primarias ni las aromáticas provocaban la reacción.

Estudiando la influencia del pH se observó que la reacción transcurre mejor en medio básico y que no funciona en medio ácido, lo que puede entenderse si consideramos que las aminas se encuentran protonadas y pierden su capacidad como dadoras de electrones. Por otro lado, el medio fuertemente básico inhibe también la reacción probablemente por descomposición de los compuestos implicados.

La reacción se siguió también observando la luminiscencia del complejo de rutenio. Para ello, las condiciones experimentales usadas fueron $\lambda_{exc} = 452 \text{ nm}$ y $\lambda_{em} \approx 592 \text{ nm}$. Sin embargo, no fue posible porque el paraquat reducido (PQ^+) absorbe la emisión del complejo de $[Ru(bipy)_3]^{2+*}$ y por lo tanto no sirve como método de detección.

1.2.1. Uso de diferentes compuestos como cromóforos y aceptores de electrones

En sustitución del paraquat PQ^{2+} como posible aceptor de electrones del complejo de rutenio, se probó a usar $K_3[Fe(CN)_6]$. El problema que surge es que la longitud de onda a la que se produce la absorción del anión hexacianoferrato(III) coincide con la del complejo de rutenio no permitiendo la formación del estado excitado de un modo eficaz.

Con el fin de superar las dificultades encontradas se procedió a cambiar el complejo de rutenio por eosina Y o eritrosina. Estos compuestos son interesantes ya que son colorantes orgánicos de la familia de los xantenos que exhiben luminiscencia y que también se han utilizado

en procesos de fotosíntesis artificial⁴¹ y producción de hidrógeno⁴² y cuyo estado excitado debería funcionar como el del complejo de rutenio reduciendo el paraquat.

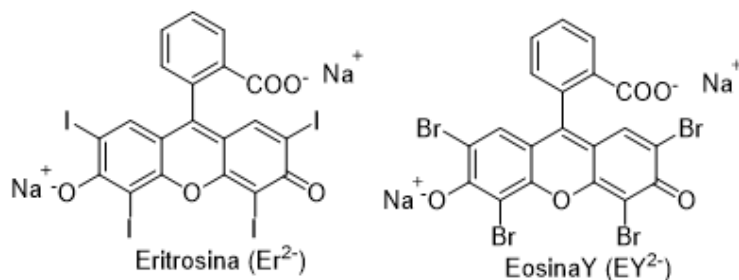


Figura 19. Estructura de la eritrosina y de la eosina Y. Colorantes orgánicos usados en los experimentos.

La ruta que siguen estos colorantes para esta nueva reacción puede ser de dos tipos, reductora u oxidante, llegando al final a los mismos productos como se puede ver en la siguiente figura.⁴³

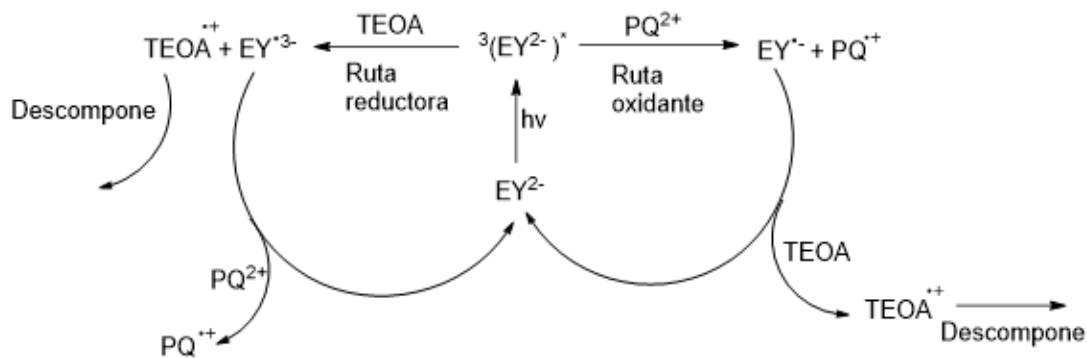


Figura 20. Dos caminos posibles para la reacción entre el paraquat y la eosina Y en presencia de TEOA.

Sabiendo esto se procedió a iluminar en las mismas condiciones y concentraciones que las utilizadas para el complejo $[Ru(bipy)_3]^{2+}$ y se comprobó que en principio no funcionaba bien

⁴¹ McCormick, T. M.; Calitree, B. D.; Orchard, A.; Kraut, N. D.; Bright, F. V.; Detty, M. R.; Eisenberg, R. J. *Am. Chem. Soc.* **2010**, *132* (44), 15480–15483.

⁴² Lazarides, T.; McCormick, T.; Du, P.; Luo, G.; Lindley, B.; Eisenberg, R. J. *Am. Chem. Soc.* **2009**, *131* (26), 9192–9194.

⁴³ Islam, S. D.-M.; Konishi, T.; Fujitsuka, M.; Ito, O.; Nakamura, Y.; Usui, Y. *Photochem. Photobiol.* **2007**, *71* (6), 675–680.

44 | Capítulo 1. Colorantes para la detección de aminas terciarias

y apenas se producía el paraquat reducido y que se necesitaba más tiempo que con el complejo de rutenio. Por ello, y antes de abandonar el experimento, se probó a sustituir otra vez el paraquat por hexacianoferrato(III) de potasio, pero no se observó el cambio de color esperado. Para comprobar si se trataba de una reacción lenta, se mantuvo la iluminación con la lámpara halógena durante 15 minutos apreciándose entonces la aparición de fluorescencia intensa de color verde. Esta luminiscencia fue inesperada, por lo que se requería de un estudio en más profundidad. Para investigar con detalle este asunto se diseñaron nuevos experimentos con el objetivo de determinar la causa de este suceso.

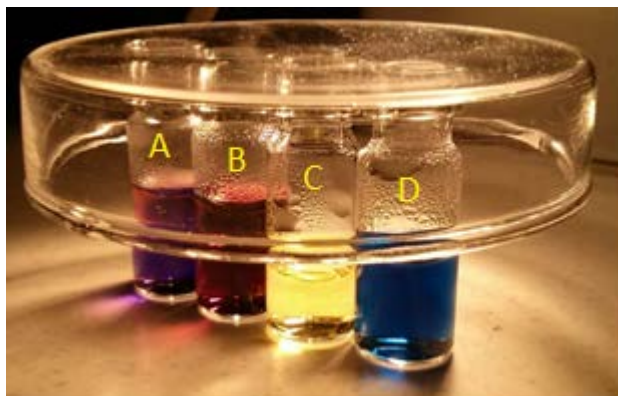


Figura 21. Cuatro viales después de iluminarlos mediante una lámpara halógena. Contienen trietanolamina y: A) eosina Y y PQ^{2+} , B) Eritrosina y PQ^{2+} , C) $[Ru(bipy)_3]^{2+}$ y D) $Ru(bipy)_3]^{2+}$ y PQ^{2+} .

El procedimiento consistió en iluminar disoluciones de todas las posibles combinaciones de los cuatro reactivos (eosina Y, PQ^{2+} , $K_3[Fe(CN)_6]$ y TEOA) tomados de dos en dos y de tres en tres. Sorprendentemente al iluminar la mezcla de trietanolamina y eosina Y en unos pocos minutos de irradiación la disolución pasaba de un color naranja a otro verde. Los colores apreciados, antes, durante y después de la irradiación dependen de la absorción y de la emisión de las especies presentes en cada momento y la interpretación de los cambios de color que se producen será tratada con más detalle más adelante.

Con el fin de determinar si los resultados descritos anteriormente podían ser útiles para detectar aminas terciarias se tomaron tres viales conteniendo el colorante y una amina primaria, una secundaria y una terciaria respectivamente (figura 22). La posterior iluminación de disoluciones de eosina Y en agua (10^{-4} M) en presencia de trietanolamina (0,1M) produce un cambio desde un color naranja a otro entre amarillo y verde (vial 3 en las fotografías). En estas condiciones, el vial 1 que contiene etanolamina no cambia y el 2 que contiene dietanolamina cambia, pero muy despacio. Estos resultados parecían apropiados para diseñar un

procedimiento adecuado para discernir aminas terciarias, de secundarias y primarias y constituyen el cuerpo de este trabajo de tesis doctoral.

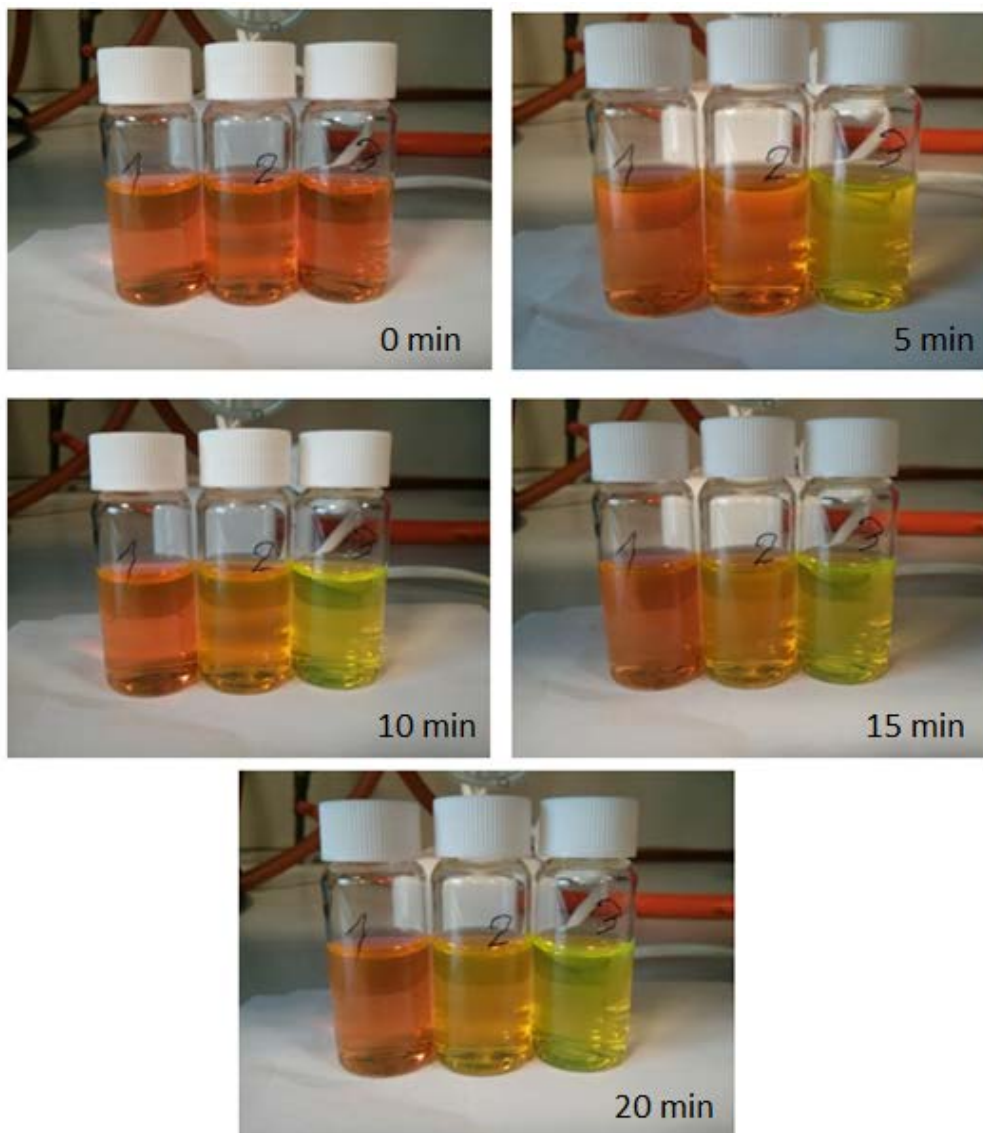


Figura 22. Cinco fotografías a tiempos 0, 5, 10, 15 y 20 minutos de irradiación con luz visible con una lámpara halógena comercial de 50 W de disoluciones acuosas de eosina Y (10^{-4} M) y etanolamina (EOA) (vial 1), dietanolamina (DEOA) (vial 2) y trietanolamina (TEOA) (vial 3), las tres 0,1 M.

Con estos resultados obtenidos lo próximo que se hizo fue estudiar la reacción que tenía lugar para entender mejor estos cambios de color y fluorescencia. Después se investigó acerca

de la influencia que tienen factores como son el pH, la concentración, el tipo de aminas, etc. con el fin de optimizar el método y estudiar todas las posibilidades analíticas que tiene.

1.3. Estudio teórico mediante cálculos mecanocuánticos

Para entender mejor el porqué de la diferencia de reactividad del colorante con las aminas al iluminar se procedió a realizar cálculos DFT a nivel de teoría B3LYP/6-31G(d). Con esto se quiere estudiar estructural y energéticamente la diferencia que existe en la reacción al iluminar, debido al mejor funcionamiento con las aminas terciarias que con las secundarias y estas mejor que las primarias. Para este estudio se compararán tres aminas simples como ejemplo como son trimetilamina, dimetilamina y metilamina.

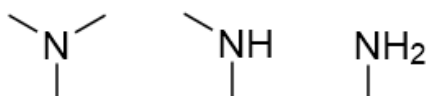


Figura 23. Estructura de las tres aminas a comparar.

Primero se optimizaron las geometrías de las tres aminas. Después se optimizó también la geometría invertida para poder optimizar el estado de transición de esta inversión y calcular la barrera de energía que lleva este proceso. Esto se realizó usando un cálculo QST2 a un nivel de teoría B3LYP/6-31G(d). La siguiente figura muestra las diferentes geometrías optimizadas.

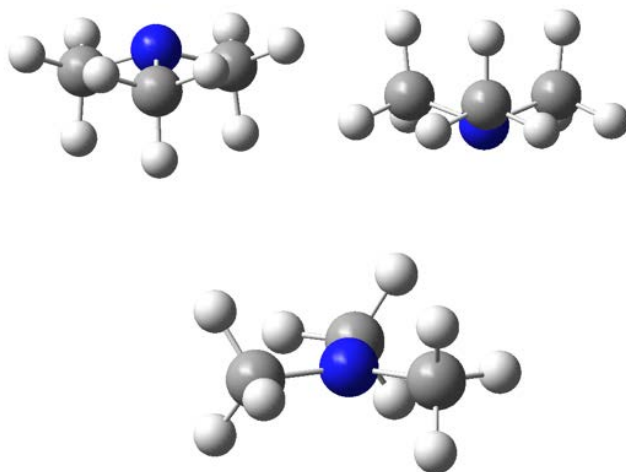


Figura 24. Estructuras para la trimetilamina. Arriba las geometrías de menor energía del estado fundamental. Abajo el estado de transición plano.

Se conoce que para la oxidación de la amina la geometría del radical catiónico formado es la de un plano trigonal.⁴⁴ Por esta razón se optimizó también la geometría para este radical y se hallaron las energías de estas geometrías. La siguiente tabla recoge los valores obtenidos para las distintas geometrías.

Amina	ΔG estado fundamental (kcal/mol)	ΔG estado de transición (kcal/mol)	ΔG radical (kcal/mol)
Trimetilamina	-109433,17	-109427,73	-109263,22
Dimetilamina	-84780,82	-84776,63	-84599,31
Metilamina	-60129,45	-60125,44	-59931,16

Amina	Diferencia estado fundamental-transición (kcal/mol)	Diferencia estado transición-radical (kcal/mol)	Diferencia total (kcal/mol)
Trimetilamina	5,44	164,52	169,95
Dimetilamina	4,19	177,32	181,51
Metilamina	4,01	194,28	198,29

Tabla 1. Valores de energía para las geometrías de las diferentes aminas. Estos valores obtenidos del estado fundamental y transición no son reales y solo sirven para realizar comparaciones como las realizadas en las diferencias de estados y total.

Los valores obtenidos concuerdan con lo observado experimentalmente ya que la energía total para oxidar la trimetilamina es menor que para la dimetilamina y esta menor que para la metilamina. Los valores de los potenciales encontrados en bibliografía también apoyan esta teoría: 0,82 V para la trimetilamina, 1,03 V para la dimetilamina y 1,23 V para la metilamina.²² En la tabla se puede observar también que la etapa determinante es la de la oxidación ya que la energía de formación del estado de transición es muy pequeña comparada con esta.

⁴⁴ Chow, Y. L.; Danen, W. C.; Nelsen, S. F.; Rosenblatt, D. H. *Chem. Rev.* **1978**, *78* (3), 243–274.

Los cálculos DFT se llevaron a cabo con la revisión D.01 de Gaussian 09,⁴⁵ utilizando el funcional de intercambio-correlación B3LYP,^{46,47} junto con juegos de bases 6-31G(d). Se optimizaron las geometrías de los estados fundamentales (S_0) y de los estados de transición además de los cationes radicales. Todos los cálculos se llevaron a cabo en fase gas a 1 atm y 298 K.

1.4. Estudio de la reacción fotoquímica entre el colorante y la amina.

Para comprender y explicar las reacciones que tienen lugar cuando se irradia con luz visible disoluciones que contienen TEOA y eosina Y se procedió a observar los cambios de color mediante las técnicas espectroscópicas de absorción (UV-VIS) y de emisión (espectrofotómetro de fluorescencia). Se decidió usar como longitud de onda de excitación común para todos los experimentos 495 nm para poder comparar los resultados de todos los colorantes, ya que es el máximo de excitación observado para el producto formado en la reacción mediante una primera prueba de caracterización del mismo.

Los primeros intentos de aplicar la espectrofotometría UV-VIS al estudio del sistema rápidamente indicaron que no era la técnica adecuada para abordar la detección de aminas por los pequeños valores de absorbancia obtenidos. Por su parte, la fluorescencia es mucho más sensible y fue la opción escogida. Las disoluciones acuosas que contienen eosina Y exhibían una fluorescencia a $\lambda_{em}=536$ nm y después de la iluminación se produce un desplazamiento de la emisión desde los 536 nm hasta los 515 nm aproximadamente con un aumento apreciable de la intensidad de la emisión como muestra la figura 25.

⁴⁵ Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Scalmani, G.; Barone, V.; Mennucci, B.; Petersson, G. A.; Nakatsuji, H.; Caricato, M.; Li, X.; Hratchian, H. P.; Izmaylov, A. F.; Bloino, J.; Zheng, G.; Sonnenberg, J. L.; Hada, M.; Ehara, M.; Toyota, K.; Fukuda, R.; Hasegawa, J.; Ishida, M.; Nakajima, T.; Honda, Y.; Kitao, O.; Nakai, H.; Vreven, T.; Montgomery, Jr., J. A.; Peralta, J. E.; Ogliaro, F.; Bearpark, M.; Heyd, J. J.; Brothers, E.; Kudin, K. N.; Staroverov, V. N.; Keith, T.; Kobayashi, R.; Normand, J.; Raghavachari, K.; Rendell, A.; Burant, J. C.; Iyengar, S. S.; Tomasi, J.; Cossi, M.; Rega, N.; Millam, J. M.; Klene, M.; Knox, J. E.; Cross, J. B.; Bakken, V.; Adamo, C.; Jaramillo, J.; Gomperts, R.; Stratmann, R. E.; Yazyev, O.; Austin, A. J.; Cammi, R.; Pomelli, C.; Ochterski, J. W.; Martin, R. L.; Morokuma, K.; Zakrzewski, V. G.; Voth, G. A.; Salvador, P.; Dannenberg, J. J.; Dapprich, S.; Daniels, A. D.; Farkas, O.; Foresman, J. B.; Ortiz, J. V.; Cioslowski, J.; Fox, D. J. *Gaussian 09*, **2009**.

⁴⁶ Becke, A. D. *J. Chem. Phys.* **1993**, *98*, 5648.

⁴⁷ Lee, C. T.; Yang, W. T.; Parr, R. G. *Phys. Rev. B* **1988**, *37*, 785.

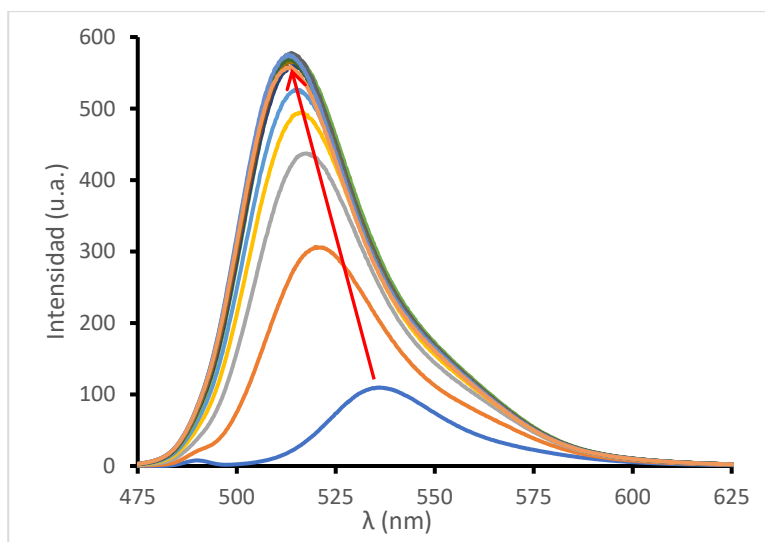


Figura 25. Aumento de la intensidad y desplazamiento del pico de emisión en una disolución de eosina Y 10^{-4} M, TEOA 0,1 M al iluminar con luz visible durante 5 minutos con una lámpara halógena comercial de 50 W.

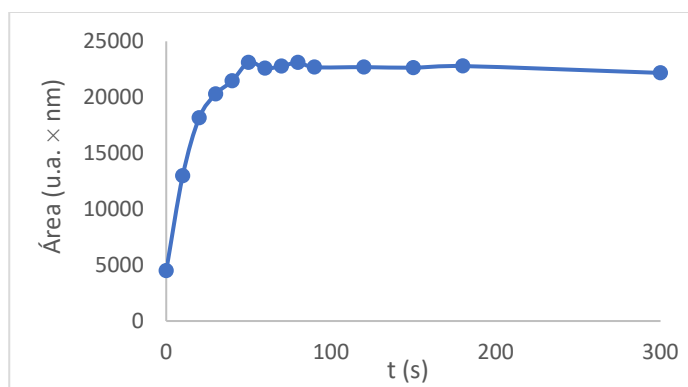


Figura 26. Representación del área (proporcional a la intensidad) de cada curva de la gráfica de la figura 14 con respecto al tiempo de iluminación.

Cuando se intentó reproducir el experimento anterior reduciendo las concentraciones de amina se producía la decoloración de la disolución y la disminución de la luminiscencia como se aprecia en la figura 27.

Esto ocurre para concentraciones de amina menores de 10^{-4} M y tras analizarlo se llegó a la conclusión de que es debido a la presencia de oxígeno en concentraciones similares a la de la amina (la solubilidad del oxígeno en agua alcanza una concentración aproximada de $2,8 \cdot 10^{-4}$

50 | Capítulo 1. Colorantes para la detección de aminas terciarias

M a 20°C)⁴⁸ ya que este oxígeno interacciona con el estado excitado triplete de la molécula para formar oxígeno en estado singlete.⁴⁹ El oxígeno singlete es una especie muy oxidante que a falta de otra especie que lo pueda eliminar acaba atacando al colorante oxidándolo y dejándolo inservible como muestra la gráfica de debajo. Debido a este hecho se hizo evidente que para la obtención de resultados con éxito se hacía preciso trabajar en atmósfera inerte.

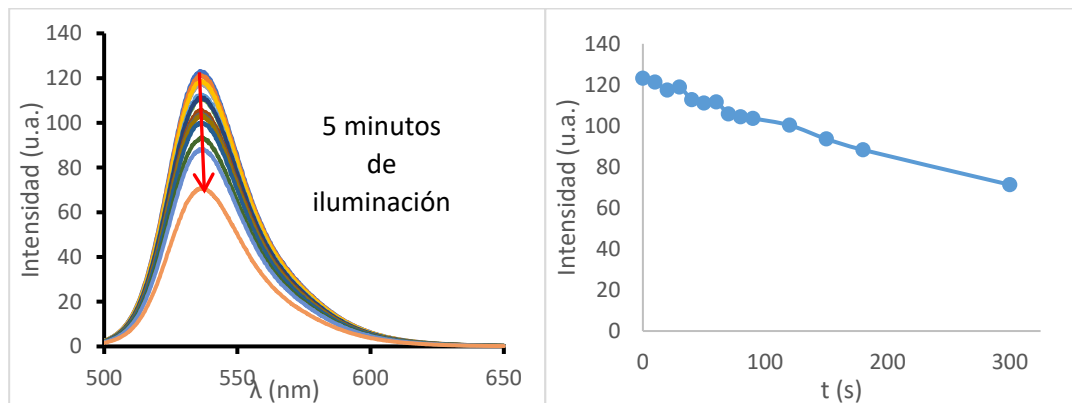


Figura 27. Apagado de la intensidad de fluorescencia de la disolución de eosina Y con TEOA en medio básico al iluminar. La gráfica de debajo corresponde a la representación de la intensidad de cada curva medida frente al tiempo de iluminación.

El siguiente paso fue llevar a cabo experimentos que permitiesen interpretar la reacción o reacciones químicas que tenían lugar provocando el aumento de la intensidad de la luminiscencia. A simple vista se aprecia un cambio de color desde una disolución de color naranja a otra de color verde y con fluorescencia evidente. Mediante el fluorímetro se constata dicha observación como se mostró en la figura 25. El aspecto de la nueva fluorescencia surgida es muy semejante al que exhibe la fluoresceína, molécula perteneciente también a la familia de los xantenos, lo que posteriormente se comprobó que era el producto de la reacción. Para transformar la eosina en fluoresceína se debe producir la deshalogenación total de los cuatro átomos de bromo que posee la molécula. Para comprobar ese hecho se realizaron una serie de experimentos que no dejan duda de este resultado.

Un primer experimento consistió en añadir AgBF_4 a la disolución una vez finalizada la iluminación de la reacción. Se observó entonces la aparición de un precipitado blanco de AgBr

⁴⁸ R. Battino, Ed., IUPAC Solubility Data Series, Vol. 7, Oxygen and Ozone, Pergamon Press, Oxford, England, **1981**.

⁴⁹ A) Gandin, E.; Lion, Y.; Van de Vorst, A. *Photochem. Photobiol.* **1983**, 37 (3), 271–278. b) Amat-Guerri, F.; López-González, M. M. C.; Martínez-Utrilla, R.; Sastre, R. *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* **1990**, 53 (2), 199–210.

confirmando que la eosina Y había liberado aniones bromuro. Con fines comparativos y buscando el sistema más sensible, se procedió entonces a utilizar otro colorante de la familia de los xantenos como es la eritrosina, similar a la eosina Y y en la que los de bromo han sido sustituidos por átomos de yodo. La reacción, aunque más lenta como se podrá ver con posterioridad, también funcionaba y se llegaba a un resultado similar. La adición de AgBF_4 proporcionaba en este caso el precipitado esperado de AgI. Para caracterizar adicionalmente la presencia de yoduro se utilizó la reacción del Lugol⁵⁰ que se basa en la aparición de un color azul oscuro causado por la complejación de anión triyoduro con la estructura del almidón. Después de iluminar la reacción se añadió almidón y un poco de yodo que en presencia de los aniones de yoduro que había liberado la eritrosina, formaron triyoduro soluble en agua y fueron complejados por el almidón apareciendo el color oscuro que indica la formación de este complejo.

Para intentar caracterizar mejor todos los productos de la reacción se llevó a cabo una reacción a mayor escala (ver Figura 28). En un matraz de 1 l se prepara una disolución acuosa de 500 ml de eritrosina 10^{-4}M y TEOA $5 \cdot 10^{-4}\text{M}$ y se le pasa argón. Se ilumina durante media hora y se elimina el disolvente en el rotavapor.



Figura 28. Matraz con eritrosina 10^{-4}M y TEOA $5 \cdot 10^{-4}\text{M}$ antes y después de iluminar. Pasa de un color naranja de la eosina Y a uno amarillo verdoso de la fluoresceína.

Mediante la realización de los espectros de ^1H RMN antes y después de iluminar (Figura 29) se comprobó que se obtenía fluoresceína en la reacción ya que, aunque el color, la fluorescencia y la pérdida de los halógenos llevan directamente a pensar que este es el producto

⁵⁰ Martín-Sánchez, M.; Martín-Sánchez, M. T.; Pinto, G. *Educ. Química* **2013**, *24* (1), 31–36.

era necesario para afirmar que es fluoresceína como tal. Además, se hicieron experimentos iluminando durante menos tiempo y se observó por ^1H RMN la presencia de productos intermedios de deshalogenación parcial.

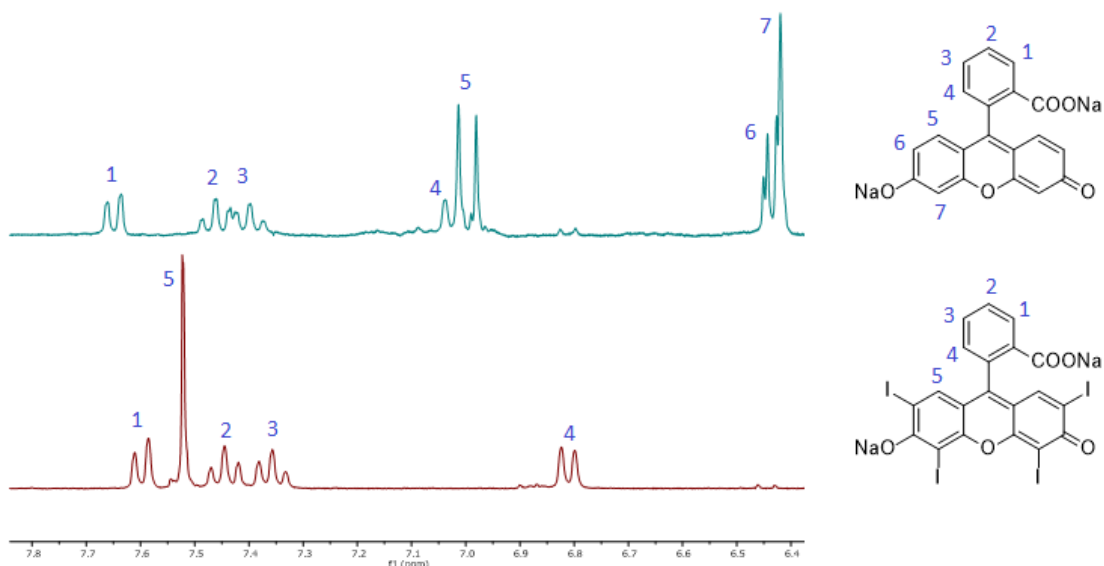


Figura 29. Espectro de RMN de ^1H realizados en D_2O . Abajo el espectro de la eritrosina antes de reaccionar y arriba después de reaccionar apreciándose elevada conversión a fluoresceína.

De este modo se confirmó la reacción de deshalogenación que en el caso de partir de eosina Y o de eritrosina conduce a fluoresceína; cuando se parte de floxina o de rosa bengal (Figura 30) ocurre la misma reacción (deshalogenación en el esqueleto xanteno) obteniéndose los derivados correspondientes que conservan los átomos de cloro en el anillo del grupo carboxilo.

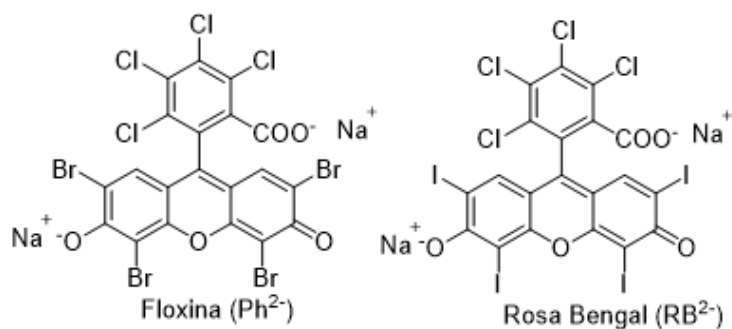


Figura 30. Estructura de las moléculas de floxina y rosa bengal.

La fluoresceína se conoce desde 1871, sintetizada por primera vez por Johann Friedrich Wilhelm Adolf von Baeyer que fue galardonado con el premio nobel de química en 1905. Los colorantes relacionados con la fluoresceína tienen un esqueleto común llamado xanteno (Figura 20) que es el responsable de las propiedades luminiscentes.

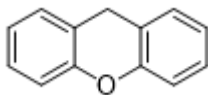


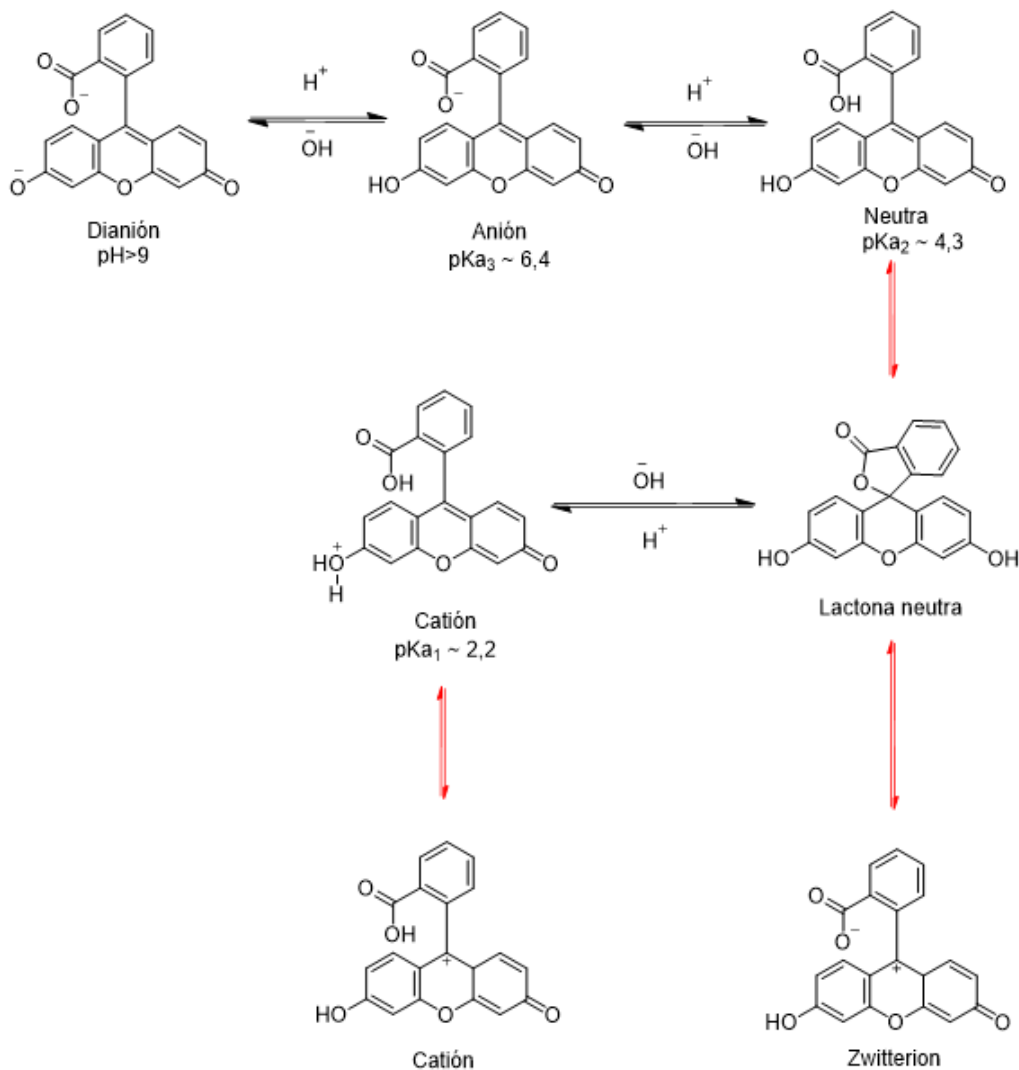
Figura 31. Estructura del esqueleto de los xantenos.

La fluoresceína está ampliamente estudiada y tiene ventajas frente a otros compuestos ya que tiene buenos rendimientos cuánticos (la proporción entre el número de fotones emitidos y el de fotones absorbidos) en medios acuosos, permitiendo su uso en medios biológicos,⁵¹ aunque su comportamiento tiene una dependencia en función del pH debido a las modificaciones de estructura y enlace que se producen. Así, por ejemplo, en condiciones ácidas ($2 < \text{pH} < 4$) existe la forma lactona que inhibe sus propiedades luminiscentes y es insoluble en agua. En el esquema 2 se muestran las diferentes especies que presenta la fluoresceína en medio acuoso dependiendo del pH.⁵² Como consecuencia, al variar el valor del pH se altera la absorbancia y la fluorescencia de este compuesto y en la tabla 2 se pueden encontrar los rendimientos cuánticos y la vida media de los estados excitados de estas especies. Esto también ocurre para los derivados halogenados de forma similar. Al aumentar el pH se produce un desplazamiento batocrómico (hacia el rojo) de la emisión y de la absorción.⁵³

⁵¹ Mottram L.F.; Boonyarattanakilin. S; Kovel R.E.; Peterson. B.R., *Org. Letters*, **2006**, 8, 581-584.

⁵² Martin M.M; Lindqvist L.J., *Journal of Luminescence*, **1975**, 10, 381-390.

⁵³ a) Diehl. H; Horchak-Morris N, *Talanta*, **1987**, 34, 739-741. b) Diehl. H; Markuszawsk R., *Talanta*, **1989**, 36, 416-418.



Esquema 2. Especies que presenta la fluoresceína disuelta en agua a diferentes valores de pH.

Especies	Rendimiento cuántico	Vida media (ns)
Dianión	0,93	4,06 ± 0,02
Anión	0,36	3,37 ± 0,02
Neutra	0,29	2,97 ± 0,02
Catión	0,9 - 1	3,5 – 4,44

Tabla 2. Rendimiento cuántico y vida media del estado excitado en agua para las diferentes especies de la fluoresceína en función del pH.⁵⁴

⁵⁴ Klonis N.; Sawyer W.H. *Journal of fluorescence*, 1996, 6, 147-157.

Como es lógico, para los colorantes derivados de la fluoresceína también se conocen los equilibrios ácido-base y los valores de pK_a se recogen en la Tabla 3.

Colorantes	pKa1	pKa2	pKa3
Eosina Y	<0	2,02 ^{a)} ; 2,48-2,77 ^{b)} ; 2,9 ^{c)}	3,80 ^{a)} ; 3,31-3,64 ^{b)} ; 4,5 ^{c)}
Eritrosina	<0	2,35 ^{a)} ; 3,79-3,92 ^{b)}	3,79 ^{a)} ; 4,0-5,16 ^{b)} ; 4,1 ^{c)}
Rosa bengal	<0	1,89 ^{a)} ; 3,9 ^{c)}	3,93 ^{a)} ; 4,7 ^{c)}

Tabla 3. Constantes de acidez para tres colorantes usados derivados de la fluoresceína.⁵⁵

También se muestran los valores de rendimiento cuántico de fluorescencia y tiempos de vida media del estado excitado para los otros colorantes en la tabla 4:

Colorantes	Rendimiento cuántico	Tiempo de vida media (ns)
Eosina Y	0,24	1,21
Eritrosina	0,047	0,24
Rosa bengal	0,019	0,10

Tabla 4. Rendimiento cuántico y vida media del estado excitado en agua a pH 7,4 para los diferentes colorantes.⁵⁶

Se ha encontrado también que para la eosina Y el rendimiento cuántico de formación del estado triplete en agua a temperatura ambiente es de $0,8 \pm 0,08$.⁵⁷ Se conoce también que el valor del rendimiento cuántico de fluorescencia disminuye como se puede ver en la tabla anterior según los átomos de halógenos unidos en el orden H>Br>I.⁵⁸

Estos derivados halogenados de la fluoresceína se conocen desde hace muchos años y han tenido varios usos. El colorante rosa bengal fue patentado en 1882 por Ghnem como un colorante de la lana. El nombre viene de la similitud del color con el punto que se pintaban las mujeres casadas en la región bengala de la India. Ha sido utilizado en medicina como agente de tinción y desinfectante.⁵⁹

⁵⁵ a) Batistela, V. R.; Pellosi, D. S.; de Souza, F. D.; da Costa, W. F.; de Oliveira Santin, S. M.; de Souza, V. R.; Caetano, W.; de Oliveira, H. P. M.; Scarminio, I. S.; Hioka, N. *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2011**, 79 (5), 889–897. b) Slyusareva, E. A.; Gerasimova, M. A. *Russ. Phys. J.* **2014**, 56 (12), 1370–1377. c) Sabnis R. W., *Handbook of biological dyes and stains*, **2010**, Wiley.

⁵⁶ Zhang, X.-F.; Zhang, J.; Liu, L. *J. Fluoresc.* **2014**, 24 (3), 819–826.

⁵⁷ Penzkofer, A.; Beidoun, A.; Daiber, M. *J. Lumin.* **1992**, 51 (6), 297–314.

⁵⁸ Forster, L. S.; Dudley, D. *J. Phys. Chem.* **1962**, 66 (5), 838–840.

⁵⁹ Alexander, W. *P T* **2010**, 35 (8), 469–478.

56 | Capítulo 1. Colorantes para la detección de aminas terciarias

La eritrosina por su parte ha sido utilizada de diversas maneras como tinta de impresora, tinción para tejidos biológico colorante alimentario E-127 o incluso revelador de la placa dental.⁶⁰

La floxina se ha usado como agente bactericida principalmente de bacterias gram+.⁶¹

La eosina se usa como agente de tinción de tejidos en técnicas histológicas.

1.4.1. Deshalogenación fotoquímica

La deshalogenación fotoquímica de la eosina Y (18 μM) con TEOA (0,1 M) como dador de electrones fue publicada por vez primera en 1962 por Oster.⁶² La iluminación de eosina (10^{-5} M) en metanol (NaOH 0,2 M) también conduce a deshalogenación.⁶³ Hay varios artículos sobre la deshalogenación fotoquímica de los colorantes xantenos.⁶⁴ En todos se mencionan casos en los que la concentración del dador de electrones de sacrificio es mucho mayor que la del colorante. Sin embargo, la deshalogenación no se observa cuando se usa la amina primaria p-fenilendiamina como dador de electrones.⁶⁵ La irradiación de mezclas de eosina y metiltrietanolamina ha sido usada para inducir la polimerización de metilmetacrilato en presencia de una sal de yodonio; los autores observaron un incremento de la intensidad de la fluorescencia, pero no fue atribuido a la reacción de deshalogenación.⁶⁶

No solo se produce deshalogenación en estos colorantes sino en muchos otros compuestos orgánicos. Así se conoce que por ejemplo derivados halogenados de naftalenos o de bifenilos pueden ser deshalogenados mediante fotoinducción en presencia de trietilamina.⁶⁷ Además la velocidad de esta deshalogenación aumenta al usar disolventes más polares.⁶⁸ Esta reacción comienza con la formación de un exciplexo entre el compuesto orgánico halogenado en estado excitado y la amina.⁶⁹ Este exciplexo está favorecido por cuatro factores que son: la energía del estado excitado del compuesto, el potencial de reducción de ese estado excitado, el

⁶⁰ Wood, S. J. *Antimicrob. Chemother.* **2006**, 57 (4), 680–684.

⁶¹ Rasooly, R. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **2005**, 45 (2), 239–244.

⁶² Oster, G.; Karg, G.; Oster, G. K. *J. Phys. Chem.* **1962**, 66, 2514–2517.

⁶³ Kimura, K.; Miwa, T.; Imamura, M. *Chem. Commun.* **1968**, 1619–1621.

⁶⁴ A) Zwicker, E. F.; Grossweiner, L. I. *J. Phys. Chem.* **1963**, 67, 549–555. B) Mau, A. W. H.; Johansen, O.; Sasse, W. H. F. *Photochem. Photobiol.* **1985**, 41, 503–509. C) Shimidzu, T.; Iyoda, T.; Koide, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, 107 (1), 35–41.

⁶⁵ Kasche, V.; Lindqvist, L. *Photochem. Photobiol.* **1965**, 4, 923–933.

⁶⁶ Fouassier, J. P.; Chesneau, E. *Makromol. Chem.* **1991**, 192, 1307–1315.

⁶⁷ Davidson, R. S.; Goodin, J. W. *Tetrahedron Lett.* **1981**, 22 (2), 163–166.

⁶⁸ Beecroft, R. A.; Davidson, R. S.; Goodwin, D. *Tetrahedron Lett.* **1983**, 24 (50), 5673–5676.

⁶⁹ Nakayama, T.; Hanada, T.; Ibuki, K.; Hamanoue, K. *Chem. Phys. Lett.* **1993**, 209 (4), 367–371.

potencial de reducción de la amina y la capacidad del disolvente de estabilizar este excíplejo.⁷⁰ Otros autores hablan sobre la desactivación de la fluorescencia como consecuencia de las transferencias de carga entre los compuestos y vienen a explicar la formación de estos excíplejos.⁷¹

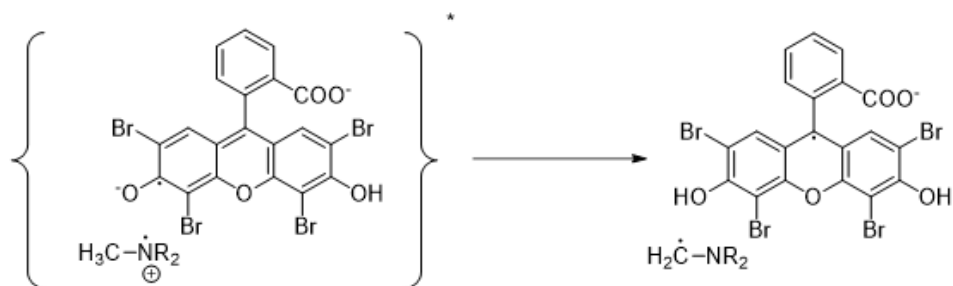


Figura 32. Mecanismo de iniciación propuesto en una polimerización con la formación de un excíplejo entre la amina terciaria y la eosina Y provocando la aparición de radicales.⁷²

En el siguiente paso para la deshalogenación la amina acaba descomponiendo liberando dos protones y dos electrones como se ha visto en la figura 18 y el colorante elimina un anión haluro intercambiándolo por un protón del agua ya que experimentos realizados por diversos autores en disolventes deuterados confirman la incorporación de un deuterio en estas posiciones.^{34 y 35}

Si se quiere aplicar la luminiscencia, que surge en la transformación de los colorantes en fluoresceína, para su uso en la detección y determinación de aminas terciarias, es preciso conocer la estequiometría de la reacción que tiene lugar. Hay que tener en cuenta que, desde el punto de vista de la detección de aminas, la concentración de éstas será la menor posible y, por lo tanto, es clave conocer la cantidad de colorante necesaria para “detectar” esa pequeña cantidad de amina. Desde un punto de vista estequiométrico la transformación de estos colorantes halogenados en fluoresceína, en presencia de una amina, se pueden expresar como la suma de dos semirreacciones, la oxidación de la amina y la reducción del colorante (esquema 3). La reducción de la eosina a fluoresceína es un proceso que requiere ocho electrones y ocho protones (transferencias acopladas de electrón y protón PCET)⁷³ liberando bromuro de

⁷⁰ Brimage, D. R. G.; Davidson, R. S. *J. Photochem.* **1972**, 1 (1), 79–82.

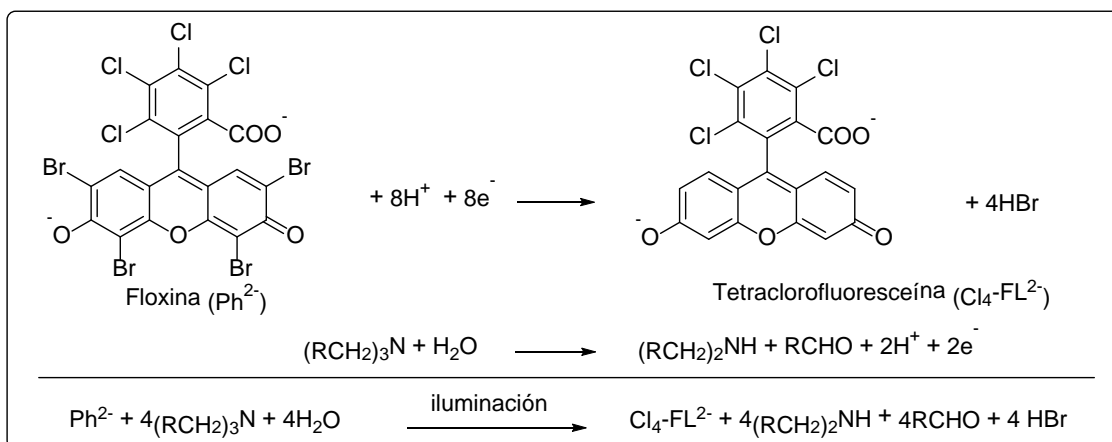
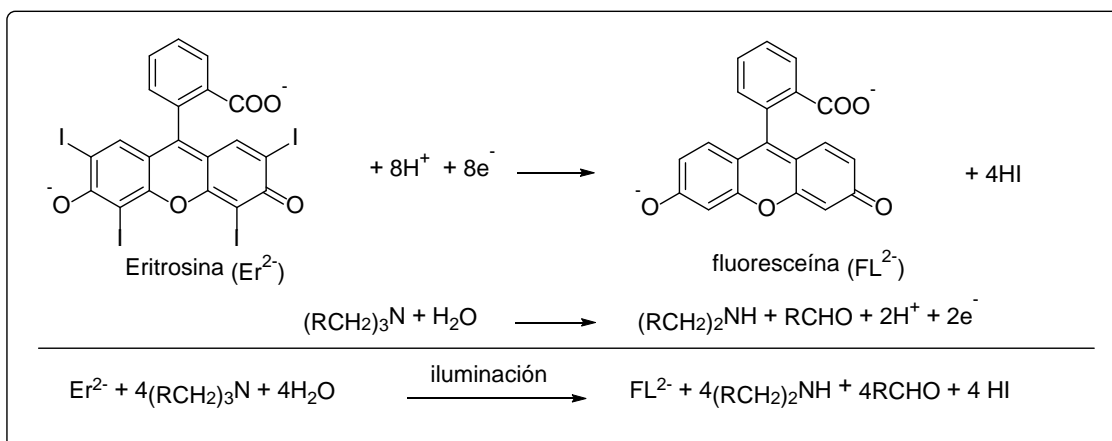
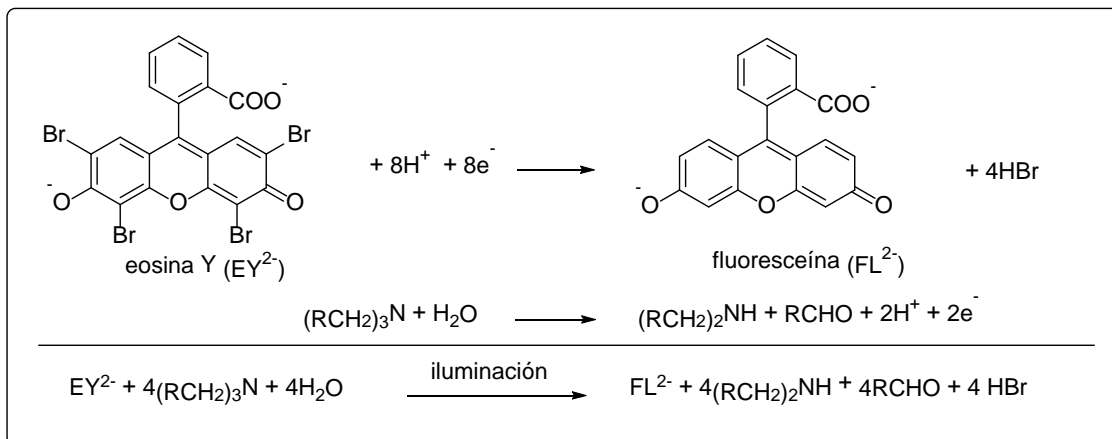
⁷¹ A) Ohashi, M.; Tsujimoto, K.; Seki, K. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1973**, No. 12, 384a. b) Beens, H.; Knibbe, H.; Weller, A. *J. Chem. Phys.* **1967**, 47 (3), 1183–1184.

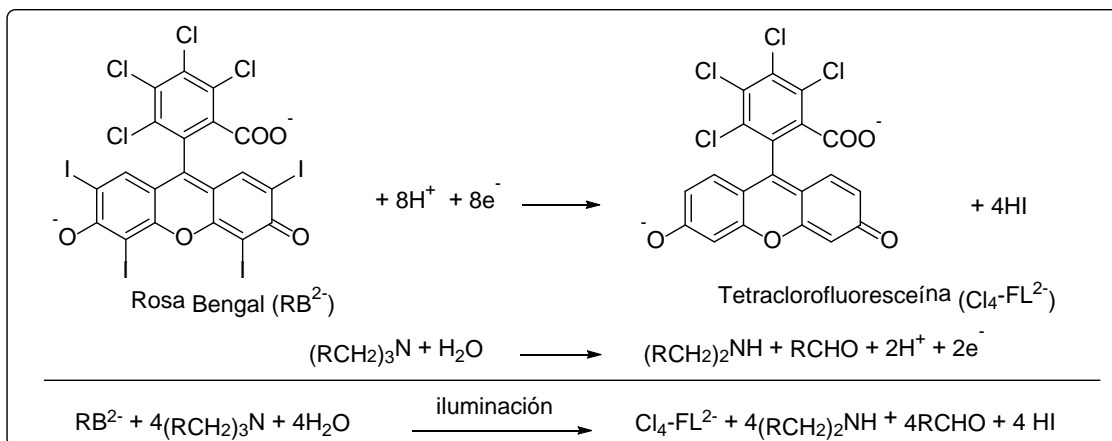
⁷² Padon, K. S.; Scranton, A. B. *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.* **2000**, 38 (11), 2057–2066.

⁷³ Cukier, R. I.; Nocera, D. G. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **1998**, 49 (1), 337–369.

58 | Capítulo 1. Colorantes para la detección de aminas terciarias

hidrógeno (ácido bromhídrico en medio acuoso). Por su parte, la oxidación de aminas terciarias es un proceso de dos PCET en el que se requiere una molécula de agua.





Esquema 3. Reacciones con su estequiometría para los cuatro colorantes utilizados.

Cuando se considera con detalle la estequiometría de la reacción que tiene lugar en el proceso de deshalogenación, se hacen evidentes tres importantes aspectos:

- La proporción molar requerida entre colorante y amina es de uno a cuatro.
- Es necesaria la presencia de agua.
- La reacción requiere medio básico para desplazarse completamente a la derecha ya que se producen los correspondientes haluros de ácido HX que acidifican el medio.

1.5. Estudio de la reacción fotoquímica entre el colorante y la amina. Dependencia con diversos factores.

Aquí se expone el estudio que se llevó a cabo variando los diferentes factores que afectan al proceso tales como pH, concentraciones, disolvente, etc.

1.5.1. Dependencia con el pH

En primer lugar, se llevaron a cabo experimentos para investigar la relación entre el pH y cómo transcurría la reacción utilizando para ello diferentes concentraciones de NaOH. En ellos se vio que la reacción se optimizaba (se producía la máxima intensidad de fluorescencia) a valores de pH básicos y más concretamente a un pH aproximado de 11.

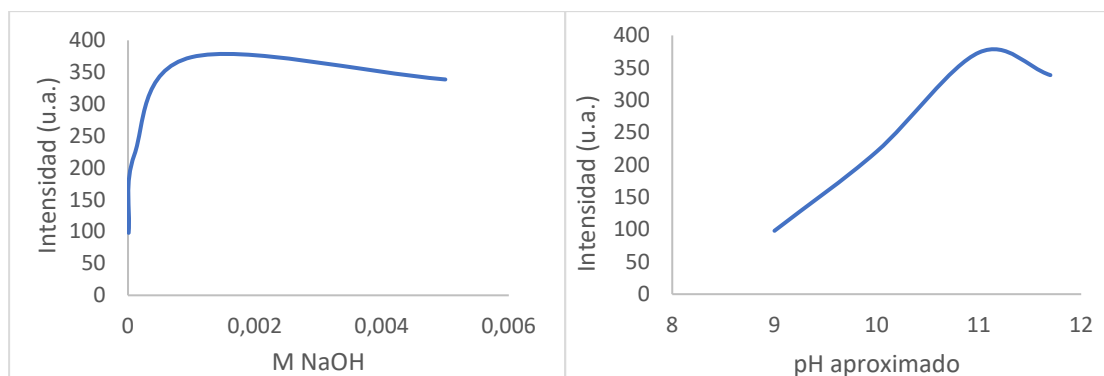


Figura 33. Disolución de eritrosina $1\mu\text{M}$ y TEOA $10\mu\text{M}$ a diferentes pH. Las medidas son después de 5 minutos de iluminación con la lámpara halógena.

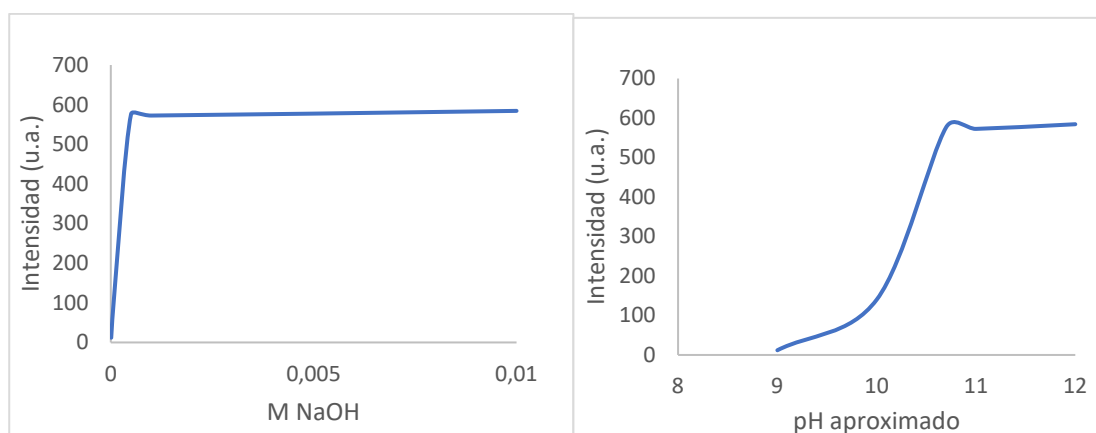


Figura 34. Disolución de eosina Y $1\mu\text{M}$ y TEOA $5\mu\text{M}$ a diferentes pH. Las medidas son después de 5 minutos de iluminación con la lámpara halógena.

Como se esperaba la intensidad de emisión de una disolución muestra una correspondencia con el aumento de pH. Se aprecia pérdida de fluorescencia por debajo de pH 9,⁷⁴ debido a la aparición de la forma monoaniónica de la molécula. No es necesario un pH mayor a 11 ya que no crece más la intensidad a partir de ahí y no es necesario forzar las condiciones de reacción utilizando valores de pH muy elevados potencialmente perjudiciales por posibles descomposiciones. Este comportamiento ha sido estudiado con los demás colorantes y diversas aminas presentando comportamientos similares. Además, el medio básico favorece la reacción ya que como se ha visto anteriormente se desprenden los haluros de hidrógeno

⁷⁴ Ferrari, L.; Rovati, L.; Fabbri, P.; Pilati, F. *Sensors* **2012**, *13* (1), 484–499.

correspondientes que acidifican el medio y deben ser neutralizados para el correcto progreso de la reacción.

1.5.2. Dependencia con la concentración de amina

Los siguientes experimentos que se realizaron tenían como objetivo comprobar la dependencia con la concentración de amina manteniendo el resto de parámetros constantes. El resultado fue el esperado sobre la base de la estequiometría que expresa que, a mayor concentración de amina, mayor será la intensidad final y así se aprecia en la figura 35.

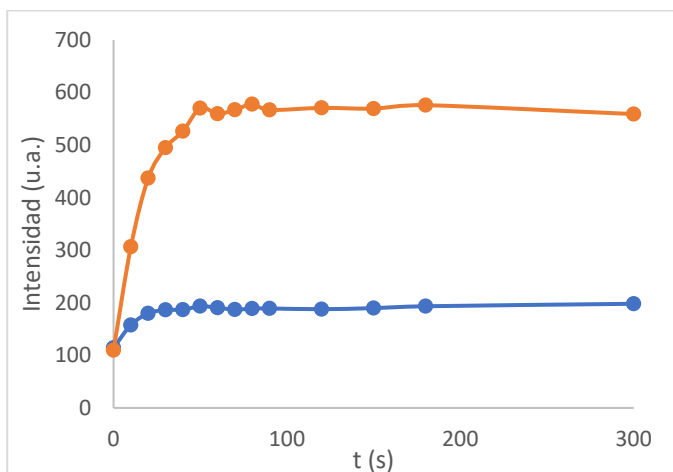


Figura 35. Intensidad de la fluorescencia con el tiempo de iluminación a diferentes concentraciones de amina. En naranja 5 μM y en azul 1 μM de TEOA. Concentración de colorante 1 μM.

1.5.3. Dependencia con el colorante

Para apreciar la dependencia con el colorante se han realizado experimentos con cuatro colorantes xanteno: eosina Y, eritrosina, floxina y rosa bengal. De esta forma se puede observar cómo se comportan todos ellos y con cual se consiguen mejores resultados. Los resultados de la comparación indican que los resultados son similares para cualquier amina elegida entre las incluidas en el estudio y recogidas en la figura 36.

La eosina Y proporciona el mejor resultado en intensidad final alcanzada junto con la eritrosina, pero con esta última se necesita más tiempo de iluminación para lograr el máximo de intensidad. Con los otros dos colorantes se consiguen menores intensidades de luminiscencia, aunque las velocidades hasta alcanzar el máximo son semejantes entre las que tienen los mismos halógenos, lo que indica claramente una dependencia de la velocidad con la naturaleza

del anión saliente Br⁻ o I⁻, siendo más rápida la reacción en el orden Br⁻>I⁻. Para comprender el porqué de esta diferencia habría que estudiar el mecanismo entero de la reacción.

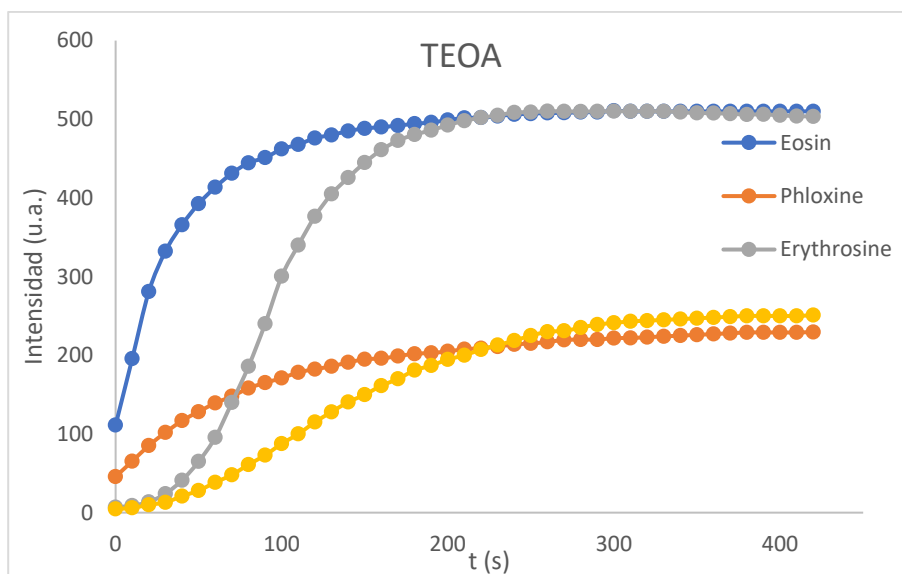


Figura 36. Comparación de los cuatro colorantes con la misma concentración (10^{-6} M) con trietanolamina ($5 \cdot 10^{-6}$ M) como amina terciaria.

Por otro lado, se observó que a grandes concentraciones de colorante ($> 10^{-3}$ M) la fluorescencia está apagada por el efecto desactivante del propio colorante que ya se trató en el capítulo de introducción de esta memoria.

Al final se decidió trabajar con una concentración de colorante de 10^{-6} M por ser la más útil como se verá en el capítulo de las aplicaciones.

1.5.4. Pruebas en otros disolventes

También se probó si la reacción de deshalogenación tiene lugar en otros disolventes aparte de en agua. En acetona, acetonitrilo y dimetilsulfóxido se apreció que la reacción o no ocurre o es demasiado lenta. En cambio, en etanol del 96 % y en metanol se observó que ocurría en pequeña extensión y necesitando para ello mucho tiempo de iluminación. Cuando se mezclan con agua estos disolventes la reacción progresa mejor. Se estableció experimentalmente que un ritmo aceptable (menor a una hora) para que la reacción tenga lugar consiste en añadir al menos un 50% de agua. Esto tiene sentido ya que como se ha explicado anteriormente en las ecuaciones estequiométricas de la reacción es necesaria la presencia de agua. Como conclusión podemos decir que el mejor disolvente encontrado para esta reacción es el agua.

1.5.5. Estudio de interferentes

Para comprobar que en la detección no interfieren otras sustancias se realizan pruebas añadiendo diferentes compuestos potencialmente interferentes y se lleva a cabo la reacción en las mismas condiciones de iluminación, pero con la presencia adicional de estos compuestos en disolución. Todo se realiza en agua utilizando las siguientes cantidades: en los viales se añaden 0,5 ml de eosina Y 10^{-4} M y los interferentes se añaden 10 μ l de una disolución madre $5 \cdot 10^{-3}$ M (lo cual equivale en la primera adición a una concentración igual a la del colorante de 10^{-4} M que se llamará añadir 1 equivalente de interferente).

1.5.5.1. Prueba con cationes:

En las figuras siguientes se aprecia cómo cambian las disoluciones en agua destilada en presencia de los potenciales interferentes.

En figura 37 los viales sólo contienen eosina Y 10^{-4} M (el primero sin colorante).



Figura 37. Viales conteniendo disolución de eosina Y antes de añadir los cationes.

La figura 38 varía con respecto a la primera en que se han añadido cationes en el orden sucesivo (de izquierda a derecha): sin colorante, Nada, Ag^+ , Ni^{2+} , Sn^{2+} , Cd^{2+} , Zn^{2+} , Pb^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{3+} , Sc^{3+} , Al^{3+} , Hg^{2+} , Au^{3+} , Co^{2+} . Todos los cationes tienen como anión ClO_4^- , excepto Zn^{2+} y Sc^{3+} que su anión es triflato $CF_3SO_3^-$ y para el oro tetracloruroaurato(III) $[AuCl_4]^-$.

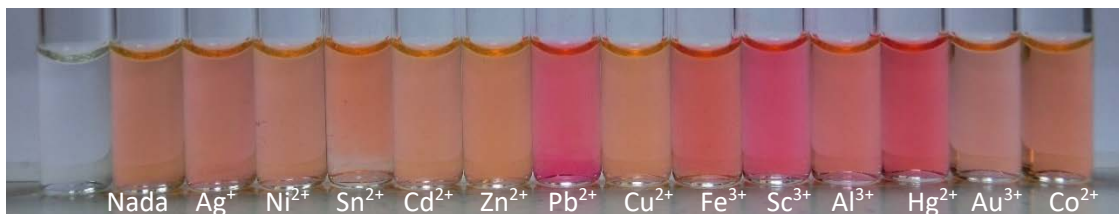


Figura 38. Después de añadir un equivalente de cada catión.

64 | Capítulo 1. Colorantes para la detección de aminas terciarias

En la figura 39 de la secuencia se ha iluminado durante dos minutos para apreciar algún posible efecto en ausencia del dador de electrones (amina terciaria). Sólo se aprecia algún cambio con Au^{3+} que se comentará más adelante.

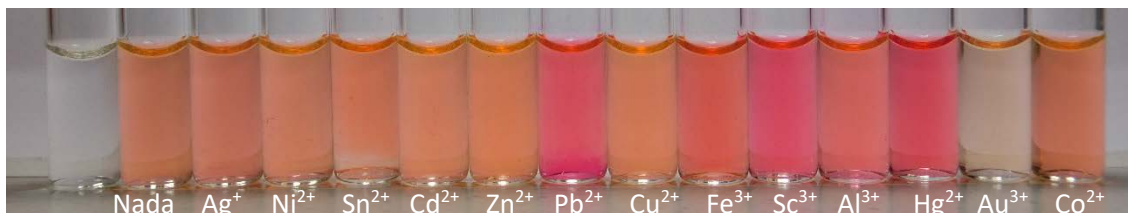


Figura 39. Iluminación durante 2 minutos.

En la figura 40 se añade un segundo equivalente de interferente (catión) y no se aprecian cambios. Para la quinta fotografía se vuelve a iluminar, pero no se aprecian cambios a simple vista.

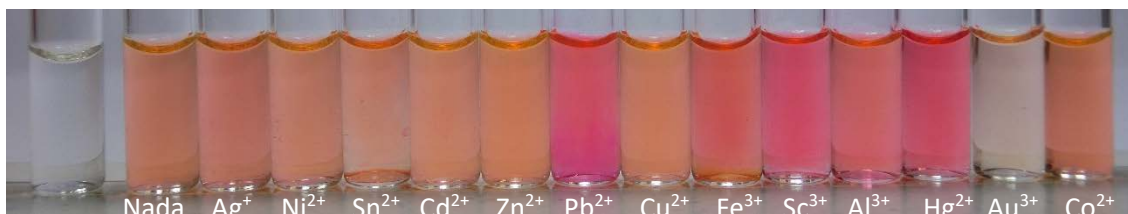


Figura 40. Segundo equivalente añadido.

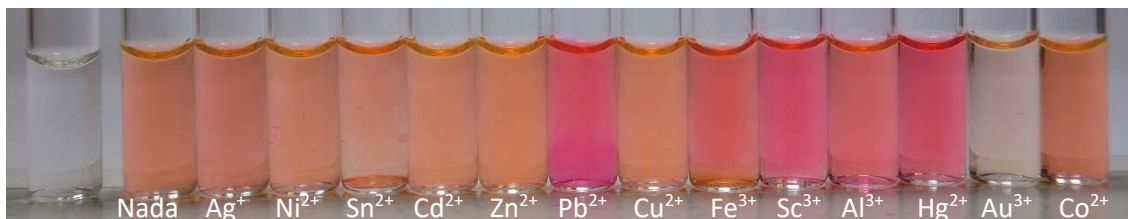


Figura 41. Iluminación con 2 equivalentes.

En la figura 42 se añaden otros dos equivalentes de los cationes y en la 32 se ilumina de nuevo sin apreciar cambios.

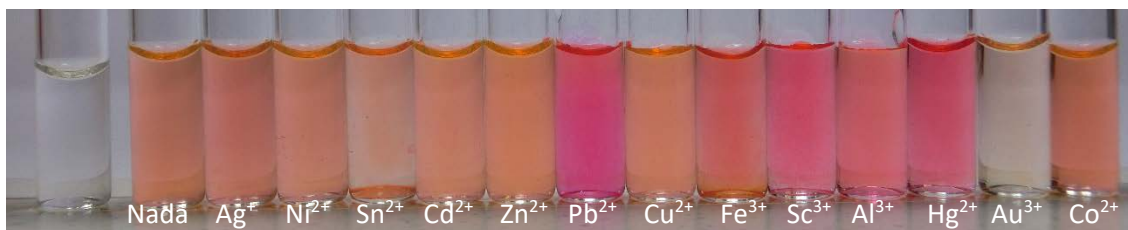


Figura 42. Añadidos 4 equivalentes de cada catión.

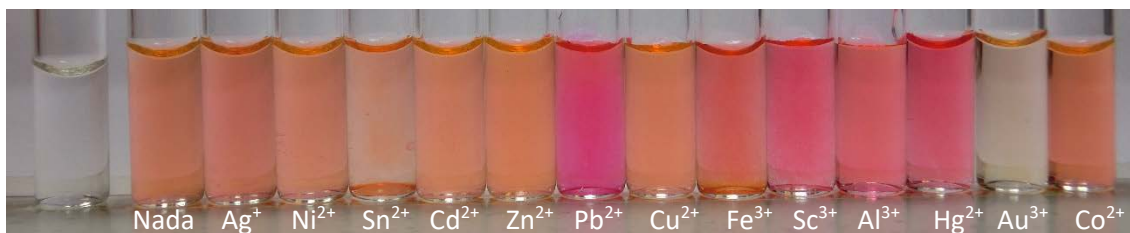


Figura 43. Iluminación con esos 4 equivalentes.

En la figura 44 lo que se hace es colocar los viales con las disoluciones bajo una lámpara ultravioleta (366 nm) para comprobar también por fluorescencia con el segundo vial, cuáles han cambiado. Así se ve que para los viales que contienen Sn^{2+} , Fe^{3+} , Sc^{3+} , Hg^{2+} y Au^{3+} se han apagado completamente y el del Pb^{2+} parcialmente.

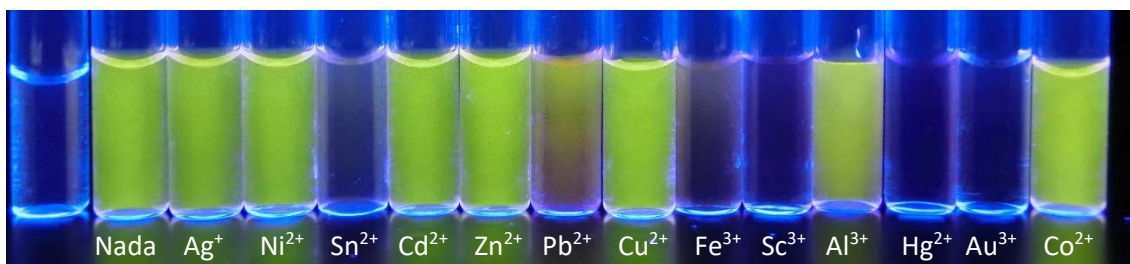


Figura 44. Fotografía bajo luz ultravioleta.

Después se añade trietanolamina en exceso para probar la reacción tal como muestra la figura 45 en la que se ve algunos precipitados como consecuencia del medio básico añadido y un gran cambio de color en el vial que contiene oro.

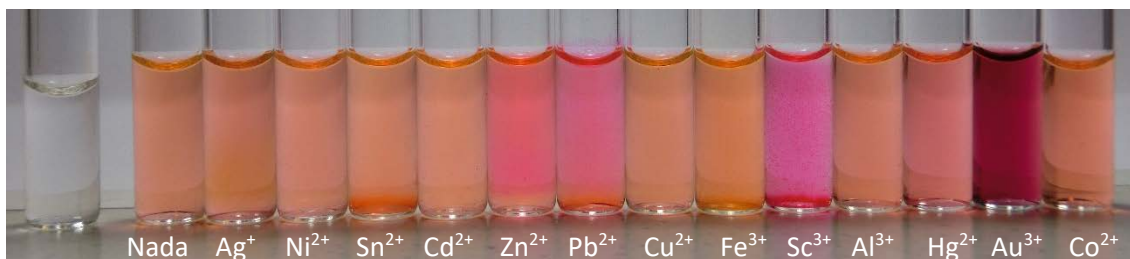


Figura 45. Añadido un exceso de TEOA.

66 | Capítulo 1. Colorantes para la detección de aminas terciarias

En la figura 46 se ha iluminado para provocar la reacción con la amina y se puede observar los cambios aparecidos en casi todos los viales confirmando que la reacción ha funcionado en la mayoría.

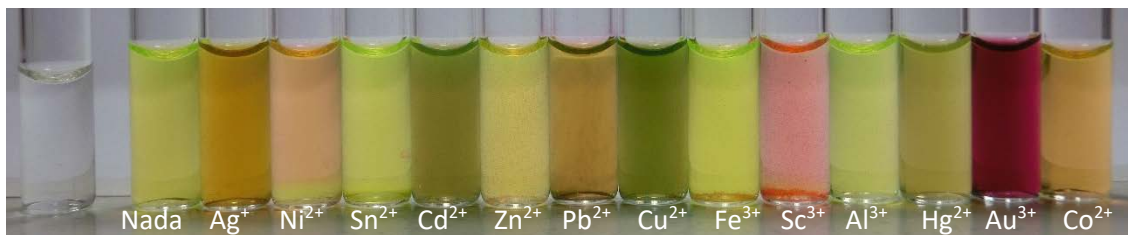


Figura 46. Iluminación con la TEOA añadida.

En la figura 47 se puede observar bajo luz ultravioleta el segundo vial que contiene ya fluoresceína y compararlo con los demás y saber qué tal ha ido la reacción en cada uno de ellos.

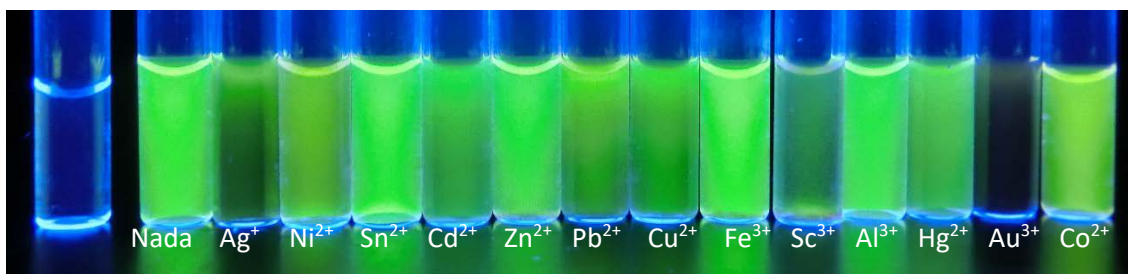


Figura 47. Fotografía bajo luz ultravioleta después de iluminar con la TEOA añadida.

Por último, la figura 48 fue realizada dos días después para comprobar si había algún cambio con el tiempo en los viales.

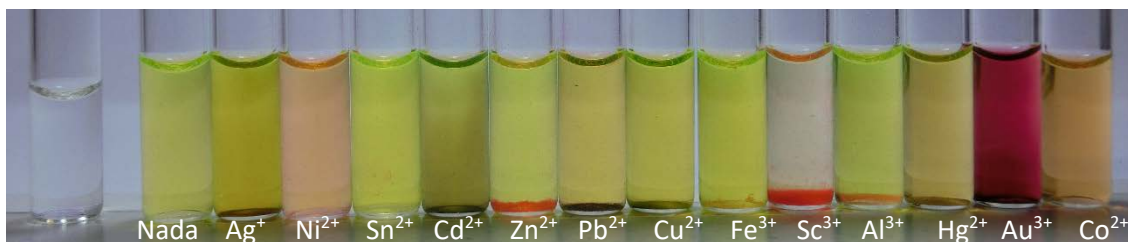


Figura 48. Fotografía tomada 48 horas después.

De todo lo anterior se hace evidente que algunos cationes parecen tener cierta influencia en la reacción que se razona a continuación. Antes de añadir TEOA, como la eosina Y proporciona medio básico se observa inicialmente su fluorescencia, la adición de los cationes

ácidos Sn^{2+} , Fe^{3+} , Pb^{2+} , Al^{3+} , Sc^{3+} y $\text{H}[\text{AuCl}_4]$ provoca disminución del pH y apagado parcial o total de la fluorescencia. Después de añadir TEOA, y como consecuencia del carácter básico que suministran a la mezcla, algunas disoluciones (Al^{3+} y Fe^{3+}) recuperan el color inicial.

Después de iluminar en presencia de la amina (figura 34) se observa cómo han cambiado todas las disoluciones en mayor o menor medida (excepto la que contiene oro, segunda por la derecha). La diferencia de aspecto (color) de las disoluciones responde a dos factores. Por un lado, la diferente extensión con la que se ha producido la reacción de deshalogenación y formación de fluoresceína. Y por otro el desvanecimiento del color intrínseco de cada catión como consecuencia de la precipitación en forma de hidróxidos. Los casos más destacables corresponden al cobalto(II) –primero por la derecha- que en presencia de aminas y aire se oxida a Co(III) o forma complejos, a la plata (tercero por la izquierda) y al oro (segundo por la derecha) ya que se forman nanopartículas. Las nanopartículas de oro se forman fácilmente, incluso en ausencia de luz, en presencia de aminas terciarias como las de ciertos *buffers* (HEPES) con el paso del tiempo.⁷⁵ La formación inequívoca de nanopartículas en nuestro caso se ha comprobado posteriormente mediante la realización de algunos experimentos y se va a tratar más adelante en el capítulo de aplicaciones.

1.5.5.2. Prueba con aniones:

Después se realizó el mismo procedimiento, pero con aniones para comprobar si pueden interferir. En la figura 49 los viales sólo contienen eosina 10^{-4} M (el primero sin colorante).



Figura 49. Viales conteniendo disolución de eosina 10^{-4} M antes de añadir los aniones.

La figura 50 varía con respecto a la primera en que se han añadido cationes en el orden sucesivo (de izquierda a derecha): Nada, nada, F^- , Cl^- , Br^- , I^- , BzO^- , NO_3^- , H_2PO_4^- , HSO_4^- , AcO^- , CN^- , SCN^- . Todos estos aniones tienen como catión NBu_4^+ para que no interfiera. El proceso es

⁷⁵ Habib, A.; Tabata, M.; Wu, Y. G. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2005**, *78* (2), 262–269.

68 | Capítulo 1. Colorantes para la detección de aminas terciarias

totalmente análogo al anterior con los cationes y se puede ir viendo en las sucesivas fotografías de debajo.

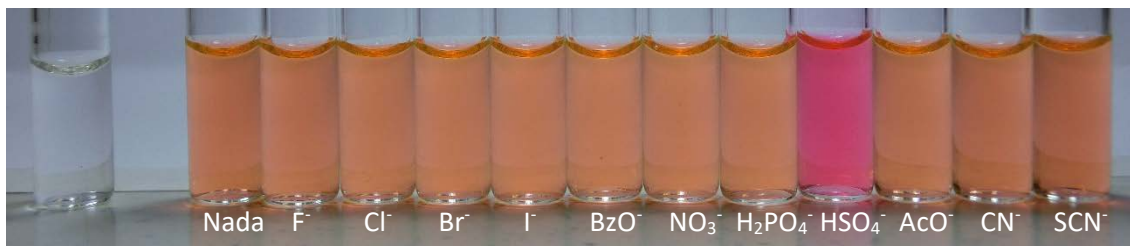


Figura 50. Después de añadir un equivalente de cada anión.

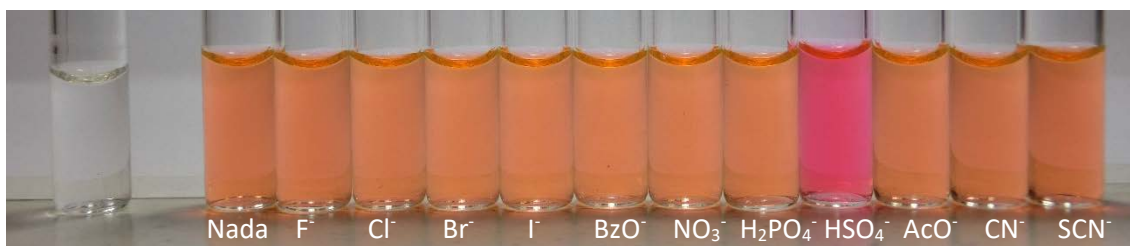


Figura 51. Iluminación durante 2 minutos.

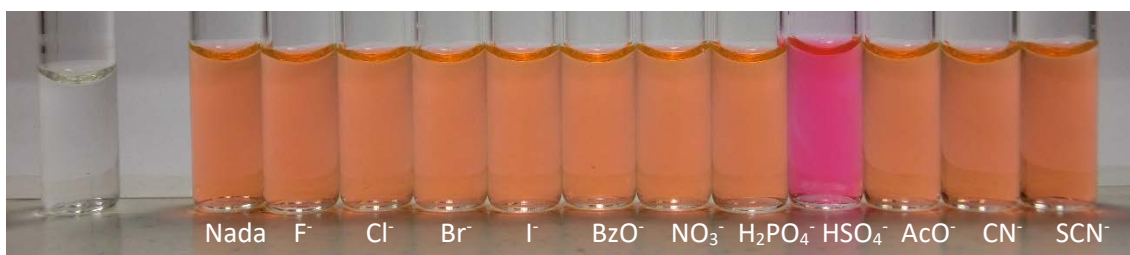


Figura 52. Segundo equivalente añadido.

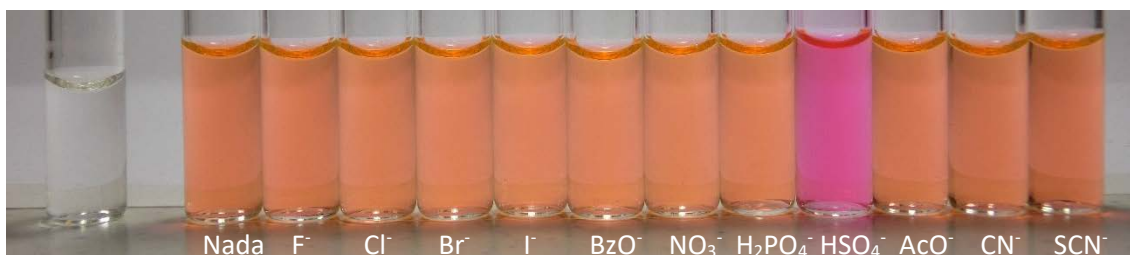


Figura 53. Iluminación con 2 equivalentes.

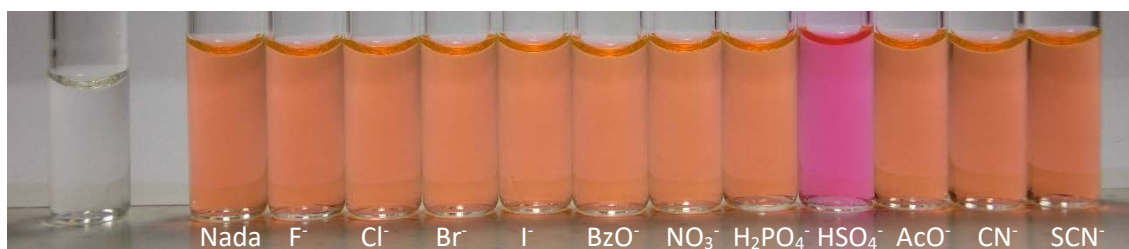


Figura 54. Añadidos 4 equivalentes de cada catión.

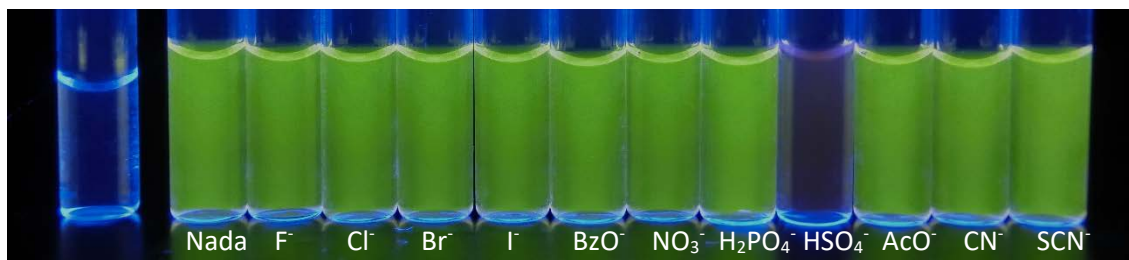


Figura 55. Fotografía bajo luz ultravioleta.

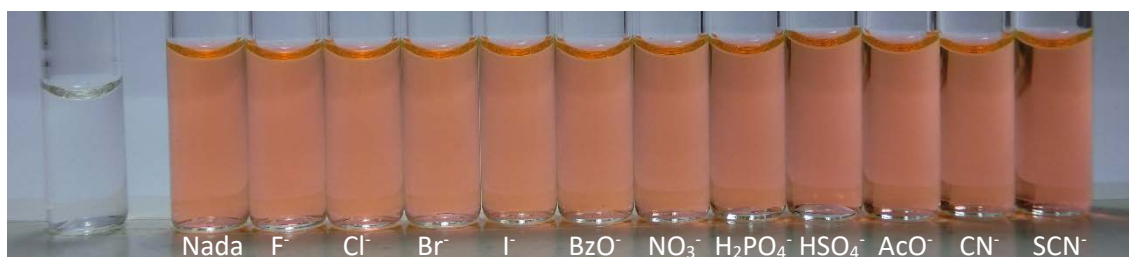


Figura 56. Añadido un exceso de TEOA.

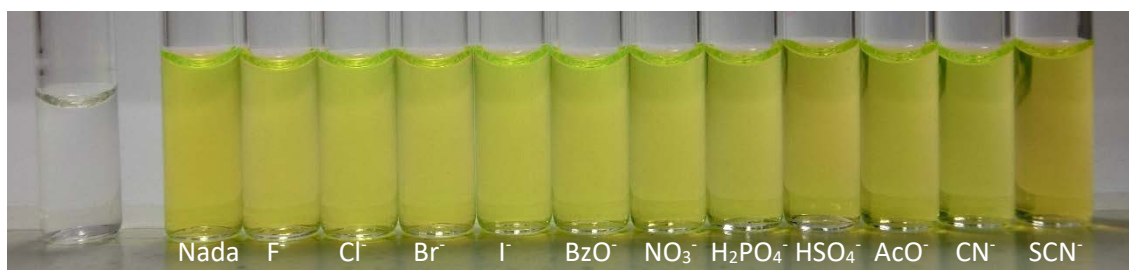


Figura 57. Iluminación con la TEOA añadida.

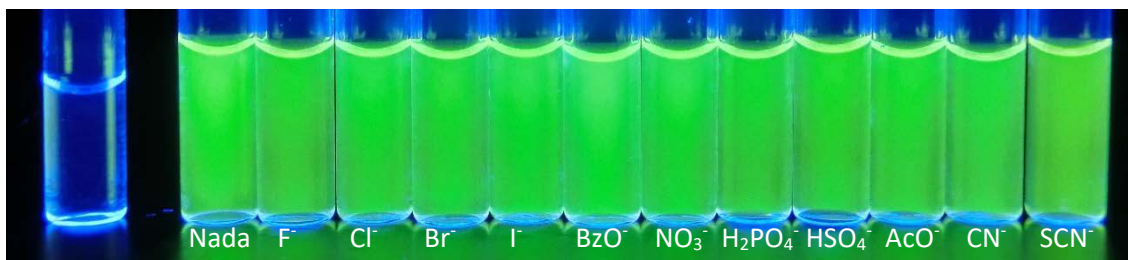


Figura 58. Bajo luz ultravioleta después de iluminar con la TEOA añadida.

Los aniones parecen no afectar a la detección, solamente en el caso del hidrógeno sulfato se ve un cambio debido a su carácter ácido ya que la eosina Y cambia y pierde la fluorescencia, pero una vez se añade la amina y se proporciona medio básico, se revierte ya que es un equilibrio.

Como conclusión de estos experimentos se puede decir que, exceptuando los casos ya comentados en los cationes, el resto de cationes y aniones no parecen interferir siempre y cuando no estén demasiado concentrados y se haya regulado el pH para que se produzca la reacción.

1.5.6. Comparación de aminas:

Llegados a este punto, se pretendió comprobar a cuantas aminas se podía extender el uso de este método basado en la intensidad de la fluorescencia y establecer si se puede usar no solo para detectarlas sino también para distinguirlas. En este sentido, la utilización como criterio del máximo de la intensidad o del área que subyace bajo la curva de emisión se comprobó que era equivalente.

1.5.6.1. Comparación de aminas con eosina Y como colorante

La longitud de onda de emisión máxima en agua de la eosina Y (1 μM) en este sistema (NaOH 1 mM para conseguir un pH aproximado de 11) es de 536 nm. En la figura 59 se muestra la gráfica de evolución de la intensidad de la fluorescencia con el tiempo de iluminación para el caso de la monocrotalina por ilustrarlo con una de las aminas utilizadas. La longitud máxima de emisión final se sitúa entre 515 y 520 nm, por lo que para representar la intensidad máxima se tomó el valor de 518 nm, realizando cuatro réplicas para cada amina. En la figura 60 se ilustra un ejemplo de su repetibilidad. Las medidas se realizaron en condiciones iguales para todas las aminas con una concentración de 5 μM variando la irradiación de la siguiente manera:

- De 0 a 2 minutos una medida cada 10 segundos.
- De 2 a 5 minutos cada 30 segundos.
- A los 7 minutos.
- A los 10 minutos.

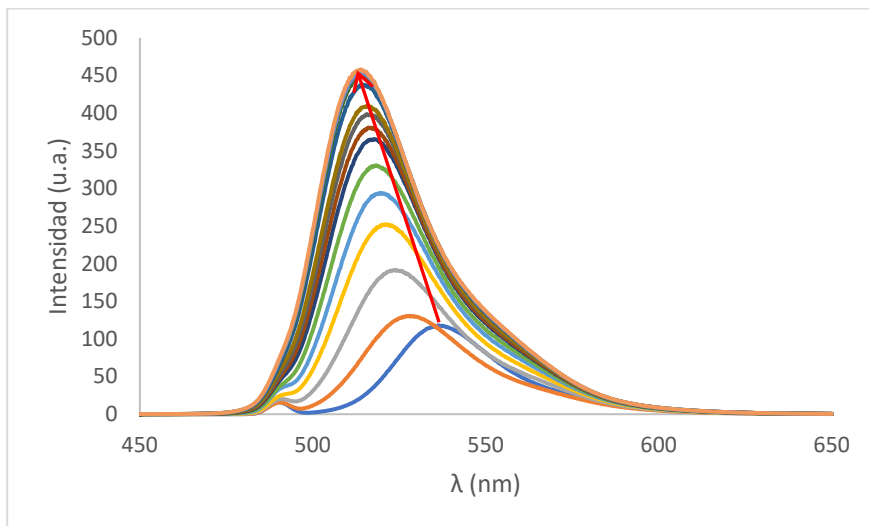


Figura 59. Gráfica que muestra la evolución de la intensidad durante la iluminación de la reacción de eosina Y $1 \mu\text{M}$ y monocrotalina $5 \mu\text{M}$ a pH 11.

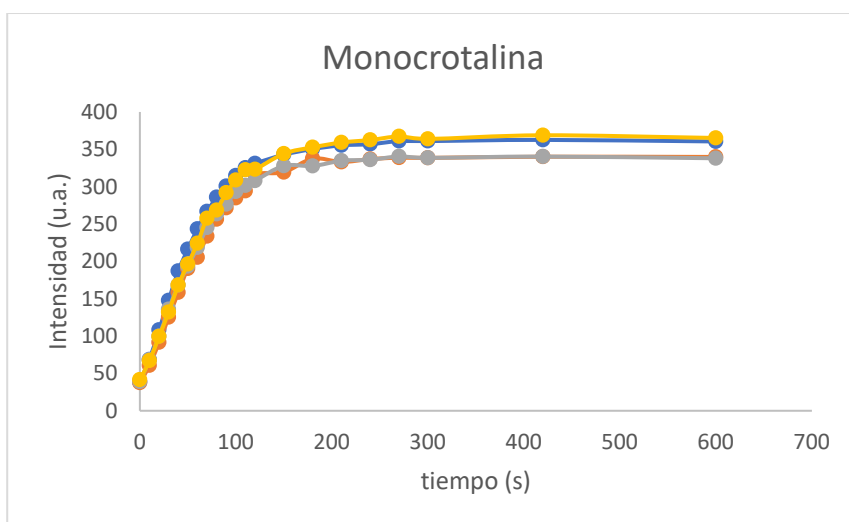


Figura 60. Ejemplo de las cuatro réplicas realizadas para cada amina (en este caso monocrotalina). Las concentraciones fueron Eosina Y $1 \mu\text{M}$, monocrotalina $5 \mu\text{M}$ y NaOH 1 mM .

Para la representación gráfica comparativa de todas las aminas exploradas se tomó la media entre las réplicas de cada amina y se representaron juntas en la misma gráfica (figura 61).

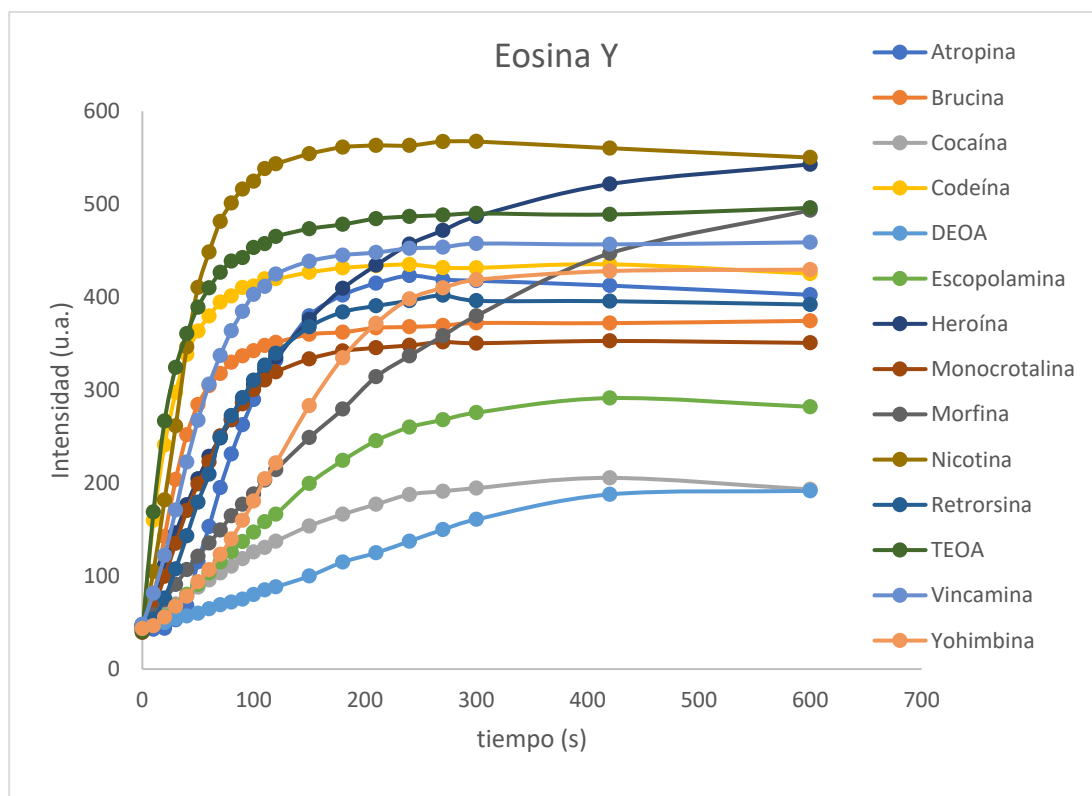


Figura 61. Representación de la evolución de la intensidad máxima de la fluorescencia en función del tiempo de iluminación para las diferentes aminas estudiadas.

Con el fin de explorar la posibilidad de utilizar todos estos datos para distinguir mediante un proceso matemático unas aminas de otras, se procedió a realizar un análisis de componentes principales para estudiar si usando eosina Y se podría conseguir este propósito.

1.5.6.1.1. Análisis por componentes principales:

Es un procedimiento estadístico que sirve para identificar patrones en una serie de datos y expresarlo de un modo en el que se vean las diferencias y similitudes de estos datos. Permite clasificar y separar distintos experimentos y muestras usando variables no correlacionadas para construir estas componentes principales y así conseguir explicar la máxima cantidad de varianza.

Es un proceso muy útil cuando se tienen cantidades grandes de datos y así se puede explicar de forma matemática y visual como las variables explican la correlación de esos datos.⁷⁶

Los parámetros elegidos para el análisis fueron: t_{max} (tiempo necesario para alcanzar el máximo de intensidad), $t_{1/2}$ (tiempo necesario para alcanzar la mitad del recorrido entre el máximo y el mínimo de intensidad) y $I_{Máx}$ (el máximo de intensidad para $\lambda_{em}=518$ nm en cada amina), que se puede ver un ejemplo en la figura 62. Se toma la representación de la media de las réplicas para cada amina y se construye la siguiente tabla:

Aminas	t_{max} (s)	$I_{Máx}$ (u.a.)	$t_{(1/2)}$ (s)
Atropina	240	424	85
Brucina	240	380	35
Cocaína	240	202	70
Codeína	210	442	25
DEOA	420	194	210
Escopolamina	300	288	110
Heroína	600	550	110
Monocrotalina	270	361	65
Morfina	700	500	220
Nicotina	240	587	40
Retrorsina	240	400	75
TEOA	270	510	25
Vincamina	300	466	55
Yohimbina	420	435	135

Tabla 5. Parámetros tomados para cada amina.

⁷⁶ I.T. Jolliffe, Principal Components Analysis, second ed., Springer Verlag, New York, 2002. B) Syms, C. In *Encyclopedia of Ecology*; Elsevier Newbury Park California, 2008.

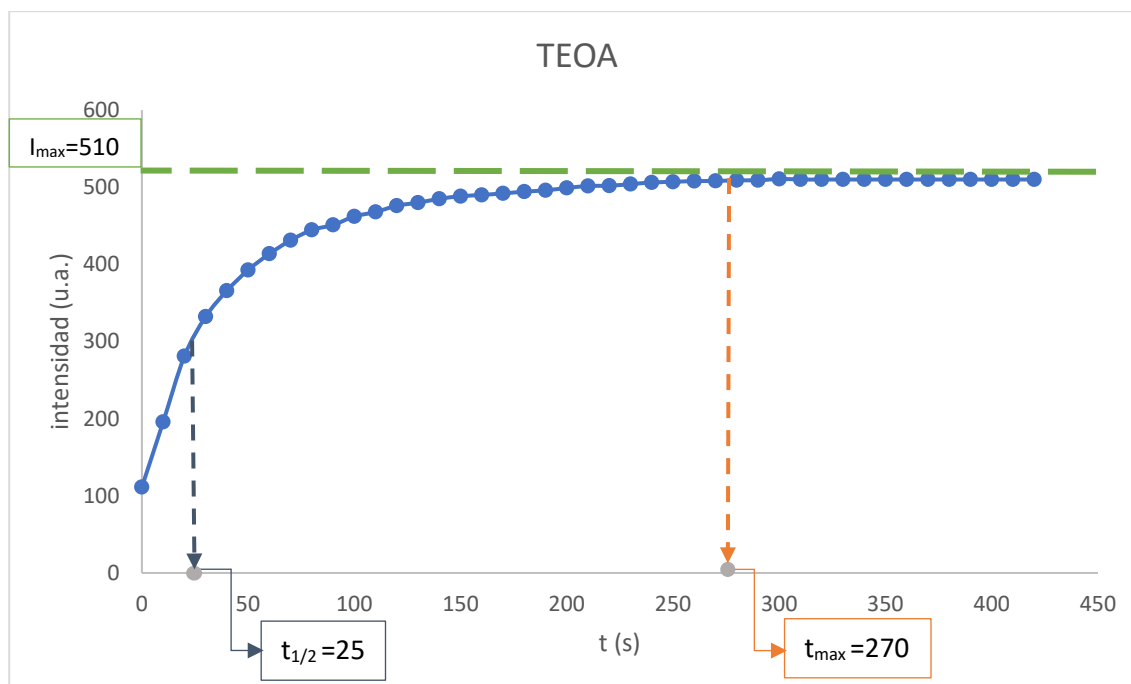


Figura 62. Ejemplo de las variables escogidas para la gráfica de la reacción entre eosina Y y TEOA.

Un análisis preliminar por componentes principales fue llevado a cabo usando los resultados obtenidos para las aminas terciarias y DEOA (14 casos) con la eosina Y, usando como variables el máximo de emisión, el tiempo en alcanzar ese máximo y el tiempo hasta el punto medio. El propósito del análisis por componentes principales era el de obtener un pequeño número de combinaciones lineales con la mayor cantidad de variabilidad en los datos. En este caso dos componentes fueron halladas y juntas explicaban el 97% de la variabilidad de los datos. (Tabla 6). Como la tercera componente principal apenas explicaba el 2,7 % de variabilidad no se usó en este estudio. Este primer análisis fue llevado a cabo con el software Statgraphics Centurion XVI Versión 16.1.03.

Componente	Autovalor	Porcentaje de varianza explicado (%)	Porcentaje acumulado (%)
1	1,7857	59,5	59,5
2	1,1335	37,8	97,3
3	0,0808	2,7	100

Tabla 6. Análisis de componentes principales.

	Componente 1	Componente 2
$I_{M\acute{a}x}$	-0,0248	0,9339
$t_{m\acute{a}x}$	0,7030	0,2699
$t_{(1/2)}$	0,7108	-0,2344

Tabla 7. Peso de las componentes.

El peso de las componentes muestra el coeficiente para cada variable en las ecuaciones de las componentes principales. Por ejemplo, para la primera componente principal se tiene la ecuación: $-0.0248 \cdot I_{M\acute{a}x} + 0.7030 \cdot t_{m\acute{a}x} + 0.7108 \cdot t_{(1/2)}$ donde los valores de las variables en la ecuación son estandarizados sustrayendo la media y dividiendo entre la desviación estándar.

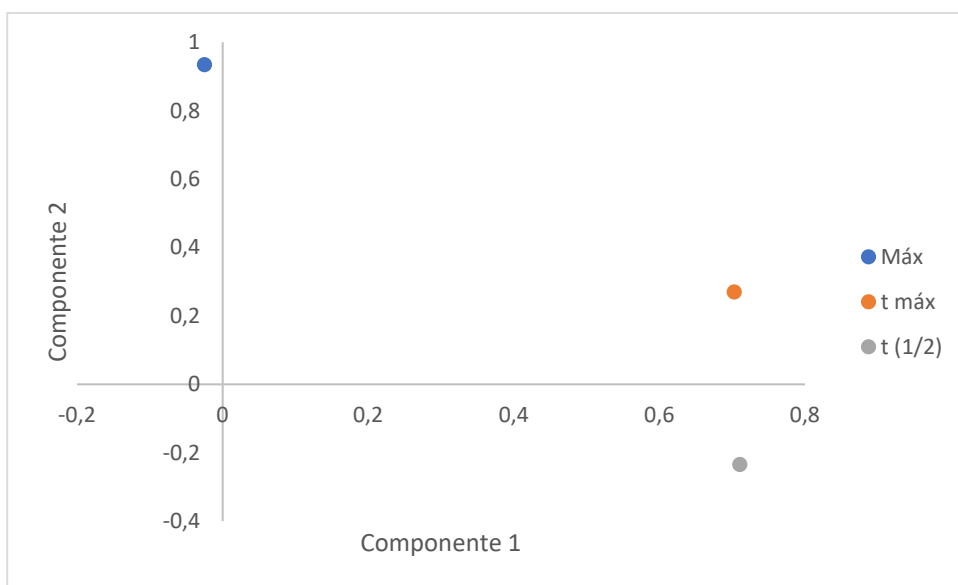


Figura 63. Pesos de cada variable en las componentes principales.

Se puede observar al representar los pesos que tienen las variables dentro de las componentes, que $t_{m\acute{a}x}$ y $t_{1/2}$ están bastante relacionados para la componente 1. Esto quiere decir que a lo largo de esta componente habrá más diferencia entre las aminas cuanto mayor sea la diferencia entre estas variables.

Número	Amina	Componente 1	Componente 2
1	Atropina	-0,5074	-0,0420
2	Brucina	-1,0678	-0,2013

3	Cocaína	-0,6318	-1,7369
4	Codeína	-1,3361	0,2711
5	DEOA	1,8128	-2,0004
6	Escopolamina	0,0886	-1,1003
7	Heroína	1,4467	1,5091
8	Monocrotalina	-0,5807	-0,4096
9	Morfina	3,1815	0,8824
10	Nicotina	-1,0542	1,4128
11	Retrorsina	-0,6163	-0,1938
12	TEOA	-1,0677	0,9160
13	Vincamina	-0,5754	0,5105
14	Yohimbina	0,9078	0,1825

Tabla 8. Muestra los valores de las componentes principales para cada amina. Con estos datos se construye la gráfica de dos dimensiones. Esta gráfica muestra el análisis de componentes principales de la eosina Y y las 14 aminas en la figura 49.

Como se puede observar en la figura 64, la heroína y morfina se encuentran separadas del resto de las aminas debido a su particular comportamiento en la reacción con la eosina Y. La nicotina y la TEOA se encuentran situadas en la parte alta y a la izquierda del gráfico debido a la aparición de una gran intensidad después de la reacción y de su rápida reacción con el colorante. La cocaína y la DEOA dan los resultados más bajos debidos a su poca intensidad con respecto a las demás aminas. La retrorsina y monocrotalina, los dos alcaloides derivados de la pirrolizidina, quedan juntos en el centro izquierdo de la gráfica debido a su similar estructura. Lo más interesante es que la morfina y los alcaloides derivados de ésta acaban bien separados por lo que se pueden discriminar bien en un análisis de estas sustancias. También quedan separadas de las demás aminas la escopolamina y la yohimbina siendo también distinguibles por este sistema.

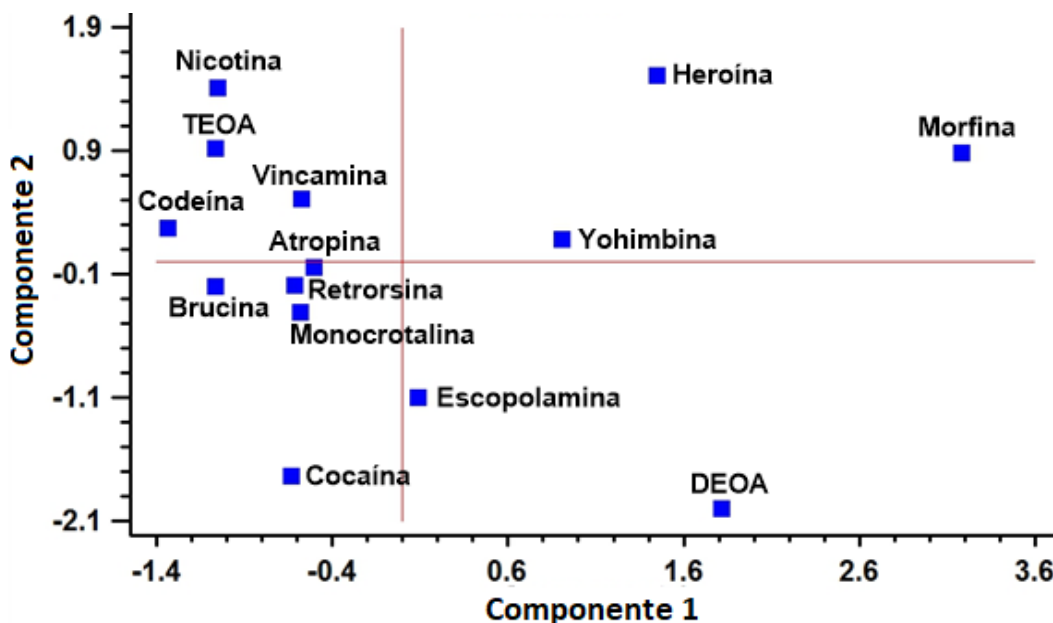


Figura 64. Representación gráfica en dos dimensiones para las 2 componentes principales más significativas del análisis.

Usar la curva de máximos promedio, es decir, la media de las réplicas de cada amina puede no ser representativo porque no recoge la variabilidad de cada amina. En lo que sigue, cada amina se identifica con un número, del 1 al 14, en orden alfabético.

Amina	nº
Atropina	1
Brucina	2
Cocaína	3
Codeína	4
DEOA	5
Escopolamina	6
Heroína	7
Monocrotalina	8
Morfina	9
Nicotina	10
Retrorsina	11
TEOA	12
Vincamina	13
Yohimbina	14

Tabla 9. Código en el que se asigna un número a cada amina por orden alfabético para construir el modelo de componentes principales.

78 | Capítulo 1. Colorantes para la detección de aminas terciarias

Hecho el cálculo del análisis de las componentes principales usando el software MATLAB ayudado por el profesor Fernando Martín Pedrosa de la universidad de Valladolid, sobre las 14 aminas sin promediar, excluyendo algunas que claramente se alejan de las otras y usando las mismas variables que antes ($I_{Máx}$, t_{max} y $t_{1/2}$), se llegó al resultado que se muestra en la siguiente figura:

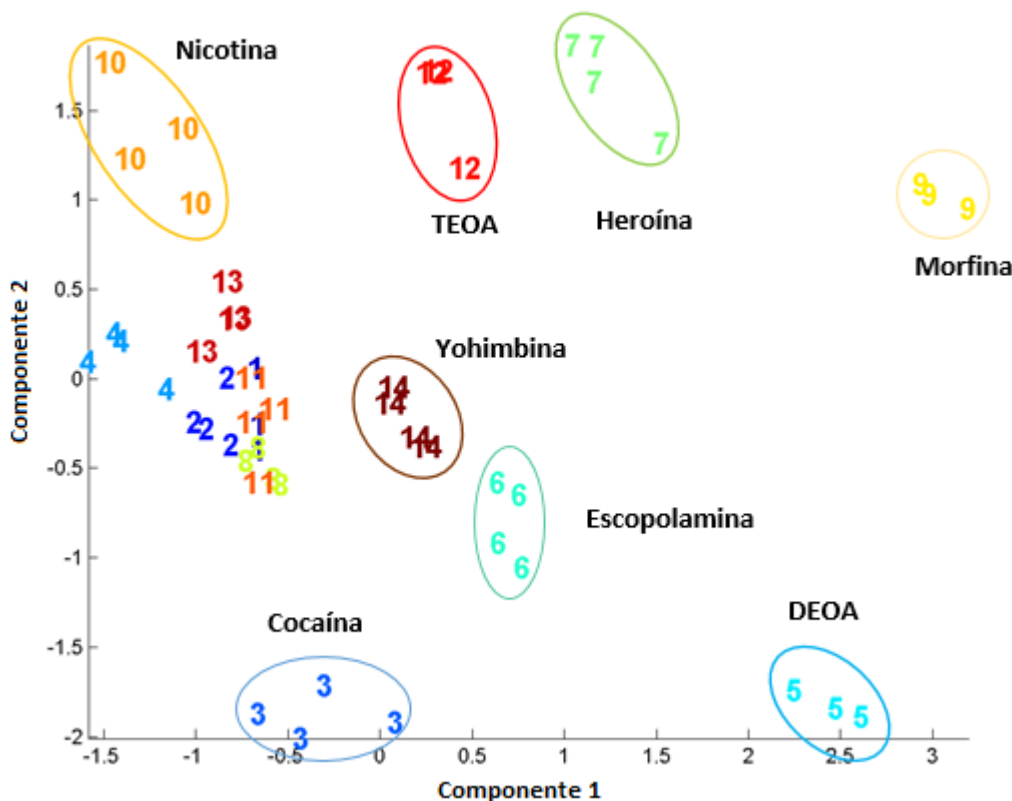


Figura 65. Representación del análisis por componentes principales usando todas las réplicas de las aminas.

Comparando las dos figuras son muy similares salvo quizás para TEOA (12). Se aprecia que, para la atropina, brucina, codeína, monocrotalina, retrorsina y vincamina son difícilmente discriminables.

1.5.6.2. Comparación de aminas con eritrosina como colorante

Se realizaron los mismos experimentos con todas las aminas al igual que en el caso anterior con la eosina Y usando las mismas concentraciones de reactivos. Aquí la longitud de onda de emisión comienza en 545 nm para este sistema.

Las medidas fueron tomadas para todas las aminas iluminando con la lámpara halógena:

- De 0 a 5 minutos una medida cada 20 segundos.
- De 5 a 10 minutos cada 30 segundos.
- De 10 a 15 minutos cada 60 segundos.

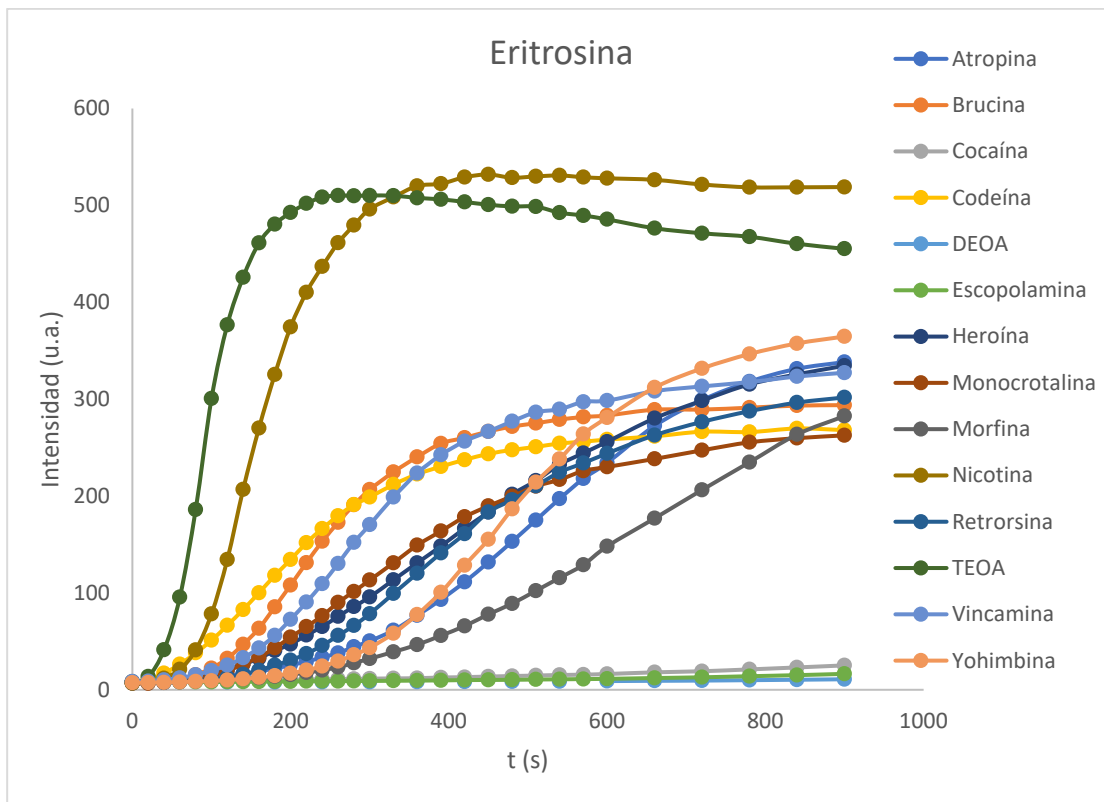


Figura 66. Representación de la evolución de la intensidad máxima de la fluorescencia en función del tiempo de iluminación para las diferentes aminas estudiadas.

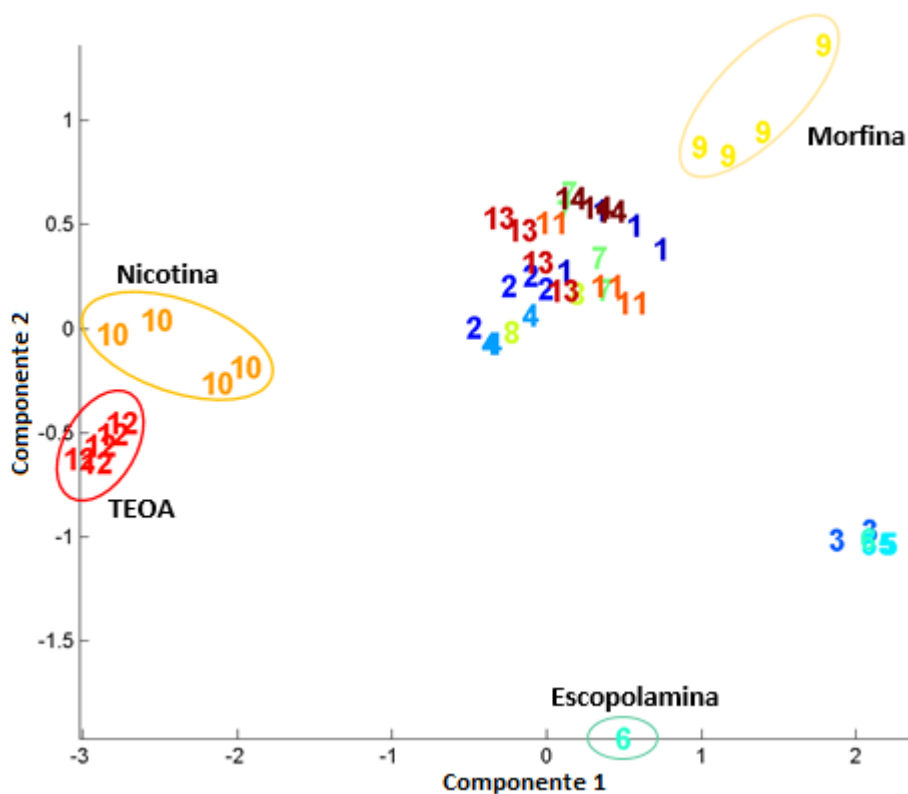


Figura 67. Representación del análisis por componentes principales usando todas las réplicas de las aminas y eritrosina como colorante.

Para este colorante parece que se discriminan peor las aminas. Solo se diferencian la morfina, escopolamina, nicotina y TEOA. Cocaína y DEOA aparecen agrupadas.

1.5.6.3. Comparación de aminas con floxina como colorante

Se realizaron los mismos experimentos con todas las aminas al igual que en los casos anteriores con la eritrosina y la eosina Y usando las mismas concentraciones de reactivos. Aquí la longitud de onda de emisión comienza en 555 nm para este sistema.

Las medidas fueron tomadas para todas las aminas iluminando con la lámpara halógena:

- De 0 a 2 minutos una medida cada 10 segundos.
- De 2 a 5 minutos cada 30 segundos.
- A los 7 minutos.
- A los 10 minutos.

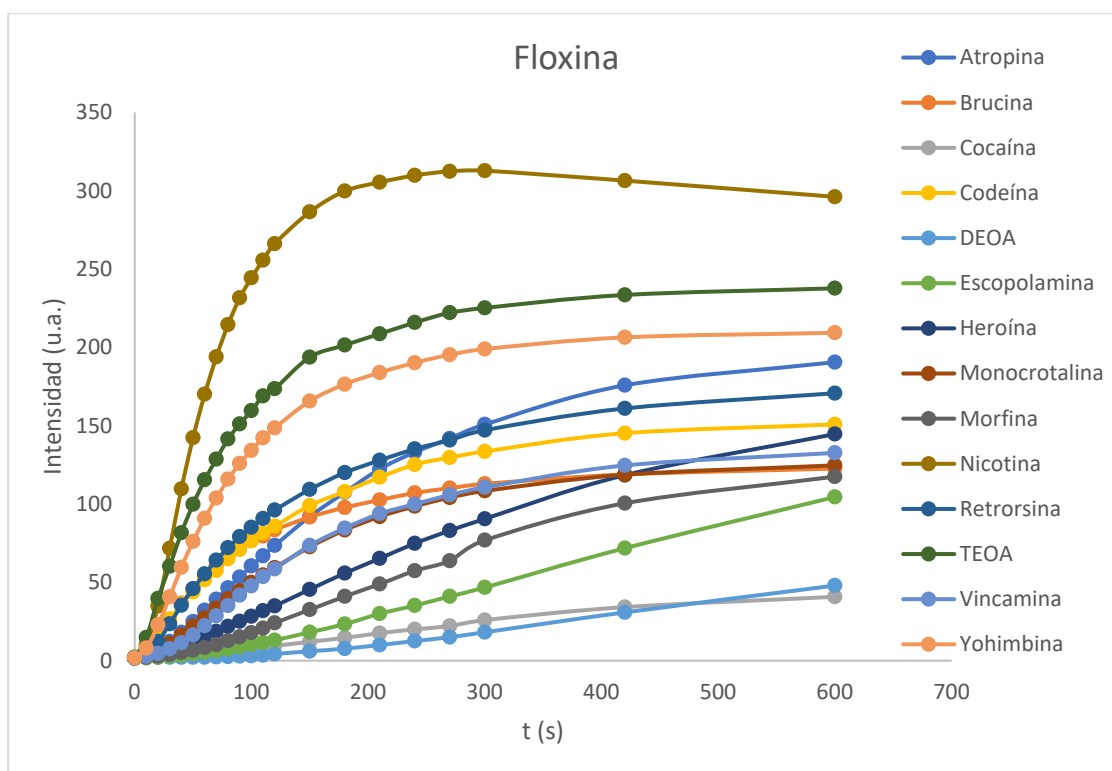


Figura 68. Representación de la evolución de la intensidad máxima de la fluorescencia en función del tiempo de iluminación para las diferentes aminas estudiadas.

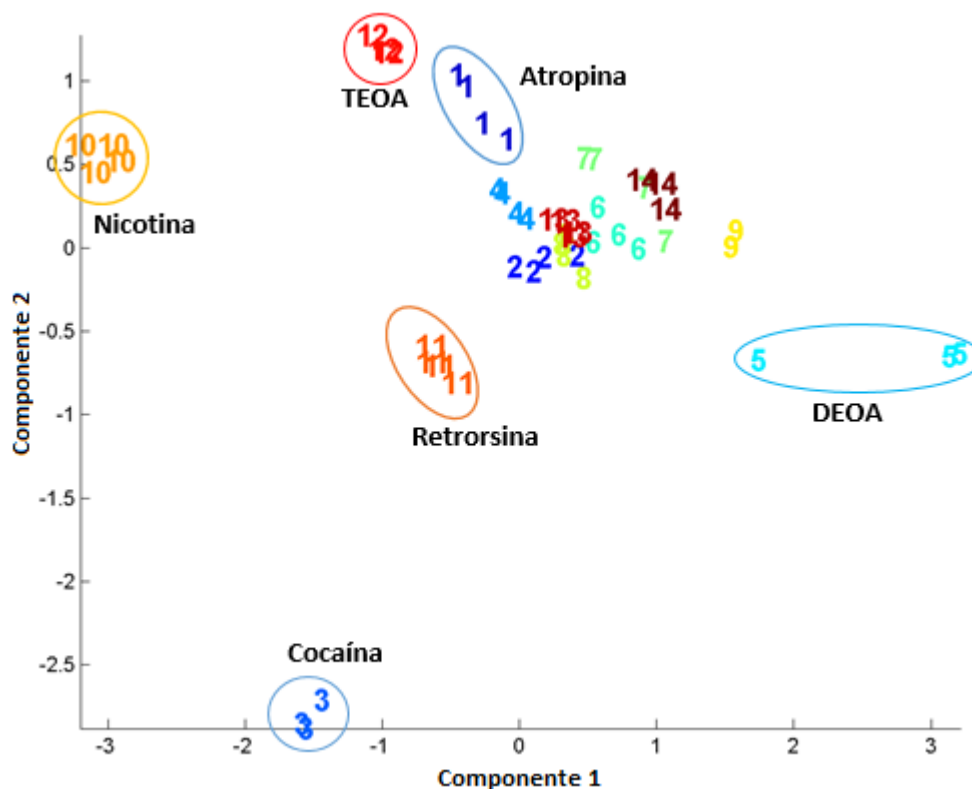


Figura 69. Representación del análisis por componentes principales usando todas las réplicas de las aminas y floxina como colorante.

En este caso se distinguen las aminas atropina, cocaína, DEOA, nicotina, retrorsina y TEOA.

1.5.6.4. Comparación de aminas con rosa bengal como colorante

Se realizaron los mismos experimentos con todas las aminas al igual que en el caso anterior con la eosina Y usando las mismas concentraciones de reactivos. Aquí la longitud de onda de emisión comienza en 557 nm para este sistema.

Las medidas fueron tomadas para todas las aminas iluminando con la lámpara halógena:

- De 0 a 5 minutos una medida cada 20 segundos.
- De 5 a 10 minutos cada 30 segundos.
- De 10 a 15 minutos cada 60 segundos.

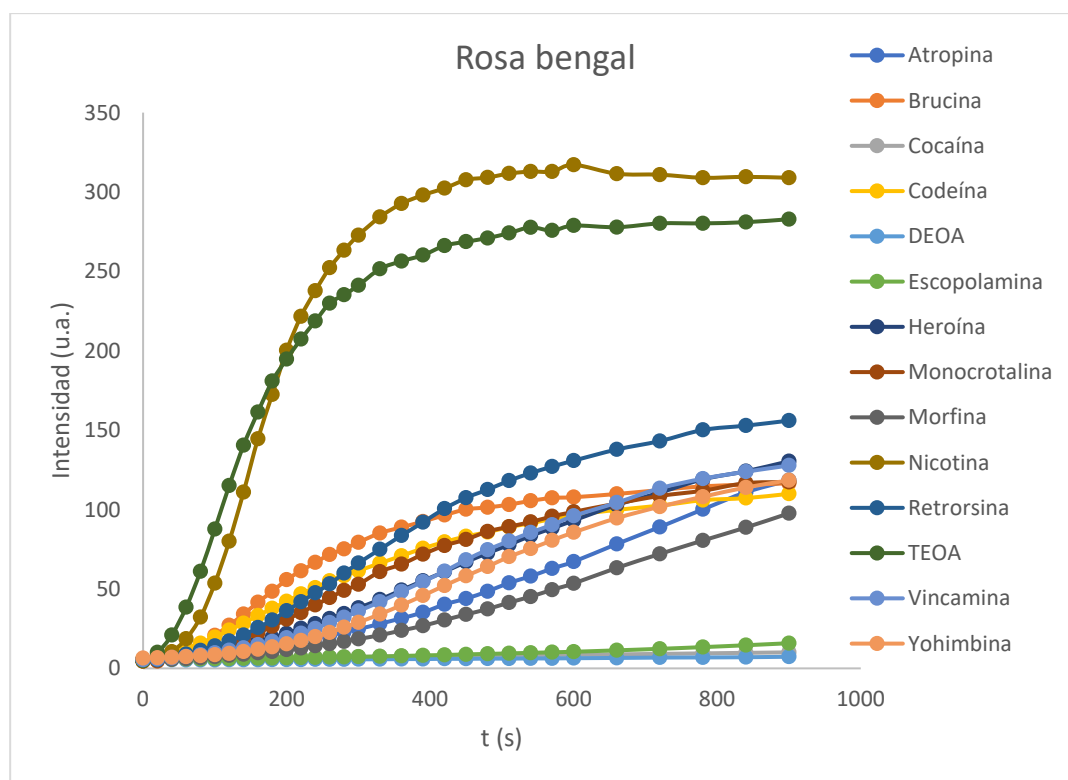


Figura 70. Representación de la evolución de la intensidad máxima de la fluorescencia en función del tiempo de iluminación para las diferentes aminas estudiadas.

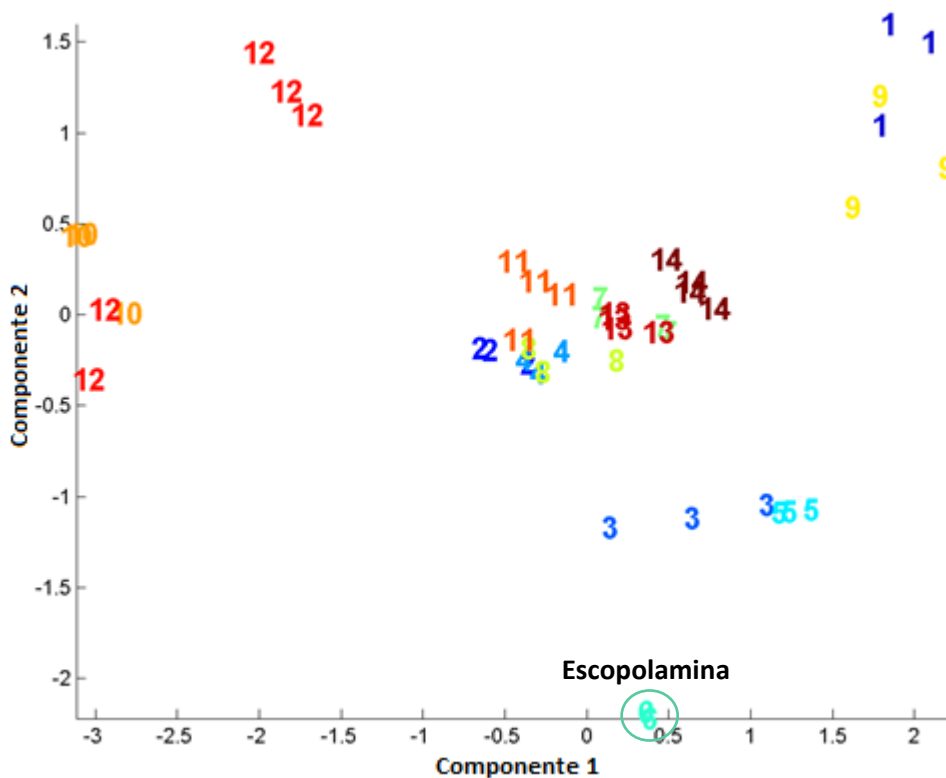


Figura 71. Representación del análisis por componentes principales usando todas las réplicas de las aminas y Rosa bengal como colorante.

Aquí las aminas aparecen mucho más mezcladas y casi no se puede distinguir nada, solo la escopolamina aparece más separada.

1.5.6.5. Resumen de resultados

Para acabar, se puede decir que se observó que la TEOA junto con la nicotina son las aminas terciarias que reaccionan a mayor velocidad mientras que la amina secundaria DEOA fue la que reaccionaba con mayor lentitud.

Analizando los resultados se puede ver que las mayores intensidades se alcanzan con la eosina Y y con la eritrosina puesto que las dos se transforman en fluoresceína que es el colorante que más intensamente emite entre los incluidos en este trabajo. Las diferencias mostradas por las aminas se deben a parámetros cinéticos propios, sin duda derivados de sus diferentes estructuras moleculares. Con la eritrosina se produce un gran aumento de la intensidad de fluorescencia para los casos de la nicotina y la TEOA mientras que para las demás aminas el aumento de intensidad no es tan pronunciado, lo que permite diferenciarlas entre sí.

En el caso de la floxina se aprecia también que la máxima intensidad se alcanza para las mismas aminas, si bien la variación de intensidad de la fluorescencia en función de cada amina se produce en este caso de un modo suave. De hecho, se distinguen pequeñas diferencias de intensidad asignables como en el caso anterior a las diferencias en las cinéticas de las reacciones debidas a las diferentes estructuras moleculares.

En el caso del colorante rosa bengal los resultados son similares a los encontrados con la eritrosina.

Todo lo anterior se puede resumir en la siguiente tabla:

Colorante	Aminas distinguidas							
Eosina Y	3	5	6	7	9	10	12	14
Eritrosina	3+5	6	9	10	12	-	-	-
Floxina	1	3	5	10	11	12	-	-
Rosa bengal	3+5	6	1+9	10+12	-	-	-	-

Tabla 10. Resumen de las aminas que se pueden distinguir con cada colorante.

En la tabla 10 se muestran las aminas que se distinguen. El símbolo + indica cuando se distinguen en grupo las aminas correspondientes.

Con los datos de la tabla 10 y comparando entre aminas se pueden resumir los resultados de la discriminación de las diferentes aminas mediante el análisis de componentes principales en la tabla 11 a continuación:

Amina	Número	Colorante 1º	Colorante 2º
Atropina	1	Floxina	Rosa bengal
Brucina	2	-	-
Cocaína	3	Floxina	Eosina Y
Codeína	4	-	-
DEOA	5	Eosina y	Floxina
Escopolamina	6	Eritrosina	Floxina o eosina Y
Heroína	7	Eosina y	-
Monocrotalina	8	-	-
Morfina	9	Eosina y	Eritrosina
Nicotina	10	Floxina	Eosina Y o eritrosina
Retrorsina	11	Floxina	-
TEOA	12	Eosina y	Eritrosina o floxina

Vincamina	13	-	-
Yohimbina	14	Eosina Y	-

Tabla 11. Resumen que muestra los dos mejores colorantes ordenados con los que es posible la distinción de las diferentes aminas.

De los resultados obtenidos mediante el análisis de componentes se extrae como conclusión que mediante el uso de estos colorantes se pueden discriminar 10 de las 14 aminas. En la tabla 11 se presenta la opción más sencilla de hacerlo (es decir usando el colorante 1º) y se refiere siempre a los colorantes que mejor discriminan. Los mejores colorantes para la discriminación son la eosina Y y la floxina.

Finalmente, sólo quedarían las aminas brucina, codeína, monocrotalina, y vincamina que, aunque serían discriminables respecto al resto, no entre sí. Aun así, se podría hacer un estudio mucho más amplio añadiendo más colorantes y otras aminas, todo dependiendo de lo que se quiera detectar para adaptarlo a diferentes muestras y aplicaciones. También se podría hacer un estudio en el que hubiera implicado varias aminas en disolución y si es posible distinguirlas. Esto no se ha realizado porque llevaría mucho tiempo y este trabajo se ha centrado en la siguiente parte de aplicaciones de este método a muestras reales.

1.6. Patente y estudio de viabilidad

A medida que avanzaba la investigación se suscitó nuestro interés por la posibilidad de explorar sus aplicaciones prácticas. Coincidió ese interés en el tiempo con la convocatoria interna de la Universidad de Burgos denominada Prueba Concepto dirigida a financiar estudios de viabilidad de posibles aplicaciones de los sistemas que estudian los investigadores de la universidad.

Con los resultados hasta aquí presentados, se participó en la convocatoria y se consiguió una ayuda para realizar un estudio de viabilidad sobre la posibilidad de construir un kit para la detección y discriminación de aminas basado en la detección de aminas terciarias por fluorescencia. Dicho estudio fue llevado a cabo por la empresa Blubusiness. Esta empresa elaboró un informe sobre este novedoso método de análisis de aminas terciarias. En él se recogía un análisis de mercado de los ámbitos potenciales como muestra la siguiente figura.



Figura 72. Áreas de Interés y control de presencia y concentración de aminas terciarias.

La detección y cuantificación de aminas terciarias es un asunto de gran interés en muchos ámbitos de nuestra sociedad como se indica a continuación:

- **Ámbito Alimentario:** detección e identificación y cuantificación de sustancias tóxicas o contaminantes.
- **Ámbito Agropecuario** (subsectores agrícola, ganadero y apicultor): controles de seguridad alimentaria para animales y humanos.
- **Ámbito Médico:** diagnósticos de urgencia en centros hospitalarios, controles en centros de desintoxicación, etc.
- **Ámbito Cosmético:** detección de sustancias tóxicas en industria cosmética.
- **Ámbito Seguridad Vial:** prevención de consumo de estupefacientes, control de la seguridad de la red viaria imponiendo controles de consumo de drogas a conductores (identificación y cuantificación de diferentes drogas de abuso ilegales y medicamentos con los cuales la conducción se ve alterada).
- **Ámbito Legal:** control de tráfico de estupefacientes o drogas de abuso ilegales.

También se abordó en este informe un análisis de fortalezas y debilidades del método de análisis, las cuales se reflejan en la siguiente figura. También se incluyó en el informe la posibilidad de creación de un kit portátil para la detección de aminas terciarias y su posible comercialización.

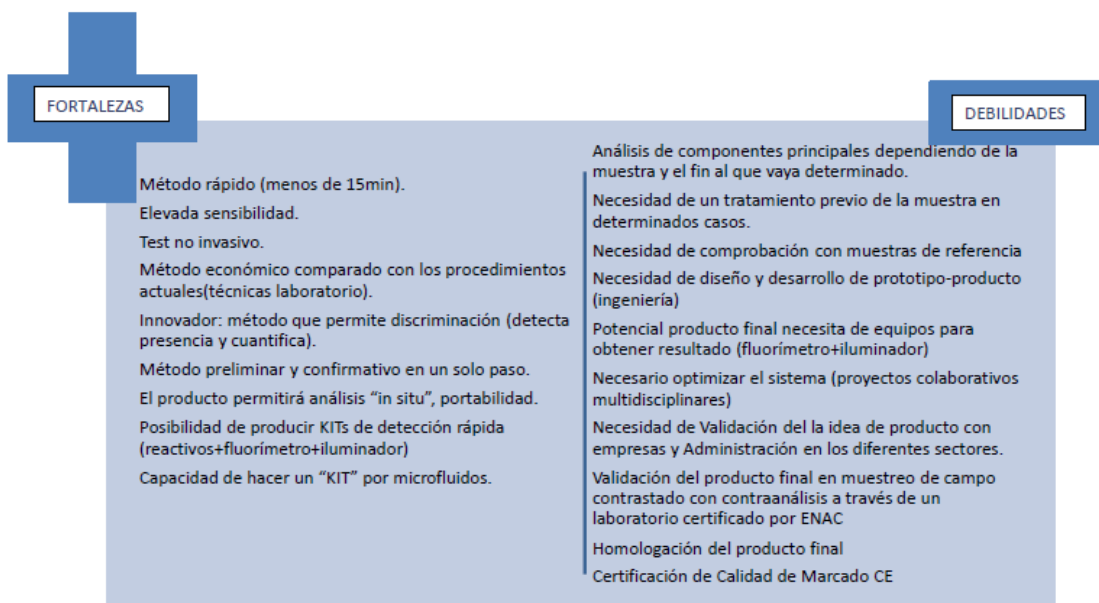


Figura 73. Fortalezas y debilidades del método de detección por fluorescencia de aminas terciarias (informe elaborado por Blubusiness).

No obstante, estas debilidades expuestas se pueden solventar mediante los testeos previos necesarios y con proyectos colaborativos para sacar adelante un prototipo funcional. Las validaciones y homologaciones serían el paso final, pero es más un tema económico y de tiempo.

Con base a los resultados de nuestra investigación y al informe de fortalezas y debilidades, se decidió crear un microdispositivo para la detección in situ de estas aminas como se verá en el capítulo correspondiente.

También con estos resultados se solicitó una patente internacional para proteger este nuevo método: Detección por fluorescencia de aminas terciarias (PCT/ES2017/070034).

1.7. Conclusiones

Para terminar con este capítulo se podría decir:

- Se ha diseñado un método de análisis de aminas terciarias que no solo detecta, sino que también es capaz de discernir entre diferentes aminas.
- Los reactivos utilizados en el análisis son baratos y no se producen residuos muy contaminantes, además de usar sólo agua como disolvente.
- Dependiendo de las aminas a analizar se podría mejorar el método usando los colorantes óptimos y las condiciones necesarias para cada estudio.
- Parece un método viable para su aplicación en muestras reales y es de lo que va a tratar el capítulo 2 de esta tesis.

CAPÍTULO 2. APLICACIONES DE DETECCIÓN

2. APLICACIONES DE DETECCIÓN

2.1 introducción:

Una vez que se hubo comprobado que el método de detección de aminas terciarias tiene una respuesta fácilmente cuantificable y reproducible, se pretende aplicar a muestras reales para establecer el potencial que este método puede proporcionar. Como aplicación de gran interés se decidió abordar lo relacionado con el tema de las drogas y todo lo que se refiere a la detección y prevención ya que es una adicción que no solo es un problema para el adicto sino también para toda la sociedad en general. Viendo que el método es bastante sensible a los opiáceos se comenzó probando la detección de estas sustancias y más concretamente la de heroína en muestras de la calle proporcionadas por la policía. Esta sustancia se clasifica dentro de los opiáceos, que son las sustancias derivadas del opio. Hay tres grandes clases de sustancias opiáceas: alcaloides del opio, tales como morfina (el opiáceo prototípico) y codeína; opiáceos semi-sintéticos, tales como heroína y oxicodona; y opioides completamente sintéticos, tales como petidina y metadona, que tienen una estructura no relacionada con los alcaloides del opio.

Los opiáceos y los opioides encabezan la lista de las sustancias que causan más enfermedades y muertes relacionadas con drogas en todo el mundo, aunque también proporcionan beneficios como tratamientos. La morfina se utiliza a menudo como analgésico para aliviar el dolor intenso tras la cirugía o el dolor oncológico intenso. La codeína, por ser menos eficaz que la morfina, se utiliza para dolores menos agudos. Sin embargo, la heroína, aunque surgió inicialmente para su uso como medicamento; actualmente su uso se encuentra altamente restringido en la mayoría de los países por tratarse de una droga de abuso. Las drogas de abuso son sustancias naturales, semi-sintéticas o sintéticas que influyen en el Sistema Nervioso Central y que se consumen con objeto de generar diferentes efectos en la persona.

La monitorización de las urgencias hospitalarias⁷⁷ en consumidores de sustancias psicoactivas, establece una relación de personas que acuden a urgencias relacionadas con el consumo no médico o no terapéutico de sustancias psicoactivas en España, lo cual refleja la necesidad de utilización de sistemas y análisis de identificación y cuantificación de las mismas en centros hospitalarios. Los registros del año 2013 muestran que se notificaron 12.037 episodios de urgencias en los que la historia clínica recogía el consumo no terapéutico o no médico de alguna droga como se muestra en la figura 74. De estos, en 5.715 (47,5%) se encontró relación entre la droga y la urgencia, de ahí la importancia en obtener un resultado rápido y fiable.

⁷⁷ Plan Nacional sobre Drogas, Informe **2015**, *Indicador Urgencias hospitalarias en consumidores de sustancias psicoactivas*. Datos 1996-2013.

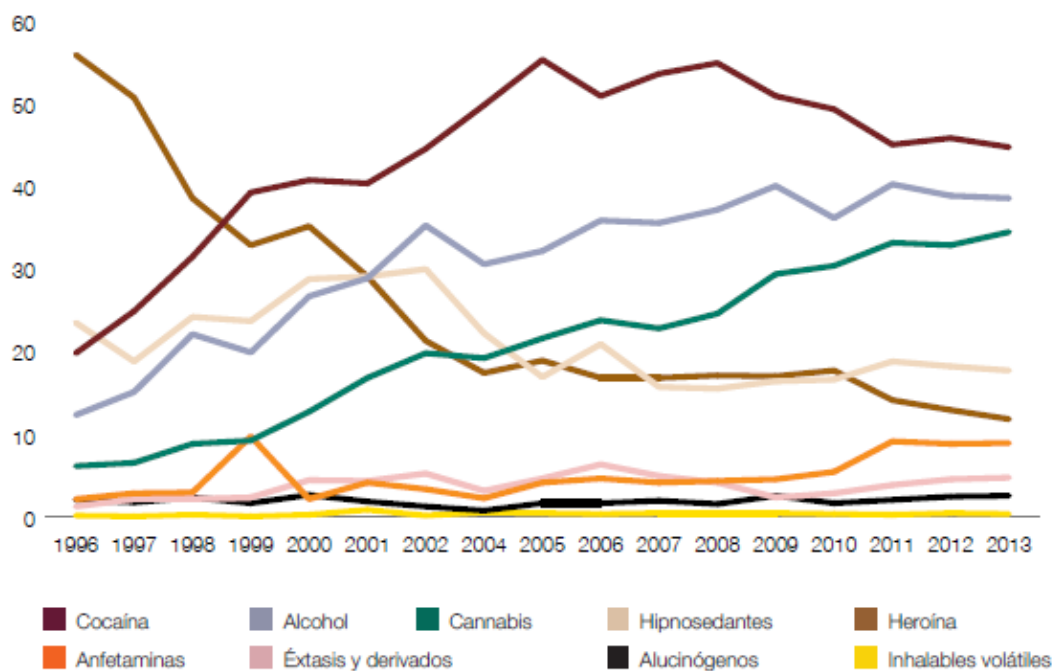


Figura 74. Evolución de los episodios de urgencias hospitalarias relacionadas con el consumo de drogas, según tipo de droga. España, 1996-2013. Fuente: OEDT. Indicador Urgencias hospitalarias en consumidores de sustancias psicoactivas.

En Estados Unidos, los cálculos a nivel nacional sobre las visitas a las salas de emergencias relacionadas con el consumo de drogas de la Red de Alerta sobre el Abuso de Drogas (DAWN), sistema de vigilancia de salud pública, alcanzaron en el año 2009, últimos datos publicados, los casi 2,1 millones de visitas a las salas de emergencias por consumo de drogas. El 27,1% estaban relacionadas con el uso no médico de fármacos (por ejemplo, de medicamentos de prescripción, de medicamentos sin necesidad de prescripción y de suplementos dietéticos). El 21,2% estaban relacionadas con el consumo de drogas ilícitas. El 14,3% de las visitas estuvieron relacionadas con el alcohol, en combinación con otras drogas.⁷⁸

Todas y cada una de las visitas a las salas de urgencias relacionadas con el consumo de drogas, son determinadas a través de un examen toxicológico, diversas pruebas que determinan el tipo y la cantidad aproximada de drogas legales e ilegales que una persona ha tomado. Se hace con mayor frecuencia utilizando una muestra de sangre u orina. Sin embargo, puede efectuarse poco después de que la persona ingiera el medicamento, utilizando los contenidos

⁷⁸ National Institute on Drug Abuse, NIDA. (<https://www.drugabuse.gov/>)

estomacales obtenidos a través de un lavado gástrico (bombeo estomacal) o después de vomitar. Este examen, con frecuencia, se utiliza en situaciones médicas de emergencia y puede emplearse para evaluar posibles sobredosis o intoxicaciones accidentales o intencionales. Puede ayudar a determinar la causa de toxicidad aguda por drogas, vigilar la farmacodependencia y determinar la presencia de sustancias en el cuerpo para propósitos médicos o legales.

Debido a lo explicado se pensó también en aplicaciones de detección de los metabolitos de estas sustancias en muestras biológicas. Así en aplicaciones posteriores en el laboratorio, se probó a detectar el metabolito mayoritario proveniente del consumo de estos opiáceos. Este metabolito producido en el hígado es el glucurónido-3-morfina (M3G). Este metabolito aparece como transformación de la morfina o heroína entre un 54 y un 74%.⁷⁹ También aparece en menor proporción el metabolito glucurónido-6-morfina que es más activo analgésicamente.⁸⁰ Al probar el M3G con el método descrito en el anterior capítulo anterior se observó que funcionaba perfectamente y por lo tanto también se buscó una aplicación para su detección en orina como se verá más adelante.

2.2. Detección y cuantificación de heroína

El método de detección de aminas terciarias por fluorescencia es un método con potencial aplicación para analizar muestras de heroína de la calle, por lo cual se estudió la posibilidad de realizar un calibrado y aplicarlo a muestras reales. Con este objetivo se pidieron muestras de esta sustancia a la policía, provenientes de incautaciones en diversos controles. Para esta tarea se necesita relacionar la cantidad de heroína de la muestra, es decir, su pureza con la señal de fluorescencia producida en la reacción con esta amina y la luz. La pureza de las muestras que han sido cedidas por la policía fueron determinadas mediante espectrometría de masas en laboratorios oficiales de la policía y los resultados están expresados en % de pureza de heroína en forma de sal. Como en el método aquí realizado se parte de heroína en forma neutra se realizó una corrección en los resultados finales para dar la pureza real. El error de la espectrometría de masas que se nos ha facilitado por la policía es de $\pm 5\%$. Fueron entregadas 4 muestras por la policía a las que se denominó: M1, M2, M3 y M4.

⁷⁹ Svensson, J.-O.; Rane, A.; Säwe, J.; Sjöqvist, F. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* **1982**, 230 (2), 427–432.

⁸⁰ Janicki, P. K. *Curr. Rev. Pain* **1997**, 1 (4), 264–270.



Figura 75. Muestras de heroína arriba y de cocaína debajo, aportadas por la policía de sus incautaciones.

Para relacionar la señal luminosa que capta el fluorímetro con la concentración de heroína que contiene cada muestra fue necesario encontrar una ecuación que expresara esto, y es lo que se hizo detallando el proceso a continuación.

2.2.1. Ecuación para el calibrado

Como ya se ha visto anteriormente, la fotoluminiscencia es la emisión de fotones pasando de un estado electrónico excitado al fundamental. Cuando se produce la absorción de fotones desde el estado fundamental al excitado, aumenta la energía del compuesto. Dado que todos los sistemas tienden al mínimo de energía, ese exceso de la misma se cede por diferentes caminos, todos ellos competitivos entre sí como se ha ilustrado en el capítulo 0 de la introducción. Uno de estos es la fluorescencia. En todo proceso de fotoluminiscencia debe producirse, en primer lugar, la absorción de los fotones. Teniendo presente la ley de Lambert-Beer como recoge la ecuación 7,

$$A = -\log \frac{I}{I_0} = \epsilon l C$$

Ecuación 7.

Donde I es la radiación transmitida, I_0 la radiación incidente, ε coeficiente de extinción molar o absorptividad, l la longitud de la cubeta y C la concentración del sustrato en M (mol/l). La ecuación 1 se puede plantear como la siguiente ecuación:

$$\frac{I}{I_0} = 10^{-\varepsilon l C}$$

Ecuación 8.

Si I es la radiación transmitida, entonces la radiación absorbida I_a , se puede determinar como la diferencia entre la radiación incidente menos la transmitida, $I_a = I_0 - I$. Teniendo en cuenta ésta, la ecuación 8 se puede reestructurar de la siguiente forma,

$$1 - \frac{I}{I_0} = \frac{I_0 - I}{I_0} = \frac{I_a}{I_0} = 1 - 10^{-\varepsilon l C}$$

Ecuación 9.

Una vez que los fotones se absorben pasando a un estado electrónico excitado, éstos regresan al estado fundamental por diferentes caminos. Para determinar cuanta energía cede en cada proceso que se da en el estado excitado, se definen los rendimientos cuánticos, ecuación 10.

$$\Phi = \frac{k_r}{k_r + k_{nr}}$$

Ecuación 10.

Donde k son las constantes de velocidad de los diferentes procesos de desactivación que tienen lugar. La suma de todos los rendimientos cuánticos debe ser igual a uno. Si se tiene en cuenta sólo la fluorescencia, la intensidad de fluorescencia vendrá dada por la siguiente ecuación:

$$I_f = \Phi_f I_a$$

Ecuación 11.

A partir de las ecuaciones 9 y 11, se obtiene la siguiente expresión,

$$I_f = \Phi_f I_o (1 - 10^{-\epsilon l C})$$

Ecuación 12.

Conocida la intensidad de fluorescencia y la concentración correspondiente, se puede realizar un ajuste no lineal por mínimos cuadrados, en el que los parámetros a determinar son los productos $\Phi_f I_o$ y ϵl .

Después de probar el ajuste con esta ecuación se observó que se corresponde bastante bien; pero los coeficientes no son reales ya que consideramos como concentración que se va cambiando la de heroína y no la del compuesto fluorescente como debería ser. Por esto la ecuación que se va a usar para el ajuste es la misma, pero modificando los coeficientes por otros sin este significado físico:

$$I_f = A(1 - 10^{-BC})$$

Ecuación 13.

2.2.2. Ajuste experimental y resultados

Se procedió en primer lugar a realizar un calibrado con heroína pura para luego cuantificar el porcentaje de heroína que contienen las muestras de la calle. Esto se llevó a cabo entre un rango de concentraciones de 10^{-7} – 10^{-5} M. La concentración de colorante (eosina Y) es de 10^{-6} M para todas las medidas. Se eligió este rango porque como se explicará más adelante es el adecuado para medir en muestras de orina ya que la concentración de droga se suele encontrar dentro de estos valores.

Se prepararon las disoluciones de distintas concentraciones y sus réplicas burbujeando nitrógeno antes de medir. La muestra se midió, se iluminó durante 10 minutos y se volvió a medir. Es el mismo procedimiento realizado en el capítulo anterior.

Los valores de fluorescencia fueron tomados a 520 nm, siendo 495 nm la longitud de onda de excitación. Los resultados recogidos en la tabla 12 corresponden al producto final de mezclar el colorante 10^{-6} M, con las diferentes concentraciones de heroína y el medio básico, después de 10 minutos de irradiación.

[Heroína] (μ M)	I_f (u.a.)
0,2	244
0,4	338

0,6	410
0,8	424
1	499
2	518
4	527

Tabla 12. Valores de la intensidad de fluorescencia en función de la concentración de heroína, tomados a 520 nm.

Representando estos valores se obtiene la siguiente gráfica (figura 76):

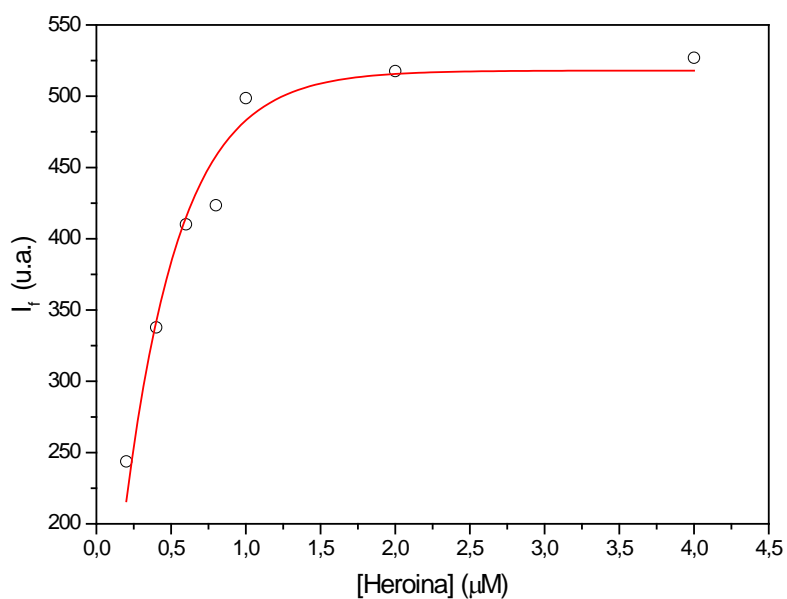


Figura 76. Variación de la fluorescencia en función de la concentración de heroína. En rojo el ajuste realizado con la ecuación 7.

Los valores del ajuste utilizando la ecuación 13 fueron los mostrados en la tabla 13:

Coeficiente	Valor	Error
A (u.a.)	518	± 14
B (10⁶· M⁻¹)	1,2	± 0,1

Tabla 13. Valores de ajuste con su error correspondiente.

Con este ajuste se quiere comprobar si los resultados de pureza son similares con los resultados que obtuvo la policía con la espectrometría de masas. Para esta tarea se probó con las dos primeras muestras siguiendo el procedimiento habitual: se disolvió en agua la cantidad necesaria de heroína para llegar a una concentración de 10^{-4} M y diluyéndolo en la cubeta hasta una concentración final de $5 \cdot 10^{-6}$ M. Así, si la pureza fuera del 100 % se obtendría el valor de intensidad máxima, pero al no serlo, produce una señal más baja y se interpreta como una pureza más baja que mediante el calibrado se conoce el valor exacto. El resto que falta para llegar al 100 % de pureza son excipientes que se usan al preparar estas sustancias para rebajar la pureza. Se realizaron tres réplicas de cada muestra y en las tablas se muestra el valor medio obtenido.

Para hallar el valor de concentración de las muestras reales hay que usar la ecuación 13 despejando C para que quede en función de I_f :

$$C = \frac{\log(1 - \frac{I_f}{A})}{-B}$$

Ecuación 14. Concentración de heroína en función de la intensidad de fluorescencia y los parámetros A y B del calibrado.

A partir del ajuste, las muestras de la Policía arrojaron las siguientes concentraciones:

	ΔI_f (u.a.)	Concentración (μ M)	Pureza neutra	Pureza sal	Pureza %	Pureza policía %
M1	435	0,661	0,132	0,152	15,2	17 \pm 5
M2	388	0,5	0,0999	0,115	11,5	16 \pm 5

Tabla 14. Pureza de la heroína encontrada comparándola con la de la encontrada por la policía.

Para ser más precisos en las medidas y resultados y sobre todo si no se realizan en el mismo día, se pueden normalizar los datos realizando la siguiente operación: $\Delta I_f = I_f^{\text{final}} - I_f^{\text{inicial}}$. Siendo I_f^{final} la intensidad de fluorescencia tomada a los 10 minutos y I_f^{inicial} la medida a tiempo cero. Para estos casos la ecuación 13 se puede plantear como,

$$\Delta I_f = \Delta A(1 - 10^{-BC})$$

Ecuación 15.

Se volvió a plantear el calibrado de la misma forma que antes, pero usando la ecuación 15 y se obtuvo la siguiente tabla.

[Heroína], μM	ΔI_f (u.a.)
0,2	180
0,4	272
0,6	340
0,8	365
1	407
2	456
4	468

Tabla 15. Valores de variación de fluorescencia en función de la concentración de heroína, tomados a 520 nm.

Representando los valores obtenidos se obtiene la gráfica de la figura 77.

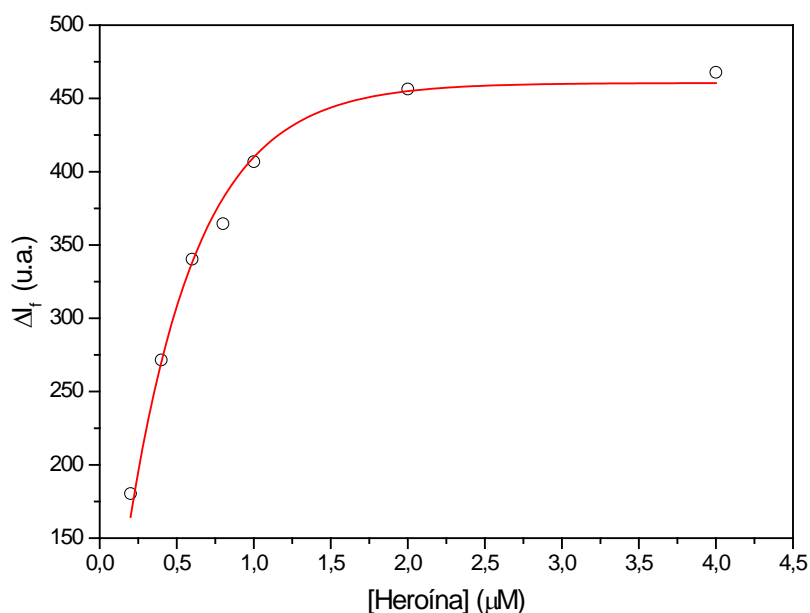


Figura 77. Variación del incremento de fluorescencia en función de la concentración de heroína. En rojo el ajuste realizado con la ecuación 9.

Los valores del ajuste fueron los recogidos en la siguiente tabla:

Coefficiente	Valor	Error
ΔA (u.a.)	460	± 8
B ($10^5 M^{-1}$)	9,6	$\pm 0,5$

Tabla 16. Valores de ajuste con su error correspondiente.

A partir del ajuste, las muestras de la Policía arrojaron las siguientes concentraciones:

	ΔI_f (u.a.)	Concentración (μM)	Pureza neutra	Pureza sal	Pureza %	Pureza policía %
M1	350	0,643	0,129	0,148	14,8	17 ± 5
M2	320	0,537	0,107	0,123	12,3	16 ± 5
M3	356	0,668	0,134	0,153	15,3	13 ± 5
M4	445	1,508	0,302	0,346	34,6	54 ± 5

Tabla 17. Pureza de la heroína encontrada comparándola con la de la encontrada por la policía.

La muestra M4 no da el resultado esperado, pero se repitió múltiples veces y siempre se obtuvo el mismo valor.

También se ha probado a realizar el ajuste a otra longitud de onda de emisión, para ver si se mejora, siendo la longitud de onda elegida 518 nm. La tabla 18 refleja los resultados obtenidos.

[Heroína], μM	ΔI_f (u.a.)
0,2	189
0,4	284
0,6	356
0,8	384
1	425
2	476
4	494

Tabla 18. Valores de variación de fluorescencia en función de la concentración de heroína, tomados a 518 nm.

Representando las diferencias de intensidades frente a la concentración se obtiene la gráfica de la figura 78.

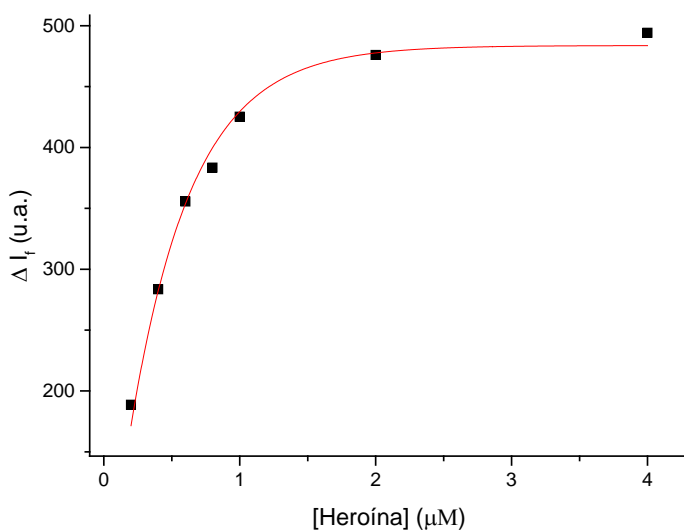


Figura 78. Variación del incremento de fluorescencia en función de la concentración de heroína. En rojo el ajuste realizado con la ecuación 9.

Usando la ecuación 15 como ecuación de ajuste resulta la tabla 19.

Parámetros	Valor	Error
ΔA (u.a.)	480	± 8
B (10⁵ M⁻¹)	9,5	± 0,5

Tabla 19. Valores de ajuste con su error correspondiente.

A partir del ajuste, las muestras de la Policía realizando las medias correspondientes y calculando el error, arrojaron las siguientes concentraciones:

Muestra	ΔIf (u.a.)	Concentración (μM)	Pureza neutra	Pureza sal	Pureza %	Pureza policía %
M1	367	0,650	0,130	0,149	15 ± 2	17 ± 5
M2	332	0,528	0,106	0,121	12 ± 2	16 ± 5
M3	367	0,648	0,130	0,149	15 ± 2	13 ± 5
M4	469	1,575	0,315	0,362	36 ± 7	54 ± 5
M4 dil	398	0,792	0,159	0,182	18 ± 2	

Tabla 20. Pureza de la heroína encontrada comparándola con la de la encontrada por la policía. M4 dil es la muestra M4 diluida a la mitad para ver si el mal resultado era por estar más concentrada la muestra.

El valor para M4 se sigue repitiendo como en el caso anterior.

Como curiosidad se encontró en la muestra M4 con un precipitado que no se disolvía y se tuvo que filtrar, pero más tarde se descubrió que se disolvía en presencia de medio ácido con desprendimiento gaseoso por lo que es muy probable que esta muestra estuviera preparada con carbonato o bicarbonato como sustancia para reducir la pureza.

2.2.3. Conclusiones

- A la luz de los resultados se puede comprobar que este método es adecuado para la cuantificación de heroína.
- Es un proceso más simple y barato que la espectrometría de masas.
- Para verificar que la reproducibilidad y la repetibilidad del método son las correctas, se requiere de un número mayor de experimentos con muestras reales
- Asimismo, también se necesitan más experimentos para entender el comportamiento de la muestra M4 ya que se probó también a diluir a la mitad la muestra arrojando el mismo resultado de concentración.

2.3. Detección y cuantificación de pirrolizidinas en miel y polen

Los alcaloides de tipo pirrolizidina (APs) (figuras 79 y 81) son metabolitos secundarios producidos por diferentes especies de plantas como sistema de defensa contra los animales herbívoros pudiendo causar diferentes daños e incluso cáncer en humanos y animales.⁸¹ Estos APs están presentes en aproximadamente 6000 especies de plantas, lo cual significa el 3% de las plantas con flores. Los alcaloides pirrolizidina pueden ser ingeridos a través del consumo de plantas medicinales o cultivos agrícolas.⁸² La miel y el polen puede contener igualmente estos APs y su nivel de contaminación dependerá del origen geográfico y botánico de la muestra. (Figura 80).⁸³

⁸¹ Plants containing PAs: (a) Smith, L. W.; Culvenor, C. C. J. *J. Nat. Prod.* **1981**, *44*, 129-152; genotoxicity: (b) Fu, P. P.; Xia, Q.; Lin, G.; Chou, M. W. *Drug Metabol. Rev.* **2004**, *36*, 1-55; PAs-DNA adducts: (c) Zhao, Y.; Xia, Q.; Gamboa da Costa, G.; Yu, H.; Cai, L.; Fu, P. P. *Chem. Res. Toxicol.* **2012**, *25*, 1985-1996; tumorigenicity: Xia, Q.; Zhao, Y.; Von Tungeln, L. S.; Doerge, D. R.; Lin, G.; Cai, L.; Fu, P. P. *Chem. Res. Toxicol.* **2013**, *26*, 1384-1396.

⁸² Herbal plants containing PAs: (a) Fu, P. P.; Xia, Q.; Chou, M. W.; Lin, G. *J. Food Drug Anal.* **2007**, *15*, 400-415; (b) Fu, P. P.; Yang, Y.-C.; Xia, Q.; Chou, M. W.; Cui, Y. Y.; Lin, G. *J. Food Drug Anal.* **2002**, *10*, 198-211; food chain detection and analysis of PAs: (b) Cramer, L.; Schiebel, H.-M.; Ernst, L.; Beuerle, T. *J. Agric. Food Chem.* **2013**, *61*, 11382-11391.

⁸³ PAs extraction and detection from honey: Reviews: (a) Edgar, J. A.; Roeder, E.; Molyneux, R. J. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 2719-2730; (b) Kempf, M.; Wittig, M.; Reinhard, A.; von der Ohe, K.; Blacquièrre, T.; Ræzke, K.-P.; Michel, R.; Schreier, P.; Beuerle, T. *Food Add. Contam.* **2011**, *28*, 332-347.

Estudiar estos alcaloides es necesario para correlacionarlos con estos orígenes. Se suelen usar métodos como HPLC-MS⁸⁴ para la determinación de estos alcaloides. Con este método se produce la identificación específica de los alcaloides presentes en las muestras de miel por comparación con una referencia que consiste en un estándar interno. La existencia de estos APs en la miel es un problema de interés para la seguridad alimentaria, así que es importante encontrar un método que permita una precisa, sensible y rápida detección.

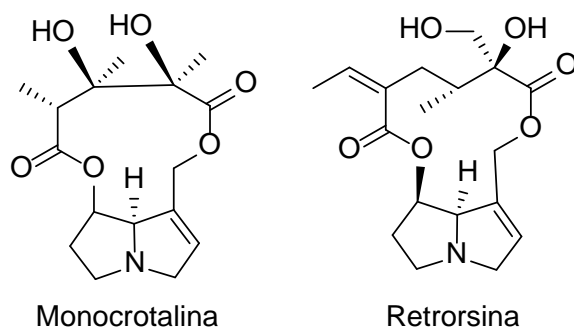


Figura 79. Dos estructuras típicas de los alcaloides pirrolizidina.

⁸⁴ PAs detection in honey by LC-MS: (a) Boppre, M.; Colegate, S. M.; Edgar, J. A.; Fischer, O. W. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 5662–5672; (b) Martinello, M.; Cristofoli, C.; Gallina, A.; Mutinelli, F. *Food Control* **2014**, *37*, 146–152; (c) Griffin, C. T.; Danaher, M.; Elliott, C. T.; Kennedy, D. G.; Furey, A. *Food Chem.* **2013**, *136*, 1577–1583; (d) Beales, K. A.; Betteridge, K.; Colegate, S. M.; Edgar, J. A. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 6664–6672; (e) Wuilloud, J. C. A.; Gratz, S. R.; Gamble, B. M.; Wolnik, K. A. *Analyst* **2004**, *129*, 150–156; Dübecke, A.; Beckh, G.; Lüllmann, C. *Food Add. Contam.* **2011**, *28*, 348–358; improved method for echium vulgare: (f) Betteridge, K.; Cao, Y.; Colegate, S. M. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 1894–1902; honey detection PAs by LC-MS: alternative methods, ELISA: (g) Oplatowska, M.; Elliott, C. T.; Huet, A.-C.; McCarthy, M.; Mulder, P. P. J.; von Holst, C.; Delahaut, P.; Van Egmond, H. P.; Campbell, K. *Anal. Bioanal. Chem.* **2014**, *406*, 757–770.



Figura 80. Algunas de las plantas que contienen estos APs y una abeja sobre una *Senecio* spp.

Los alcaloides de pirrolizidina están compuestos por una base de necina, que consiste en dos anillos unidos con un átomo de nitrógeno como puente como se puede ver en la figura 81. El par de electrones solitario del nitrógeno terciario le confiere carácter básico.

De forma general, estos APs se pueden clasificar en dos grupos en función de sus bases de necina como se muestra en la figura 81; los alcaloides de pirrolizidina 1,2-insaturados y los alcaloides de pirrolizidina 1,2-saturados, dependiendo de la presencia o no de un doble enlace entre las posiciones 1 y 2 del anillo⁸⁵.

⁸⁵ Agencia Española de Consumo y Seguridad Alimentaria y Nutrición (AECOSAN) [Publicación 13 de Septiembre 2012]
http://www.aecosan.msssi.gob.es/AECOSAN/web/seguridad_alimentaria/subdetalle/toxinas_naturales.htm

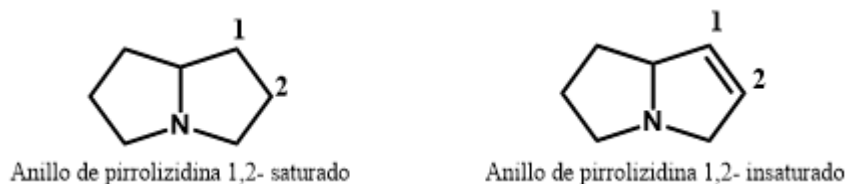


Figura 81. Bases de necina de los alcaloides de pirrolizidina.

Las estructuras representativas de los diferentes tipos de alcaloides de pirrolizidina se pueden clasificar en cuatro tipos⁸⁶ como se puede observar en la figura 82. Retronecina, Heliotridina, y Otonecina son considerados cancerígenos (Figura 83). Los del tipo platinecina no son considerados cancerígenos. Hasta la fecha, se conocen aproximadamente 600 alcaloides de pirrolizidina diferentes.⁹

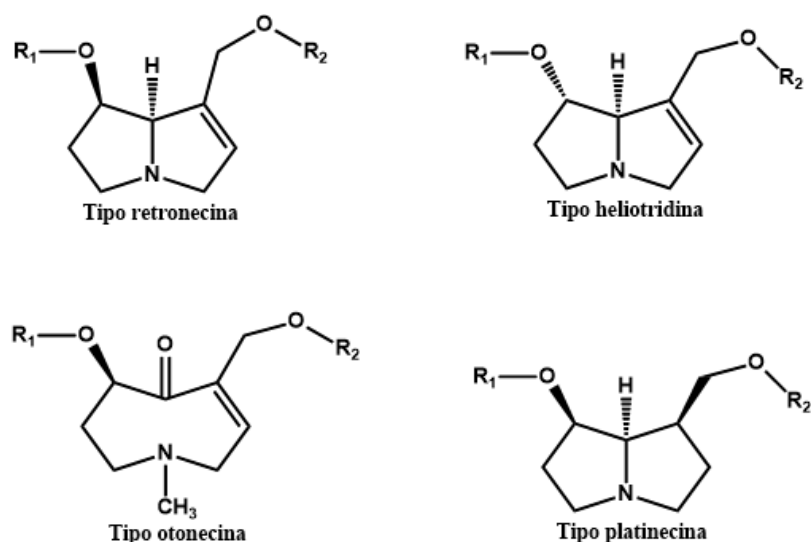


Figura 82. Estructura básica de los cuatro tipos de base necina que se encuentran en la gran mayoría de los alcaloides de pirrolizidina.

⁸⁶ Food and Agriculture Organization of United Nations (FAO/WHO). Programa conjunto FAO/WHO sobre normas alimentarias comité del codex sobre contaminantes de los alimentos. Documento de debate sobre los alcaloides de pirrolizidina. La Haya (Países Bajos), 21 – 25 de marzo de 2011. Disponible en: ftp.fao.org/codex/meetings/cccf/cccf5/cf05_14s.pdf

En la actualidad, los estudios toxicológicos realizados en ratas muestran que una exposición continuada con bajos niveles de APs en alimentos puede producir cirrosis hepática, hipertensión pulmonar y cáncer⁸⁹.

Las principales consecuencias de una exposición crónica a los APs son las siguientes⁹⁰:

- **Enfermedad veno-oclusiva hepática:** es una enfermedad asociada a la obstrucción de las pequeñas venas hepáticas, y puede derivar en cirrosis hepática o incluso necrosis del tejido hepático. Afecta tanto a animales como al ser humano.
- **Hipertensión arterial pulmonar y enfermedad cardíaca pulmonar:** ciertos alcaloides de pirrolizidina producen una secuencia de cambios en pulmones y corazón derivando en una hipertensión arterial pulmonar o enfermedad cardíaca. La toxicidad pulmonar del AP monocrotalina ha sido estudiada en profundidad. Experimentalmente la hipertensión pulmonar ha sido producida en ratas y primates. En humanos solo ha habido un caso de hipertensión pulmonar atribuido a estos alcaloides de pirrolizidina.
- **Otros órganos:** en animales hay una amplia variación de órganos afectados debido a la intoxicación por AP, dando lugar a problemas neurológicos, hemolíticos, gastrointestinales, musculares, hepáticos, pulmonares, y otros muchos. El daño inducido por los alcaloides de pirrolizidina en esos órganos no ha sido demostrado en el ser humano.
- **Carcinogénesis:** muchos de los alcaloides de pirrolizidina son cancerígenos, y se ha sugerido que la alta tasa de cáncer de hígado es debida a la exposición continuada a estos AP.

2.3.3. Límites máximos de consumo y en alimentos

No hay establecidos límites máximos oficiales de consumo para los APs. A pesar de esto, algunos países han establecido pautas regulatorias como marco de referencia en los alimentos o piensos debido a la toxicidad de los diversos alcaloides de pirrolizidina.

Según el *Dictamen Científico* sobre los APs en alimentos y piensos elaborado por el CONTAM (Panel sobre contaminantes en la cadena alimentaria), a petición de la Comisión Europea, concluyó que no era apropiado establecer una ingesta diaria tolerable (IDT), y se

⁸⁹ Kast, C.; Dübecke, A.; Kilchenmann, V.; Bieri, K.; Böhlen, M.; Zoller, O.; Beckh, G.; Lüllmann, C. J. *Apic. Res.* **2014**, *53* (1), 75–83.

⁹⁰ Peter R. Cheeke, *Toxicants of plant origin*. Volumen I alkaloids. CRC PRESS. **1989**

decidió aplicar un enfoque del margen de exposición (EME). Se estableció un valor de 70 µg/kg de peso corporal/día como límite de dosis para la exposición a este tipo de sustancias en alimentos⁹¹.

2.3.4. Análisis polínico de las muestras de miel

Las muestras de miel analizadas, fueron sometidas a un análisis polínico para determinar su origen botánico. Este análisis polínico fue llevado a cabo por el Centro Apícola Regional de Marchamalo (Guadalajara).

De esta manera, se certificó que todas las muestras analizadas contenían polen procedente de la especie *Echium vulgare* (Figura 84), lo que indica la posible presencia de equimidina (es un tipo de AP que posteriormente se explicará) en la miel.

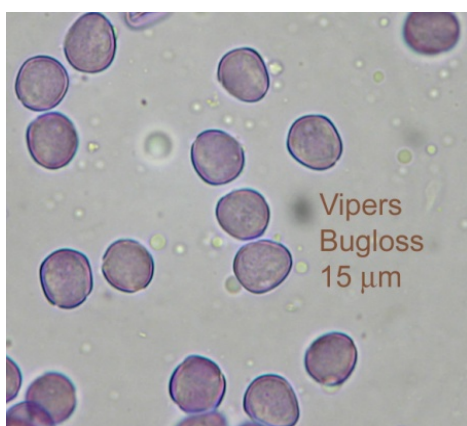


Figura 84. Polen procedente de la especie *Echium vulgare*.

2.3.5. Extracción de alcaloides de pirrolizidina mediante cartuchos de intercambio catiónico

La miel está compuesta de un 10 a 20 % de agua, de un 70 a un 80 % de carbohidratos de los cuales la mayoría son monosacáridos como la glucosa o fructosa.⁹² Los demás componentes son disacáridos y trisacáridos y más minoritarios tiene aminoácidos, proteínas, enzimas, hormonas, vitaminas, lípidos y sales.

Para empezar con las pruebas y experimentos se usó miel sintética. Como la miel es prácticamente azúcar y agua se partió de una miel artificial con: 40 % de glucosa, 40 % fructosa

⁹¹ European Food Safety Authority (EFSA). *EFSA J.* **2011**, 9 (11), 2406.

⁹² Pita-Calvo, C.; Vázquez, M. *Trends Food Sci. Technol.* **2017**, 59, 79–87.

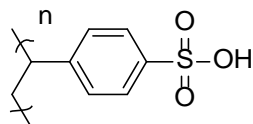
y 20 % agua para poner a prueba los métodos de extracción. Después se usó una miel comercial y ya por último con muestras recogidas de colmenas de apicultores.

El procedimiento desarrollado en esta tesis está basado en la recopilación de antecedentes descritos en bibliografía,¹⁷ pero no se ajusta a ninguno de ellos, sino que se trata de una modificación importante que justifica plenamente discutir aquí las distintas etapas del método y describir los detalles experimentales en el apartado final de la parte experimental.

Para poder llevar a cabo el análisis de los APs es necesario someter a un proceso de extracción las muestras de miel y polen. Todas las muestras de miel y polen sufrieron el mismo tratamiento antes de la determinación de los alcaloides de pirrolizidina.

Se comenzó probando con varios métodos de extracción basados en los encontrados en artículos.⁹³ Las muestras se tratan en primer lugar con ácido sulfúrico y se centrifugan, permitiendo la separación del líquido sobrenadante que contiene las APs en forma catiónica por protonación del nitrógeno. La disolución se extrae mediante un cartucho de intercambio que retiene todas las especies presentes de naturaleza catiónica. El fundamento teórico de estos cartuchos se basa en la interacción entre los alcaloides de pirrolizidina y el polímero que contiene el cartucho de extracción (Figura 85) que presenta un grupo sulfonato de alquilbenceno, quedándose así retenidos en el cartucho. El cartucho con los cationes retenidos se trata con disolución de amoníaco lo que permite la elución de los compuestos cuya base conjugada sea una base débil como los APs. El líquido resultante se lleva a sequedad (figura 88) y se procede a la separación de los APs. De los muchos intentos que se llevaron a cabo para obtener un buen calibrado y medidas sensibles y reproducibles, finalmente el éxito se consiguió disolviendo el extracto en agua, tratándolo con carbón activo sobre el que quedaban retenidas sustancias sin determinar que molestaban en las posteriores medidas y filtrando con lo que se conseguía una disolución a la que se aplicó con éxito el método de detección por fluorescencia como se describirá más adelante.

⁹³ a) Griffin, C. T.; Danaher, M.; Elliott, C. T.; Kennedy, D. G.; Furey, A. *Food Chemistry*, **2013**, 136, 1577-1583. b) Betteridge, K.; Cao, Y.; Colegate, S. M. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, 53 (6), 1894–1902. c) Dübecke, a; Beckh, G.; Lüllmann, C. *Food Addit. Contam. Part A* **2011**, 28 (3), 348–358. D) Orantes-Bermejo, F. J.; Serra Bonvehí, J.; Gómez-Pajuelo, A.; Megías, M.; Torres, C. *Food Addit. Contam. Part A* **2013**, 30 (10), 1799–1806.



Sulfonato de alquilbenceno

Figura 85. Composición del material de extracción del cartucho Phenomenex Strata-X-C.

En todas las muestras de miel y polen (figura 86) se llevó a cabo el mismo procedimiento para la determinación y cuantificación de los alcaloides de pirrolizidina (APs). El procedimiento experimental detallado se encuentra en el apartado dedicado a la parte experimental de esta tesis, aunque a continuación se encuentra un resumen del mismo.



Figura 86. Muestras de miel y polen analizadas. Las muestras de miel S-10921 y S-10839 no fueron analizadas. El polen 1 y 2 son comerciales. El polen 0 es un polen procedente de la Alcarria que fue comprado en un mercadillo ambulante.

Método de extracción resumido:

Lavar y acondicionar la columna de extracción con 3 ml de NH_4OH al 1% + 3 ml de MeOH + 6 ml de H_2SO_4 0,05 M.

Preparación de la muestra: 4g de miel + 5 ml de H_2SO_4 0,05M + 1 ml de agua con el patrón, se ponen en un tubo para centrifugar durante 25 minutos a 7500 rpm. Queda un precipitado que se desecha.

El sobrenadante del tubo se transvasa al cartucho de extracción. Para que los APs queden retenidos, la disolución se mantiene un tiempo de forma que por gravedad vayan cayendo e interaccionando con el polímero del cartucho de extracción.

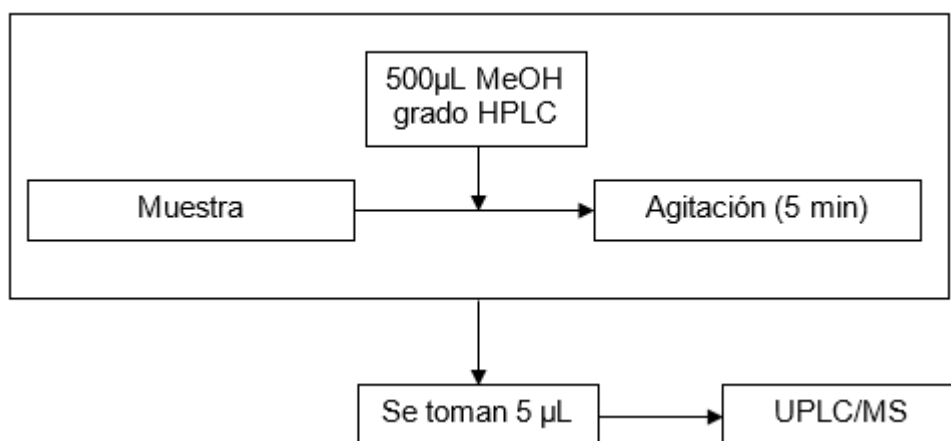
Se lava el cartucho de extracción con 3 ml de agua + 3ml de MeOH.

Se eluye la pirrolizidina con ayuda de 9 ml de NH_3 en MeOH al 1%.

Para finalizar se evapora el disolvente.

2.3.6. Determinación del contenido en APs mediante UPLC/MS

La espectrometría de masas se fundamenta en la identificación de especies moleculares o atómicas en relación a su peso molecular. El procedimiento utilizado está basado en antecedentes bibliográficos^{93a} y los detalles se describen en la parte experimental. Un esquema de introducción de la muestra en el equipo (figura 87) es el siguiente.



Esquema 4. Diagrama para el tratamiento de la muestra antes de ser inyectada en el UPLC/MS.



Figura 87. Equipo empleado para la espectrometría de masas.

2.3.7. Determinación del contenido en APs mediante espectrofotometría de fluorescencia

El método aquí empleado es el mismo método novedoso que se ha expuesto en el capítulo anterior de esta tesis y se emplea para comparar con el uso de la técnica de espectrometría de masas. Además, es un método más barato y sencillo que permite detectar la presencia o ausencia de alcaloides de pirrolizidina en una muestra de miel, y determinar la concentración total de los mismos.

El procedimiento del método se puede resumir en tres partes:

- La primera parte del método es la extracción de los alcaloides de pirrolizidina igual que se ha explicado anteriormente mediante cartuchos de intercambio catiónico. En la imagen siguiente se puede observar el residuo recogido después de aplicar el método de extracción a la muestra.



Figura 88. Extracto de muestra de miel a analizar una vez extraídos los APs.

- La segunda parte del método se realizó para eliminar compuestos coloreados procedentes de la miel que interfieren en las medidas. Para ello, se realizó lo siguiente:
 - Se añadieron 3 mL de agua destilada + 2 gotas de NaOH 0,1M (para que el alcaloide se encuentre en su forma neutra) (Figura 89).



Figura 89. Extracto de muestra de miel diluida en H₂O destilada y en medio básico.

- Se añadieron 3 mL de diclorometano (DCM), se agitó bien y se obtuvieron dos fases (Figura 90 a). La fase acuosa (en la cual está presente el color) y la fase orgánica (en la cual están presentes los alcaloides), recogién dose esta última en otro vial aparte. Se llevaron a cabo en total tres extracciones con DCM (9 mL totales) (Figura 90 b).

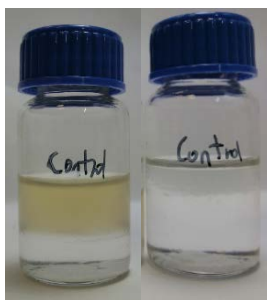


Figura 90.a) Vial de la izquierda muestra con H₂O destilada y diclorometano. b) Vial de la derecha contiene la extracción con diclorometano.

- Posteriormente, se evaporó el DCM a una temperatura de 40 ± 1 °C.
- La tercera parte del método (Figura 91) se realizó para determinar la concentración total de alcaloides de pirrolizidina mediante espectrofotometría de fluorescencia. Para ello, se realizó el mismo procedimiento que en el capítulo anterior:
 - A la muestra evaporada se la disolvió en agua destilada. Se agitó bien.
 - A continuación, se añadió el colorante y el medio básico en una cubeta de cuarzo y seguidamente la muestra diluida en agua destilada.

- Por último, se ilumina la muestra y se realiza la medición en el fluorímetro.



Figura 91. Izquierda: Colorante (vial izquierdo) y colorante + APs (vial derecho): (a) antes de iluminar; (b) después de iluminar; (c) bajo la luz UV.

2.3.8. Resultados y discusión

Todas las mieles procedían de la Comunidad Autónoma de Madrid y fueron proporcionados por el centro apícola regional de Marchamalo, Guadalajara.

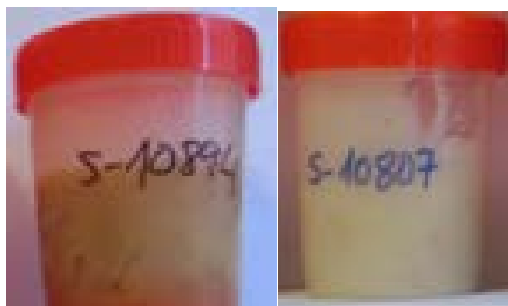


Figura 92. Ejemplos de muestras analizadas S-10894 y S-10807.

Uno de los objetivos de este apartado es la detección de los distintos tipos de alcaloides de pirrolizidina presentes en muestras de miel contaminada. De acuerdo con la zona de procedencia de las mieles, los principales APs más abundantes en la miel son la equimidina y la licopsamina que provienen de las plantas de la familia *Boraginaceae* como el género *echium* y otras del género *senecio* que son de la familia *Asteraceae*.

Se adicionó un patrón interno de retrorsina para poder cuantificar los alcaloides presentes en las muestras de miel. La figura 93 muestra la estructura de los diferentes alcaloides de pirrolizidina presentes en las muestras de miel:

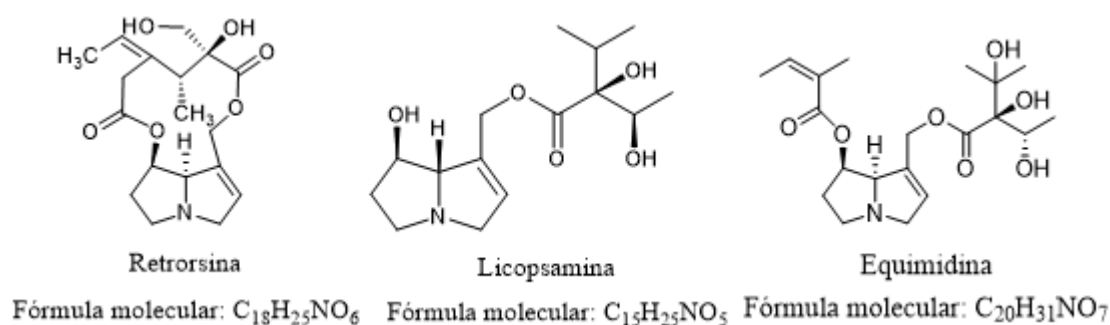


Figura 93. Estructura y fórmula molecular de los alcaloides de pirrolizidina estudiados.

2.3.8.1. Resultados del análisis por UPLC/MS

En primer lugar, se realizó la recta de calibrado del patrón interno de retrorsina. La Figura 94 y Tabla 21 representa la recta de calibrado, enfrentando las áreas bajo la curva del cromatograma con respecto a las concentraciones de patrón de retrorsina. En este calibrado se quiere comprobar que en el rango de medida se tiene una recta que indica la relación proporcional entre concentración y señal.

[Retrorsina] (ppm)	Área ($10^6 \cdot \text{u.a.} \cdot \text{ppm}$)
0,01	0,073
0,1	0,509
0,5	2,290
1	4,679
2	8,853

Tabla 21. Valores de concentración y áreas de la retrorsina

Con estos resultados se representa el área frente a la concentración obteniendo la gráfica mostrada en la figura 94.

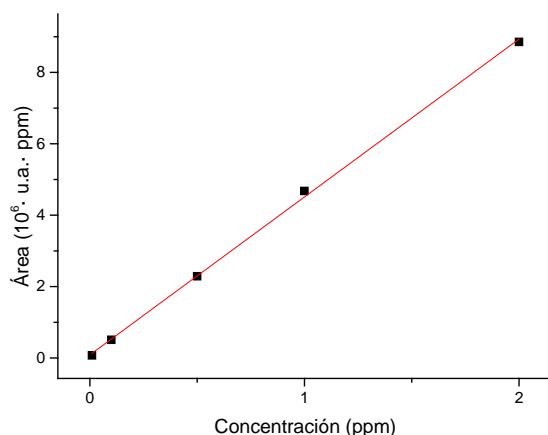


Figura 94. Recta de calibrado del patrón de retrorsina.

Se puede observar como la recta de calibrado es satisfactoria y se puede trabajar en este rango de concentraciones.

La Tabla 22 detalla los tiempos de retención ($R_{t_{min}}$) obtenidos para las condiciones de trabajo utilizadas, la fragmentación y los productos iónicos característicos de cada AP:

AP	$R_{t_{min}}$	Ión precursor $[M+H]^+$	Productos iónicos
Licopsamina	4,4	300	263; 140; 120; 84
Equimidina	3,7	398	338; 220; 120; 83
Retrorsina	2,7	352	324; 276; 138; 120

Tabla 22. Tiempos de retención ($R_{t_{min}}$) y productos iónicos de los alcaloides de pirrolizidina.

Seguidamente se procedió a realizar los análisis de estas mieles obteniendo los cromatogramas y espectros correspondientes. Estos cromatogramas se encuentran a continuación mostrando los resultados de la miel S-10894 y posteriormente los de la miel S-10807 como ejemplos del análisis que se llevó a cabo. Como se ha explicado anteriormente (método de extracción), se añadió a todas las muestras 1 mL de una disolución patrón de retrorsina cuya concentración es de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (1 ppm) antes de la extracción con los cartuchos de intercambio catiónico.

Se obtuvieron los siguientes resultados:

2.3.8.1.1. Muestra S-10894

- **Cromatograma m/z 352 (Retrorsina)**

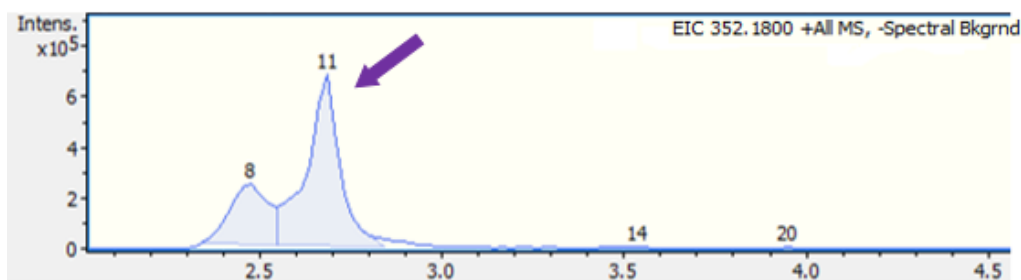


Figura 95. Cromatograma m/z 352 correspondiente a la muestra S-10894.

En las condiciones de realización, la retrorsina presenta un pico característico en el cromatograma al tiempo de retención de 2,7 min. A partir del área del pico del alcaloide se puede determinar de forma aproximada la cantidad que hay presente del alcaloide en la muestra de miel. Este pico presenta un área de $4,27 \cdot 10^6$ u.a.· ppm.

Espectro de masas de la retrorsina:

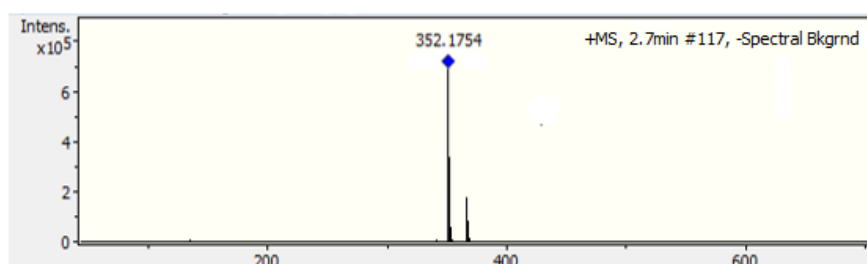


Figura 96. Espectro de masas correspondiente a la retrorsina de la muestra S-10894.

- **Cromatograma m/z 300 (Licopsamina)**

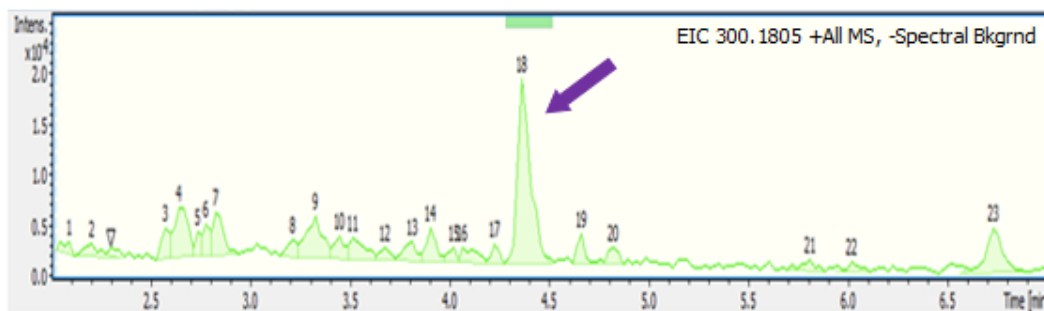


Figura 97. Cromatograma m/z 300 correspondiente a la muestra S-10894.

La licopsamina presenta un pico característico en el cromatograma al tiempo de retención de 4,4 min. Este pico presenta un área de $8,12 \cdot 10^4$ u.a.· ppm.

Espectro de masas de la licopsamina con algunos de sus fragmentos iónicos característicos que lo identifican:

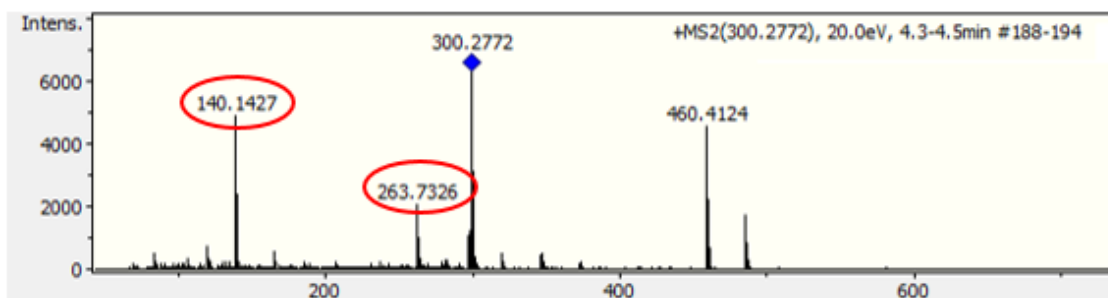


Figura 98. Espectro de masas correspondiente a la Licopsamina de la muestra S-10894.

- **Cromatograma m/z 398 (Equimidina)**

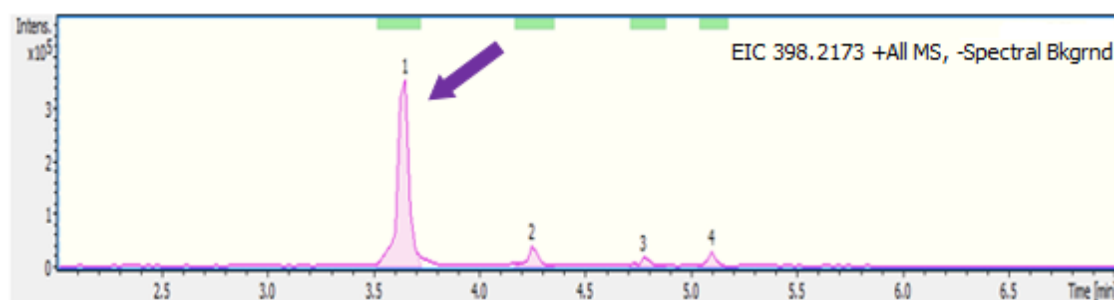


Figura 99. Cromatograma m/z 398 correspondiente a la muestra S-10894.

La equimidina presenta un pico característico en el cromatograma en el tiempo de retención de 3,7min. Este pico presenta un área de $1,33 \cdot 10^6$ u.a.· ppm.

Espectro de masas de la equimidina con algunos de sus fragmentos iónicos característicos que lo identifican:

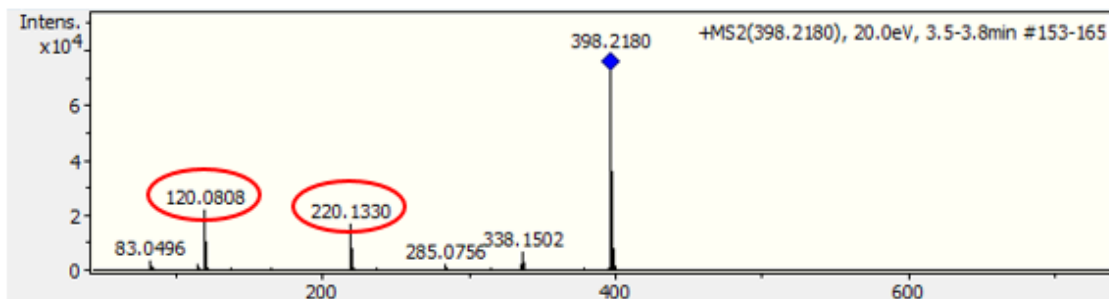


Figura 100. Espectro de masas correspondiente a la Equimidina de la muestra S-10894

Para cuantificar los alcaloides de pirrolizidina presentes en la miel, se tomó en cuenta que la concentración que se adicionó del patrón interno de retrorsina fue de $1 \mu\text{g/mL}$. El área de la retrorsina se consideró equivalente a $1 \mu\text{g/mL}$. Por ello, se estableció una relación proporcional entre el área de la retrorsina respecto al resto de alcaloides. De esta manera, se cuantificaron los alcaloides presentes en la muestra de miel, tal y como se observa en la siguiente tabla 23.

APs	Área ($10^6 \cdot \text{u.a.} \cdot \text{ppm}$)	Concentración ($\mu\text{g/g}$)
Retrorsina	4,27	1,0
Licopsamina	0,0812	0,019
Equimidina	1,33	0,31

Tabla 23. Muestra S-10894. Concentración estimada de cada AP detectado.

Hay que tener en cuenta que la concentración que se muestra en la tabla es la concentración que hay en los 4 gramos de miel que se pesaron inicialmente. Es por ello que la concentración que hay por gramo de muestra es la que se presenta en la siguiente tabla 24:

APs	Concentración ($\mu\text{g/g}$) Por cada gramo de muestra
Licopsamina	0,005
Equimidina	0,08

Tabla 24. Muestra S-10894. Concentración estimada de cada AP detectado por gramo de muestra.

2.3.8.1.2. Muestra S-10807

De la misma manera que en el caso anterior, se exponen los cromatogramas y espectros correspondientes a la muestra de miel S-10807 para comprobar que los diferentes APs eluyen en el mismo tiempo ya que no se han cambiado las condiciones y se obtienen espectros de masas similares.

Se obtuvieron los siguientes resultados:

- **Cromatograma m/z 352 (Retrorsina)**

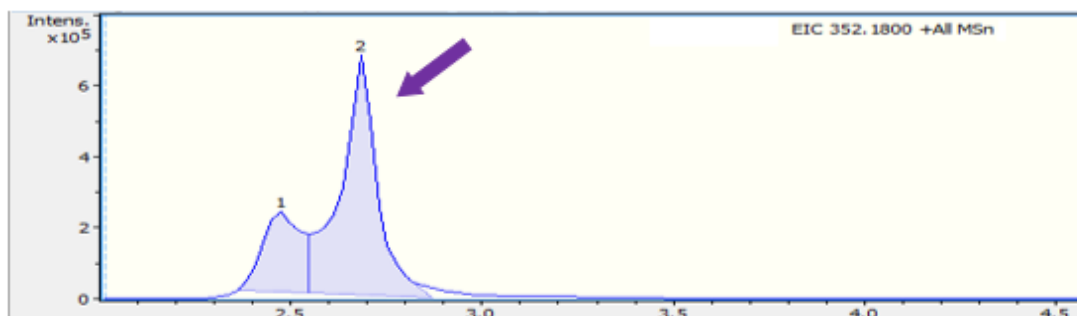


Figura 101. Cromatograma m/z 352 correspondiente a la muestra S-10807.

La retrorsina presenta un pico característico en el cromatograma al tiempo de retención de 2,7 min. Este pico presenta un área de $4,45 \cdot 10^6$ u.a.· ppm.

Espectro de masas de la retrorsina:

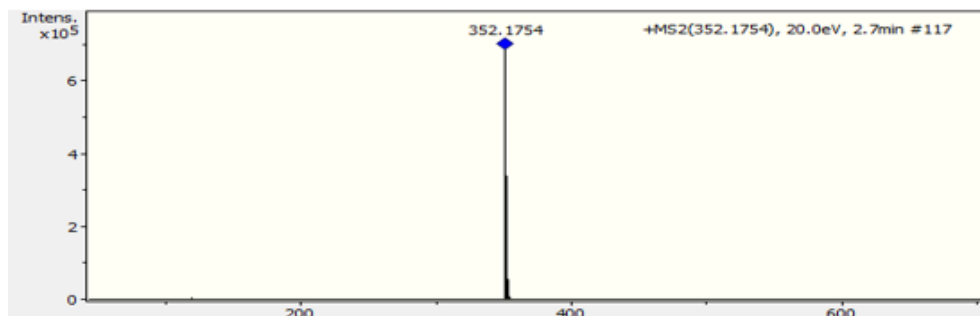


Figura 102. Espectro de masas correspondiente a la retrorsina de la muestra S-10807.

- **Cromatograma m/z 300 (Licopsamina)**

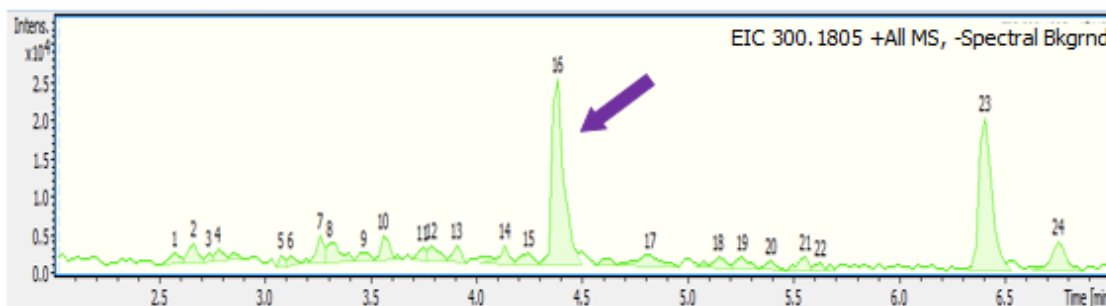


Figura 103. Cromatograma m/z 300 correspondiente a la muestra S-10807.

La licopsamina presenta un pico característico en el cromatograma al tiempo de retención de 4,4 min. Este pico presenta un área de $9,61 \cdot 10^4$ u.a.· ppm.

Espectro de masas de la licopsamina con algunos de sus fragmentos iónicos característicos que lo identifican:

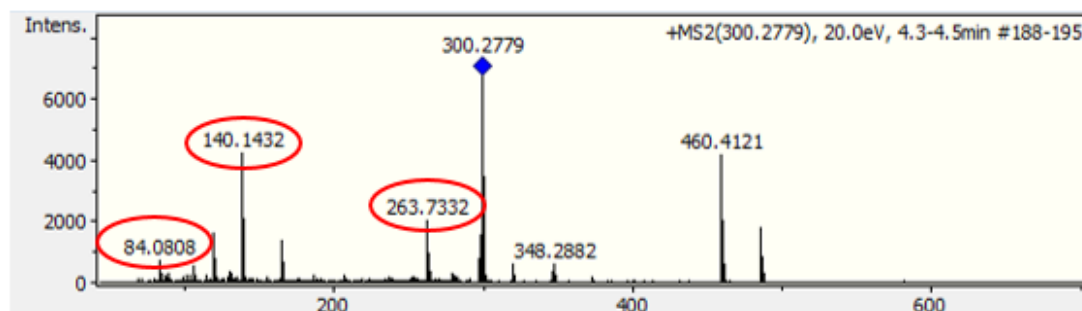


Figura 104. Espectro de masas correspondiente a la Licopsamina de la muestra S-10807.

- **Cromatograma m/z 398 (Equimidina)**

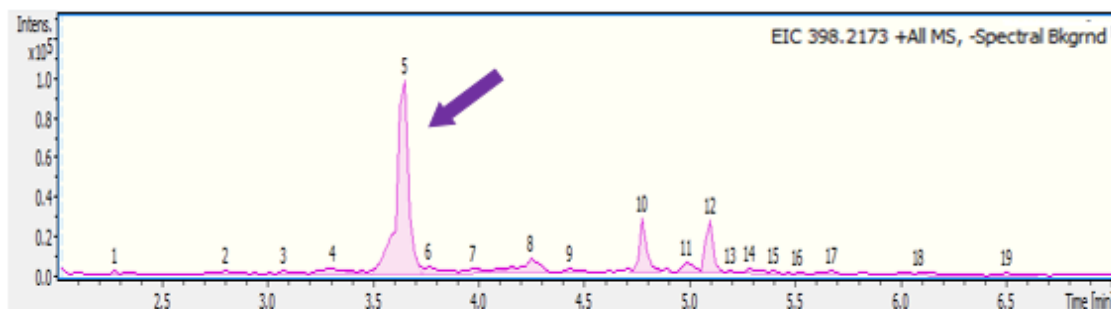


Figura 105. Cromatograma m/z 398 correspondiente a la muestra S-10807.

La equimidina presenta un pico característico en el cromatograma en el tiempo de retención de 3,7 min. Este pico presenta un área de $3,97 \cdot 10^5$ u.a.· ppm.

Espectro de masas de la equimidina con algunos de sus fragmentos iónicos característicos que lo identifican:

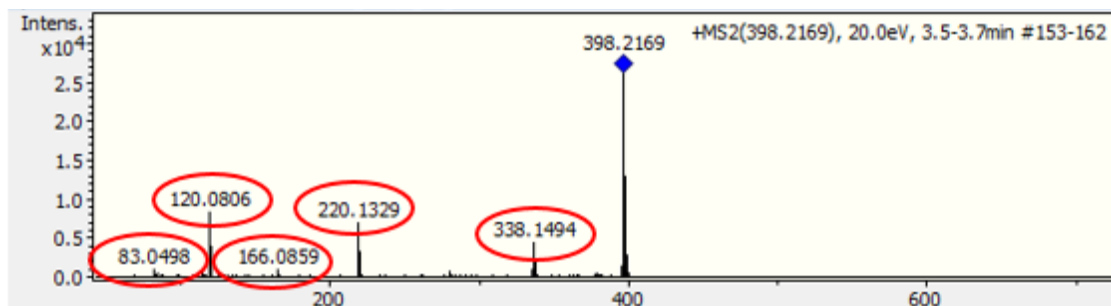


Figura 106. Espectro de masas correspondiente a la Equimidina de la muestra S-10807.

Al igual que en la muestra anterior, se estableció una relación proporcional entre el área de la retrorsina respecto al resto de alcaloides. De esta manera, se cuantificó de forma aproximada los alcaloides presentes en la muestra de miel, tal y como se observa en la siguiente tabla 25:

APs	Área (10^6 u.a.· ppm)	Concentración ($\mu\text{g/g}$)
Retrorsina	4,45	1,0
Licopsamina	0,0961	0,02
Equimidina	0,397	0,09

Tabla 25. Muestra S-10807. Concentración estimada de cada AP detectado.

De la misma forma que en la muestra de miel anterior, la tabla 26 presenta la concentración de alcaloides de pirrolizidina por gramo de muestra pesado:

APs	Concentración (µg/g) Por cada gramo de muestra
Licopsamina	0,005
Equimidina	0,02

Tabla 26. Muestra S-10807. Concentración estimada de cada AP detectado por gramo de muestra.

2.3.8.1.3. Muestra Polen 0

Esta muestra fue comprada en un mercadillo de una ciudad, en el que los productos son vendidos directamente sin pasar por controles de sanidad ni de ningún tipo. Además del análisis de los APs que se buscaban en la miel también se buscaron otros dos más ya que la cantidad que se encontró de equimidina fue alta. Estos dos alcaloides nuevos analizados fueron la senecionina y la riddelliina. Los cromatogramas y espectros de masas correspondientes se exponen a continuación.

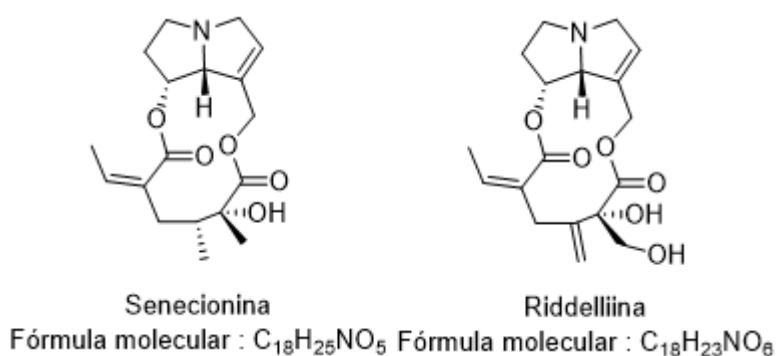


Figura 107. Fórmulas y estructuras moleculares de la senecionina y riddelliina.

Estos fueron los cromatogramas y espectros de masas para estos alcaloides nuevos:

- **Senecionina (m/z 336)**

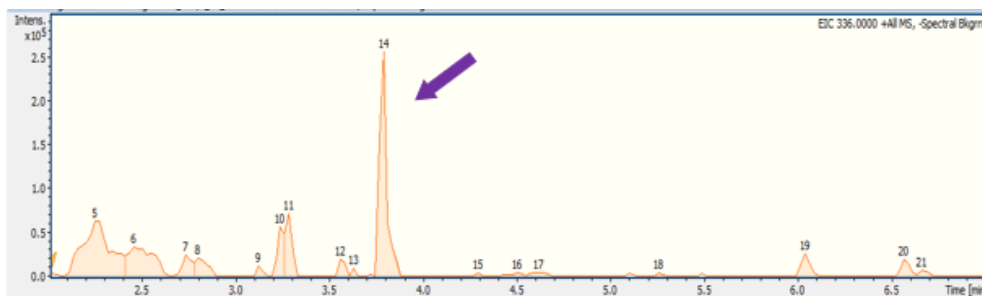


Figura 108. Cromatograma m/z 336 correspondiente a la muestra Polen 0.

La senecionina presenta un pico característico en el cromatograma en el tiempo de retención de 3,8 min. Este pico presenta un área de $7,26 \cdot 10^5$ u.a. · ppm.

Espectro de masas de la senecionina:

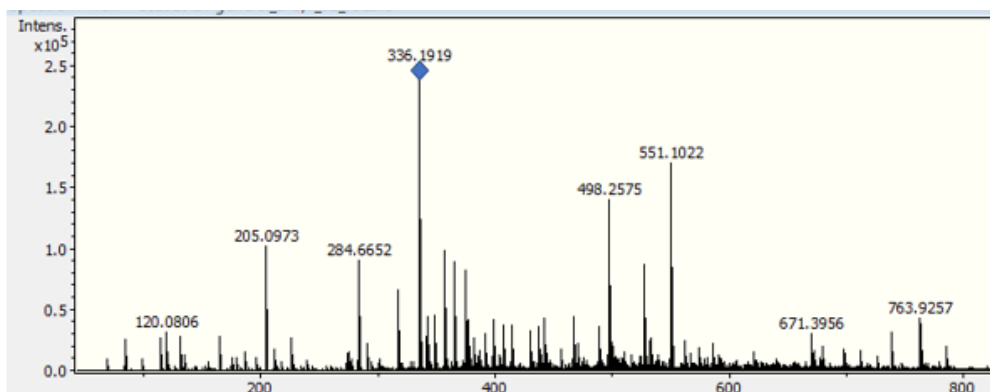


Figura 109. Espectro de masas correspondiente a la senecionina de la muestra Polen 0.

- Riddelliina (m/z 350)

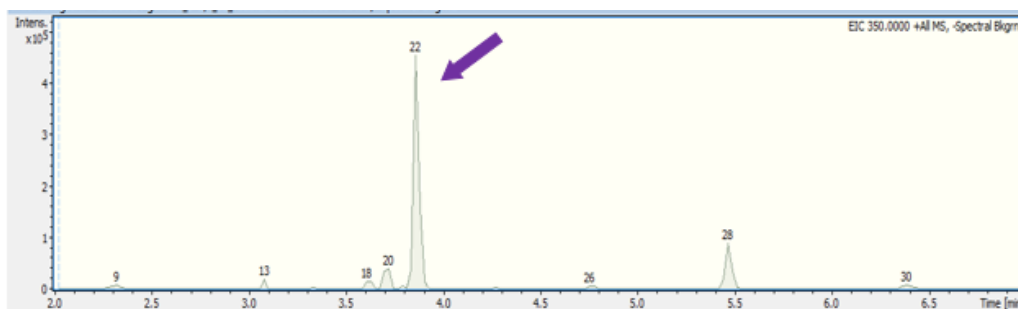


Figura 110. Cromatograma m/z 336 correspondiente a la muestra Polen 0.

La riddelliina presenta un pico característico en el cromatograma en el tiempo de retención de 3,9 min. Este pico presenta un área de $9,34 \cdot 10^5$ u.a.· ppm.

Espectro de masas de la riddelliina:

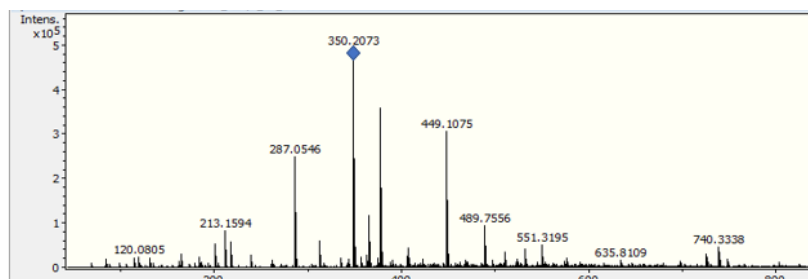


Figura 111. Espectro de masas correspondiente a la riddelliina de la muestra Polen 0.

Al finalizar los análisis de todas las muestras de miel y polen se recogieron todos los resultados y se construyó la tabla 27 donde se muestran.

Muestra	APs	Área de muestra/ área patrón	Concentración (µg/g) por gramo de muestra
S-10894	Retrorsina	1	-
	Licopsamina	0,061	0,015
	Equimidina	0,396	0,099
S-10807	Retrorsina	1	-
	Licopsamina	0,022	0,005
	Equimidina	0,089	0,022
S-10877	Retrorsina	1	-
	Licopsamina	0,094	0,023
	Equimidina	0,330	0,082
S-10927	Retrorsina	1	-
	Licopsamina	0	0,000
	Equimidina	0,975	0,244
S-10890	Retrorsina	1	-
	Licopsamina	0,094	0,024
	Equimidina	0,079	0,020
S-10835	Retrorsina	1	-
	Licopsamina	0,018	0,005
	Equimidina	0,160	0,040
S-10892	Retrorsina	1	-
	Licopsamina	0,006	0,002

S-10878	Equimidina	0,044	0,011
	Retrorsina	1	-
	Licopsamina	0,023	0,006
Polen 0	Equimidina	0,223	0,056
	Retrorsina	1	-
	Licopsamina	0,023	0,006
	Equimidina	1,940	0,485
	Senecionina	0,155	0,039
Polen 1	Riddelliina	0,200	0,050
	Retrorsina	1	-
	Licopsamina	0,005	0,001
	Equimidina	0,020	0,005
	Senecionina	0	0,000
Polen 2	Riddelliina	0	0,000
	Retrorsina	1	-
	Licopsamina	0,011	0,003
	Equimidina	0,160	0,040
	Senecionina	0	0,000
	Riddelliina	0	0,000

Tabla 27. Resultados de concentración de APs para cada muestra de miel y ponen.

Representando estos resultados en una gráfica como la que se muestra en la figura 112, se observa mejor qué muestras son las que más APs contienen.

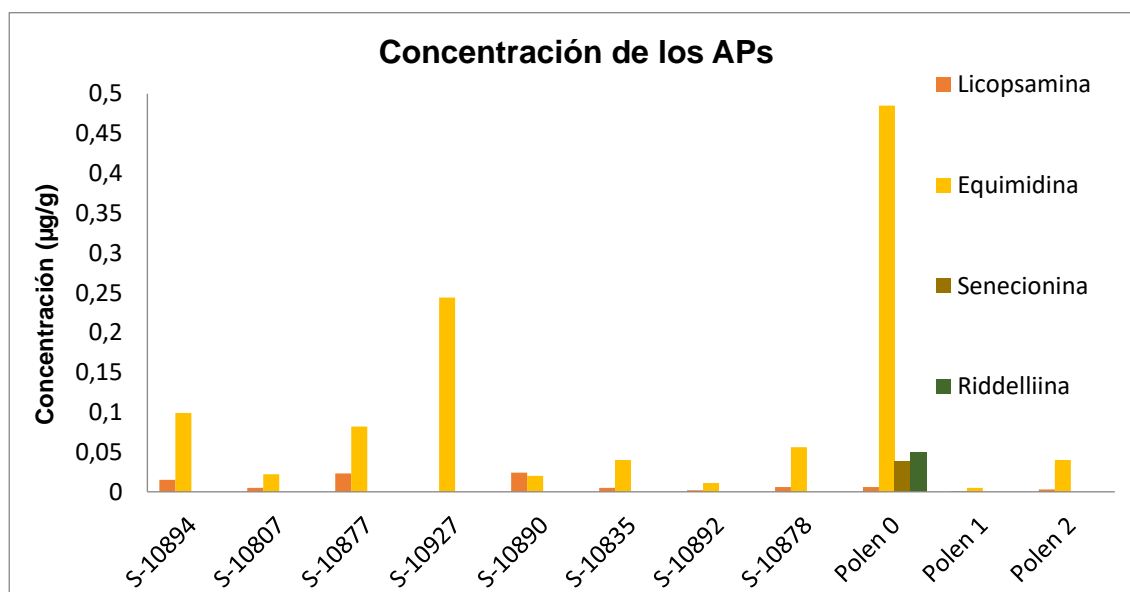


Figura 112. Representación gráfica del resultado de la concentración de APs en las muestras analizadas.

2.3.8.2. Resultados de la espectrofotometría de fluorescencia

En primer lugar, se realizó un calibrado con una miel comercial (libre de APs) a la que se fue añadiendo patrón interno de retrorsina. Se representó el valor de intensidad de emisión con respecto a la concentración de retrorsina obteniendo los siguientes valores de intensidad.

Concentración retrorsina (ppm)	Δ Intensidad (u.a.)
0,2	28,6
0,5	134
0,8	157
1	173
2	206
4	196
5	211

Tabla 28. Valores de concentración y áreas de la retrorsina.

Representando estos valores se consiguió la siguiente gráfica para el calibrado como muestra la figura 113.

Se realizó el ajuste del calibrado igual que se hizo en la aplicación anterior de determinación de la concentración de heroína en muestra de la calle, obteniéndose los siguientes parámetros para el calibrado al usar la ecuación 15 para el ajuste.

$$\Delta I_f = \Delta A(1 - 10^{-BC})$$

Ecuación 15. Ecuación de ajuste para el calibrado de eosina Y y heroína.

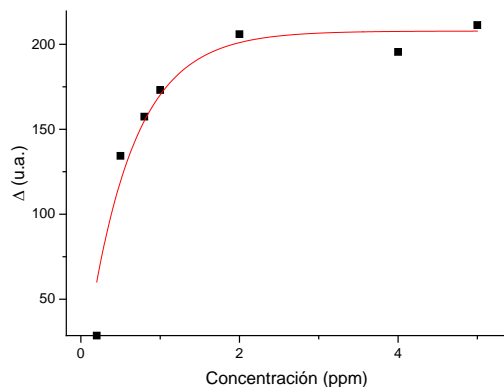


Figura 113. Curva de calibrado.

Usando la ecuación 15 para el ajuste se obtuvieron los valores de la tabla 29.

Variable	Valor	Error
ΔA (u.a.)	210	± 10
B (ppm ⁻¹)	0,74	$\pm 0,12$

Tabla 29. Valores de los parámetros para el ajuste de la curva de calibrado.

Se comprobó que este calibrado era poco sensible y preciso ya que la intensidad aumenta muy poco comparando con otras gráficas obtenidas y por lo tanto se decidió probar con una extracción alternativa. Para quitar el color en la última parte en lugar de usar una extracción con diclorometano, lo que se hizo fue una adsorción de estos compuestos coloreados en carbón activo. Esto se llevó a cabo disolviendo la muestra en agua y añadiendo carbón activo al vial, agitándolo y después filtrando con un filtro de disco, obteniendo una disolución incolora. Esta disolución es la que se usó para realizar un nuevo calibrado y el mismo procedimiento para medir las muestras contaminadas de polen y miel.

Se preparó el calibrado dando los siguientes resultados recogidos en la tabla 30:

Concentración (μM)	Δ Intensidad (u.a.)
0,2	167
0,4	216
0,5	271
0,6	273
0,8	313
1	394
2	552
5	592

Tabla 30. Valores de intensidad correspondientes a cada concentración de patrón de retrorsina.

Igualmente se realizó el ajuste del calibrado como en el caso anterior, obteniéndose la gráfica de la figura 114 siguientes parámetros para el calibrado al usar la ecuación 9 para el ajuste.

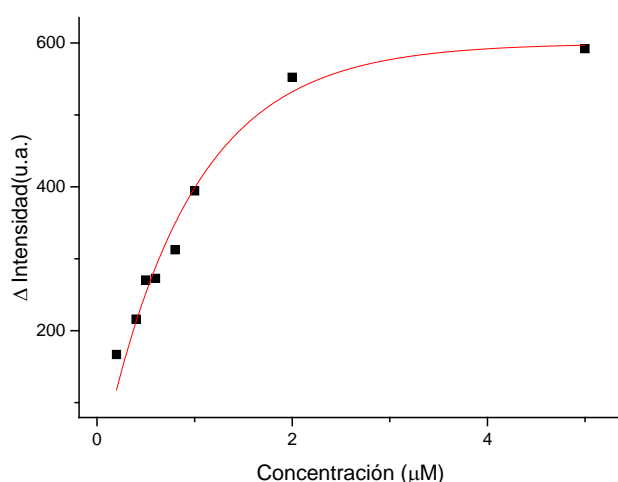


Figura 114. Curva de calibrado.

Ajustando la gráfica con la ecuación 15 se obtienen los valores de la tabla 31.

Variable	Valor	Error
ΔA (u.a.)	600	± 30
B ($10^5 M^{-1}$)	4,7	$\pm 0,5$

Tabla 31. Valores de los parámetros para el ajuste del calibrado.

Una vez realizado el calibrado, se tomó una muestra de miel contaminada y otra de polen para comprobar que el método funcionaba. Comparándolo con los resultados obtenidos del análisis por espectrometría de masas se puede saber si el método es bueno dependiendo de lo que se aproximen los resultados. En este caso, la muestra analizada fue la S-10927 y el polen 0 por ser las muestras más contaminadas. Los experimentos para las muestras se realizaron por triplicado dando los siguientes resultados y errores.

Muestra	Δ Intensidad (u.a.)	Concentración (µM)	Concentración total método fluorescencia (ppm)	Concentración total método masas (ppm)
S-10927	303	0,64	$0,23 \pm 0,04$	$0,24 \pm 0,02$
Polen 0	489	1,54	$0,54 \pm 0,07$	$0,58 \pm 0,02$

Tabla 32. Resultados obtenidos mediante la aplicación del método de medida por fluorescencia y el análisis por espectrometría de masas.

El resultado por ambas técnicas es similar lo que lleva a pensar que el método del uso de colorantes para detectar aminas terciarias es bueno también para este análisis después de llevar a cabo la extracción. Como se vio en el anterior capítulo, las dos pirrolizidinas (monocrotalina y retrorsina) aparecen muy juntas en los análisis por componentes principales. Esto quiere decir que es muy posible que no haya manera de separar cada concentración de pirrolizidinas pero sin embargo obtenemos el resultado como una única señal para todas ellas.

2.3.9. Conclusiones

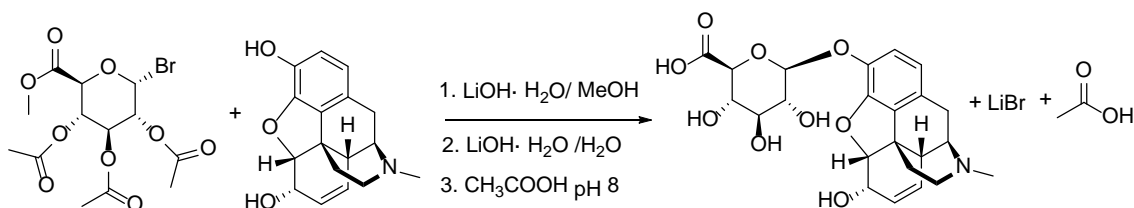
- Con el estudio de los espectros de masas se puede afirmar que el método de análisis sirve para detectar y cuantificar los diferentes alcaloides de pirrolizidina en muestras de miel. Los alcaloides detectados han sido, licopsamina, equimidina, senecionina y ridellina todos ellos tóxicos.
- La cuantificación de estos alcaloides demuestra que la equimidina es mayoritaria frente al resto de alcaloides presentes en estas muestras de miel y polen.
- Según los resultados obtenidos, se puede afirmar que la muestra S-10927 y el polen 0 presentan una concentración mucho más alta de APs que las demás muestras. Aun así, ninguna supera el límite propuesto por el CONTAM de 70 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal/día, puesto que sería necesario consumir, para una persona de 70 kg, casi 10 kg del polen 0 en un día para llegar a ese valor.
- Mediante espectrofotometría de fluorescencia se pudo determinar la concentración de las muestras S-10927 de miel y Polen 0 siendo los resultados comparables a los de la técnica de espectrometría de masas teniendo en cuenta que considera todos los APs juntos.
- Es necesario seguir investigando ya que estos alcaloides de pirrolizidina son una causa de preocupación para la toxicidad crónica en los seres humanos.

2.4. Detección de opiáceos en orina y saliva

Habiendo detectado heroína de la calle a partir de muestras proporcionadas por la policía, se quiso comprobar si este método se podía aplicar también para conocer si una persona había consumido estas sustancias. Una forma de saber si alguien ha consumido sustancias prohibidas como los opiáceos es a través de la orina. El cuerpo humano metaboliza estas sustancias y las transforma en conjugados que suele excretar por la orina. Estos conjugados de

morfina metabolizados en el hígado son dos: glucurónido 6-morfina (10%) aproximadamente y el mayoritario glucurónido 3-morfina.⁹⁴

Se quiso comprobar la capacidad del método para detectar cuantitativamente este conjugado de morfina en agua. Para ello se comenzó por sintetizar el conjugado mayoritario (M3G). Se llevó a cabo la síntesis del conjugado, morfina 3-glucurónido siguiendo la publicación Berrang et al.⁹⁵ Como se muestra en el siguiente esquema:



Esquema 5. Síntesis del conjugado de morfina.

Los detalles de la síntesis y la caracterización se encuentran en el apartado de la parte experimental de esta tesis.

2.4.1. Orina artificial

Se prepararon tres disoluciones distintas de orina artificial variando la concentración de creatinina en función de los límites entre los que se suele encontrar en la orina humana.⁹⁶

Las disoluciones contienen:

- 10 g/l de urea.
- 3 g/l de NaCl.
- 1 g/l de KCl.
- Una disolución con 0,1 g/l de creatinina, otra con 0,7 g/l y una última con 1,5 g/l.

Con estas disoluciones preparadas se siguió el procedimiento de análisis de las aminas terciarias explicado en el capítulo anterior para ver la señal producida cuando no están presentes estas aminas y comprobar el método para una prueba en blanco. En una cubeta se añadieron 2,5 ml de cada una de las tres disoluciones además del colorante (1 μM) y NaOH 1

⁹⁴ a) Bosch, M. E.; Sánchez, A. R.; Rojas, F. S.; Ojeda, C. B. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2007**, *43* (3), 799–815.

b) Sartori, D.; Lewis, T.; Breaud, A.; Clarke, W. *Clin. Biochem.* **2015**, *48* (18), 1283–1290.

⁹⁵ Berrang, B.; Twine, C. E.; Hennessee, G. L.; Carroll, F. I. *Synth. Commun.* **1975**, *5* (3), 231–236.

⁹⁶ Rose, C.; Parker, A.; Jefferson, B.; Cartmell, E. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* **2015**, *45* (17), 1827–1879.

mM. Se midió en el fluorímetro a una longitud de onda de excitación de 495 nm y se recogió el espectro de fluorescencia correspondiente. A continuación, se puso la cubeta a iluminar con la lámpara halógena durante 10 minutos y se volvió a medir.

También se preparó otra disolución en la cubeta igual que estas (0,7 g/l de creatinina) y se añadió además el glucurónido 3-morfina obteniendo la gráfica de la figura 115.

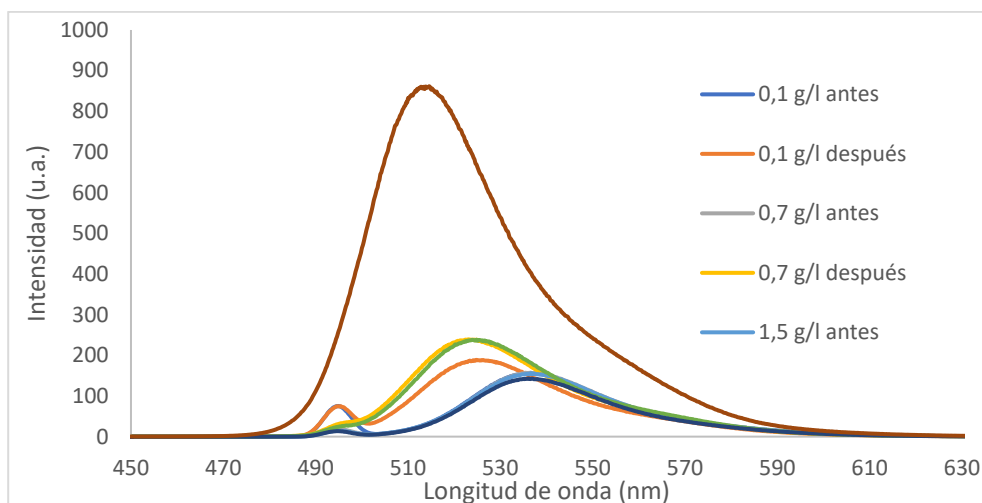


Figura 115. Representación de todos los espectros antes y después de iluminar y se puede comprobar que, aunque las disoluciones sin el glucurónido dan señal es mínima comparada con la que da con este. G significa glucurónido 3-morfina

El siguiente paso fue realizar un calibrado utilizando esta orina artificial:

Se prepararon varias disoluciones para llevar a cabo un calibrado y así poder medir las muestras posteriormente. Los valores de fluorescencia fueron tomados a 520 nm, siendo 495 nm la longitud de onda de excitación. Las medidas corresponden al producto final de mezclar la sonda, 10^{-6} M, con el conjugado, la orina artificial y 0,7 g/l de creatinina y después de 10 minutos de irradiación.

Concentración (μM)	ΔI_f (u.a.)
0,2	126
0,4	160
0,6	177
0,7	209
0,8	236

1	267
2	461
3	578
4	642
5	655

Tabla 33. Valores de intensidad para cada concentración del conjugado de morfina.

Representando los valores de intensidad de fluorescencia frente a la concentración se obtuvo la siguiente gráfica de la figura 116.

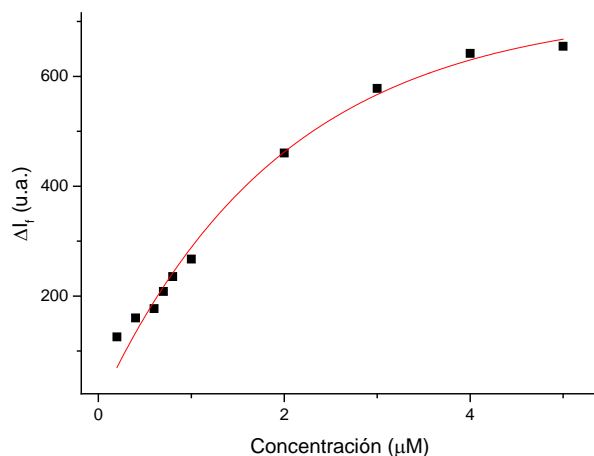


Figura 116. Gráfica que muestra el valor de intensidad para concentración con el que se consigue el calibrado.

Ajustando con la misma ecuación que con la heroína anteriormente se obtuvo el ajuste para el calibrado.:

Parámetro	Valor	Error
ΔA (u.a.)	730	30
B ($10^5 M^{-1}$)	2,2	0,2

Tabla 34. Parámetros del ajuste del calibrado.

Se comprobó también a realizar el calibrado a otra longitud de onda 518 nm obteniendo los siguientes resultados:

Concentración (μM)	ΔI_f (u.a.)
0,2	124
0,4	161
0,6	176
0,7	208
0,8	235
1	268
2	475
3	599
4	674
5	697

Tabla 35. Valores de intensidad para cada concentración del conjugado de morfina.

La gráfica del ajuste con los valores obtenidos fue la siguiente:

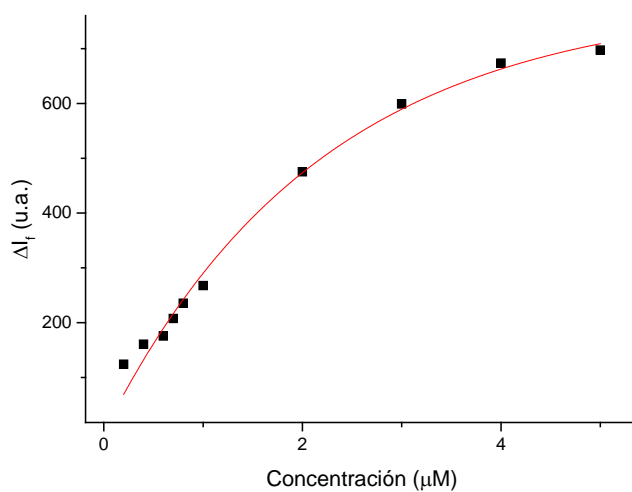


Figura 117. Gráfica que muestra el valor de intensidad para concentración con el que se consigue el calibrado.

Ajustando con la misma ecuación que con la heroína anteriormente se obtuvo el ajuste para el calibrado:

	Valor	Error
ΔA (u.a.)	790	± 40
B ($10^5 M^{-1}$)	2,00	$\pm 0,19$

Tabla 36. Parámetros del ajuste del calibrado.

2.4.2. Orina real

Una vez visto que el método funcionaba bien con la orina sintética se procedió a usar muestras reales. Estas muestras son más complejas que las anteriores y se necesitó un paso previo adicional de extracción para eliminar las sustancias que dificultan e impiden la buena aplicación del método. Se probó con el mismo método de extracción que se usó con las muestras de miel para comprobar si se obtenían buenos resultados. Estas muestras reales (figura 118) fueron guardadas en el congelador para conservarlas y solo eran sacadas cuando había que usarlas dejando que se descongelaran en el frigorífico para no alterar las muestras.



Figura 118. Ejemplo de muestra de orina recibidas para analizar.

El procedimiento para el calibrado fue similar al utilizado con las mieles y pólenes mediante el proceso de extracción que se detalla en la parte experimental de la tesis.

En la siguiente gráfica de la figura 119 se muestra como aumenta la intensidad de una muestra de orina real después de iluminar con la lámpara halógena de 50 W.

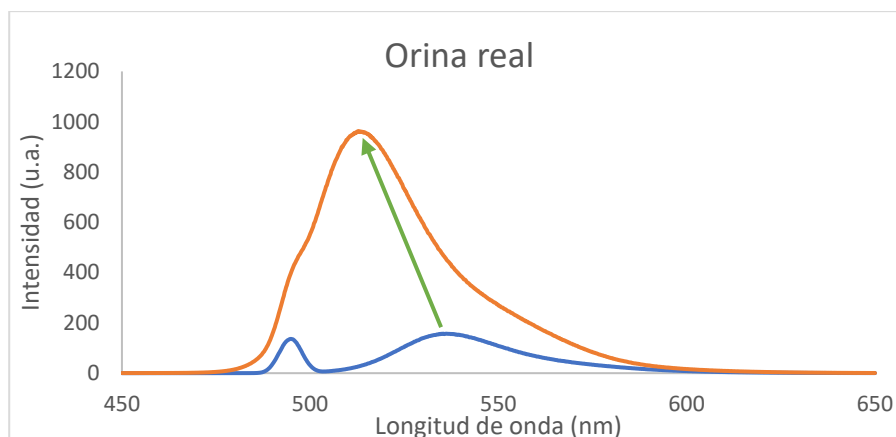


Figura 119. Emisión de la mezcla de reactivos y el conjugado de morfina antes y después de 10 minutos iluminando.

Comprobado que funciona para una muestra real, se realizó un calibrado con las muestras reales:

Concentración (μM)	ΔI_f (u.a.)
5,3	826
3,3	832
1,3	860
0,7	761
0,7	667
0,7	630
0,6	789
0,5	668
0,5	572
0,5	541
0,4	722
0,4	216
0,3	391
0,3	304
0,3	496
0,2	275
0,1	150

Tabla 37. Valores de intensidad para cada concentración en el calibrado.

Con estos datos se realiza el calibrado correspondiente para la orina real como muestra la figura 120:

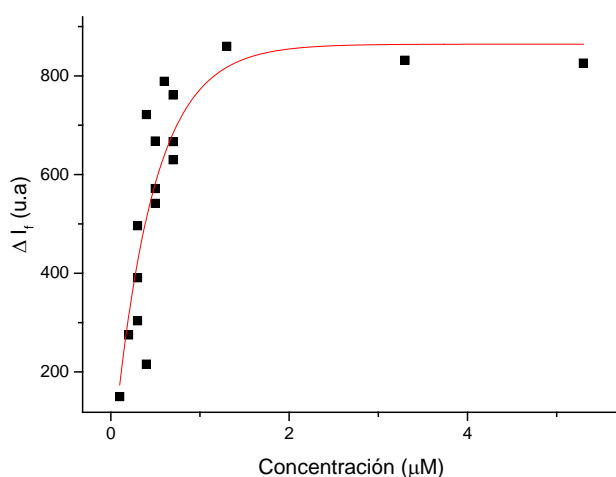


Figura 120. Calibrado en fluorescencia utilizando muestras reales de orina con concentraciones crecientes de conjugado de morfina.

Usando la ecuación de ajuste correspondiente:

$$\Delta I_f = \Delta A(1 - 10^{-BC})$$

Ecuación 15. Ecuación de ajuste para el calibrado de eosina Y y heroína en el dispositivo.

Variable	Valor	Error
ΔA (u.a.)	860	± 70
B ($10^6 M^{-1}$)	1,00	$\pm 0,18$

Tabla 38. Parámetros del ajuste del calibrado.

Se analizaron varias muestras de orina real arrojando los siguientes resultados y errores correspondientes:

Muestras	ΔI_f (u.a.)	Concentración (μM)
748	664	$0,65 \pm 0,03$
831	763	$0,96 \pm 0,06$
871	645	$0,61 \pm 0,03$
950	696	$0,73 \pm 0,03$

Tabla 39. Valores de concentración del conjugado de morfina para cada muestra real de orina. Los números de cada muestra simplemente es una numeración que venía ya puesta en cada bote y se dejó tal cual.

Puesto que las muestras solo tienen como información asociada la existencia de opiáceos en orina, detectada mediante medición positiva en ELISA por el servicio de toxicología regional, no se tiene una medida cuantitativa con la que comparar las medidas realizadas. El límite que tiene sanidad para afirmar que una muestra ha dado positivo es de 0,3 ppm, lo que equivale si se toma de referencia M3G a una concentración de 0,65 μM . Por lo tanto, casi todas las muestras analizadas se encuentran en este límite excepto la muestra 831 que lo supera por más distancia.

Se puede concluir que el método funciona de una forma cuantitativa para mediciones del conjugado de morfina en orina en muestras reales dentro de los límites fisiológicos esperables.

2.4.3. Saliva

Un método de alto interés sería poder aplicar esta detección en saliva. Esto es complejo a la hora de medir en muestras reales, por ello y para comprobar su validez previa se midió en muestras de saliva a las que se añadía la droga.

A esta saliva (2,5 ml) pura a la que se le añadió la droga (M3G 5 μM), se filtró con un filtro de disco (Millex GP 0,22 μm) y se aplicó el método de detección, observando que este permite la detección como muestra la figura 121.

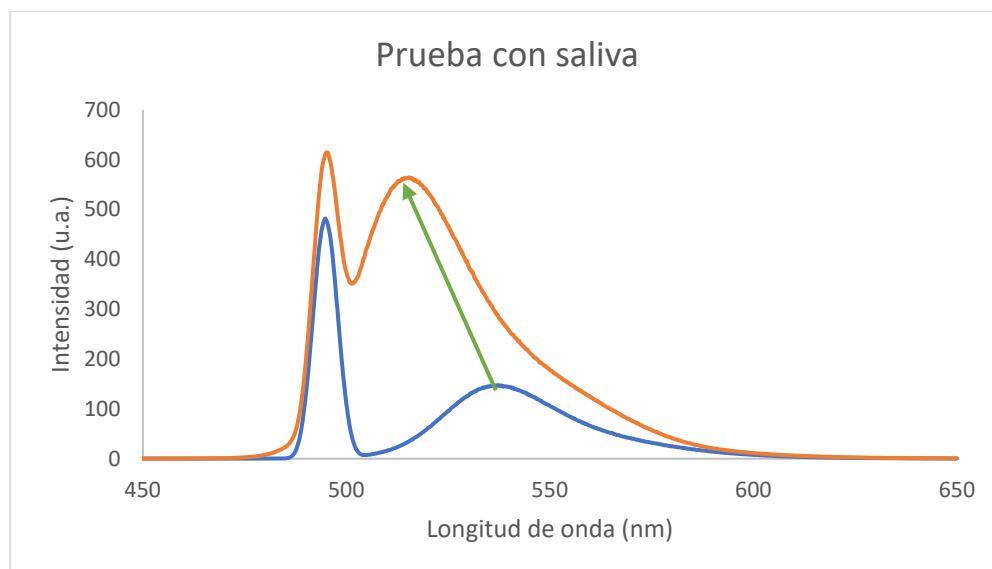


Figura 121. Prueba del método de detección en saliva.

Con esta prueba preliminar se comprobó la potencial aplicabilidad de este método para este tipo de muestras. En un futuro se estudiará a fondo con muestras reales de saliva, realizando el pertinente calibrado para poder implementarlo en los controles que lleva a cabo la policía en carretera para detectar estas sustancias peligrosas.

2.4.4. Conclusiones

Se ha diseñado un método para detectar y cuantificar opiáceos o derivados de estos en orina real. Es necesario aplicar una extracción previa a las muestras, pero después el método de detección es sensible a estas sustancias y se comporta satisfactoriamente.

También se ha visto que funciona en saliva, y es prometedor como futuro estudio para la creación de un método de cuantificación de estas sustancias en controles de la policía, por ejemplo.

2.5. Inclusión de los colorantes en polímeros

Unir estos cromóforos a polímeros podría ser muy útil para diseñar formas de realizar pruebas cualitativas rápidas; para ello se intentó preparar un polímero que contuviera estos colorantes para detectar la existencia de aminas terciarias en disolución acuosa.

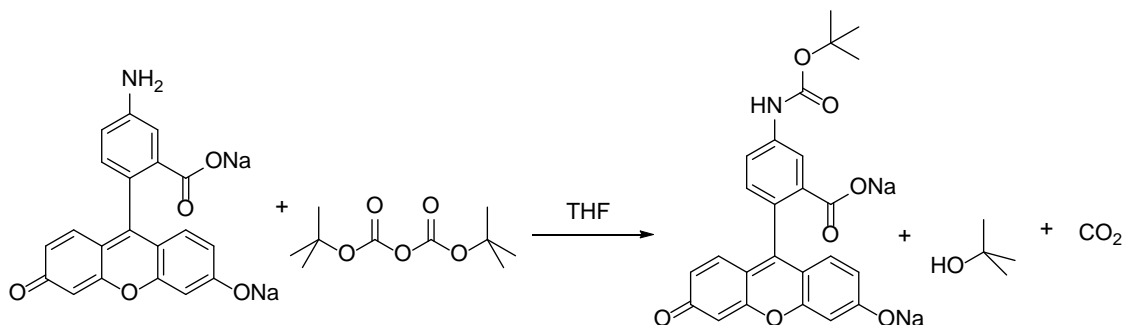
Para este fin se partió de 5-Aminofluoresceína disponible comercialmente, con el objetivo de unirlo por el grupo amina.

2.5.1. Polímero con 2 % de entrecruzante

Se trata de un polímero sintetizado por el grupo de polímeros de la Universidad de Burgos. Tiene la característica de ser estable en agua y permitir que esta penetre en su interior hinchándolo y poniéndolo en contacto con la disolución. El entrecruzante utilizado EGDMA (dimetilacrilato de etilenglicol) sirve para proporcionar más consistencia, y la capacidad de hinchar el polímero depende de la concentración, de manera que la capacidad desaparece a elevadas concentraciones. El polímero está en forma de lámina y es incoloro y flexible.

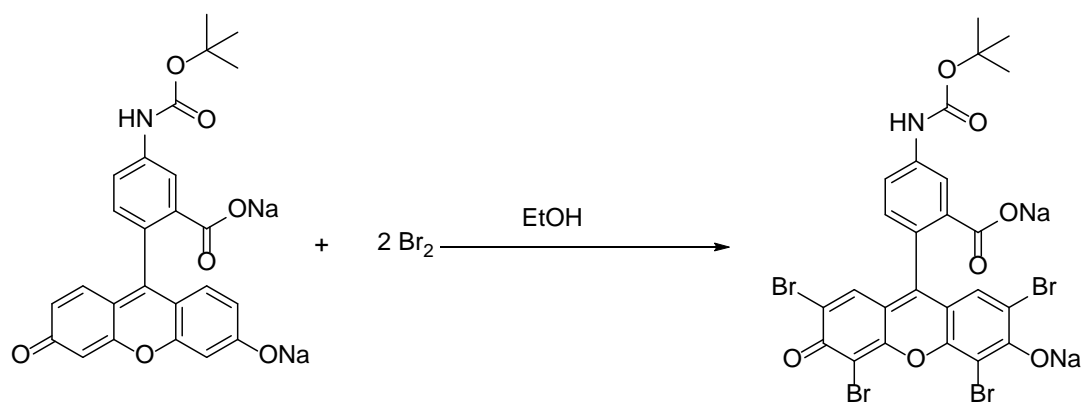
Puesto que para reproducir el método de detección hay que transformar el fragmento fluoresceína en su derivado bromado, lo primero que hay que hacer es proteger el grupo amina

para evitar problemas en la siguiente etapa de síntesis. Por esto se escoge el grupo Boc (tert-butiloxicarbonilo) como grupo protector de la amina. La protección se puede observar en el esquema 6.



Esquema 6. Síntesis de 5-aminofluoresceína protegida con un grupo boc.

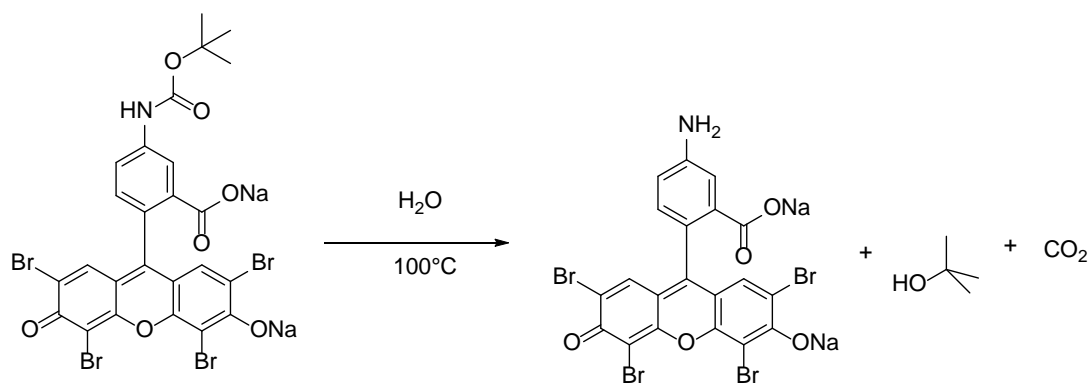
El siguiente paso es la bromación del producto (esquema 4) para lo cual se va a añadir bromo que actuará como agente bromante en una reacción de halogenación electrofílica aromática. El esquema 7 muestra la síntesis de esta etapa.



Esquema 7. Síntesis de la 5-aminoeosina con el grupo protector boc.

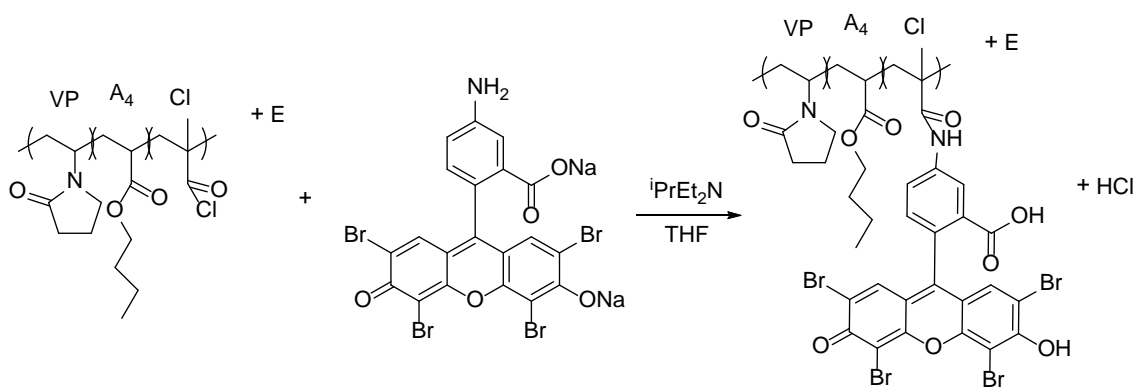
Se lleva a cabo a continuación la desprotección de la amina (esquema 8) siguiendo el procedimiento encontrado en bibliografía.⁹⁷ La síntesis de la 5-aminoeosina se muestra en el esquema 8.

⁹⁷ Zinelaabidine, C.; Souad, O.; Zoubir, J.; Malika, B.; Nour-Eddine, A. *Int. J. Chem.* **2012**, 4 (3), 73–79.



Esquema 8. Desprotección de la 5-aminoesina.

Una vez que tenemos la 5-aminoesina procedemos a unirla a los polímeros mediante el procedimiento que se ilustra en el esquema 9.



Esquema 9. Unión de la 5-aminoesina al polímero.

El resultado del polímero ya sintetizado, se puede observar en la figura 122.

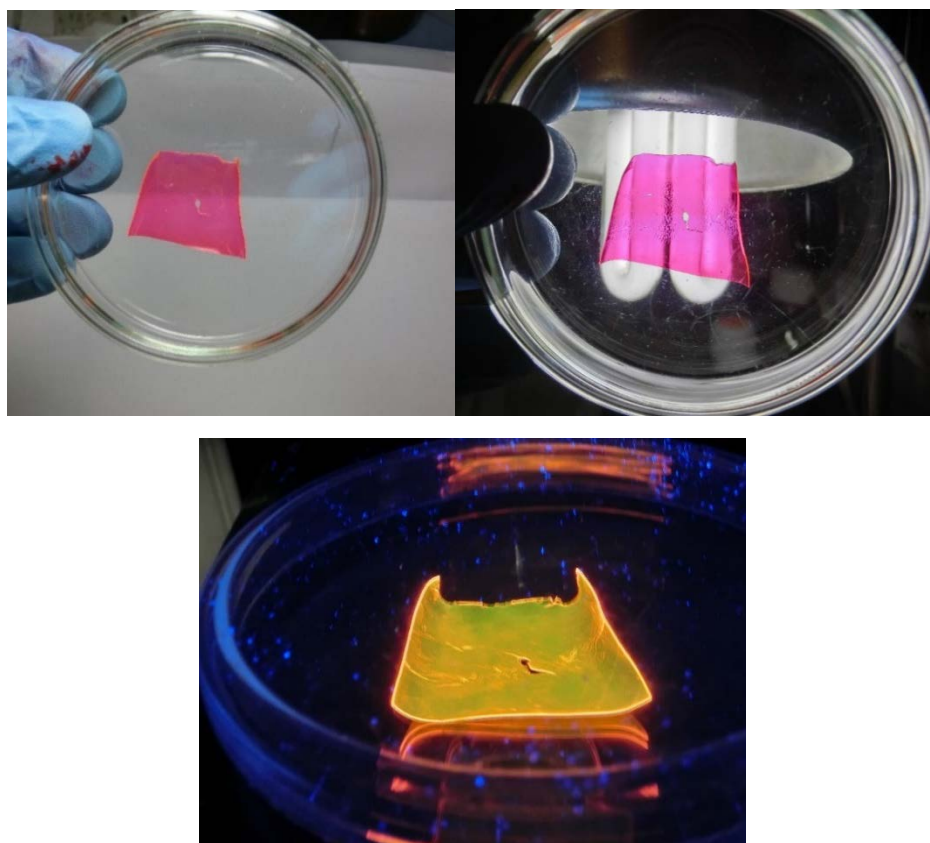
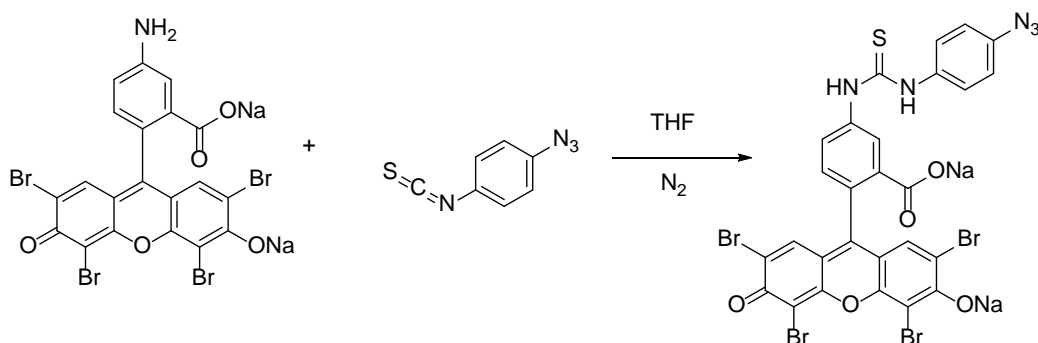


Figura 122. Fotografías del polímero sintetizado el cual es fluorescente como se puede observar en la imagen inferior bajo la lámpara ultravioleta.

2.5.2. Polímero con 5 % de entrecruzante

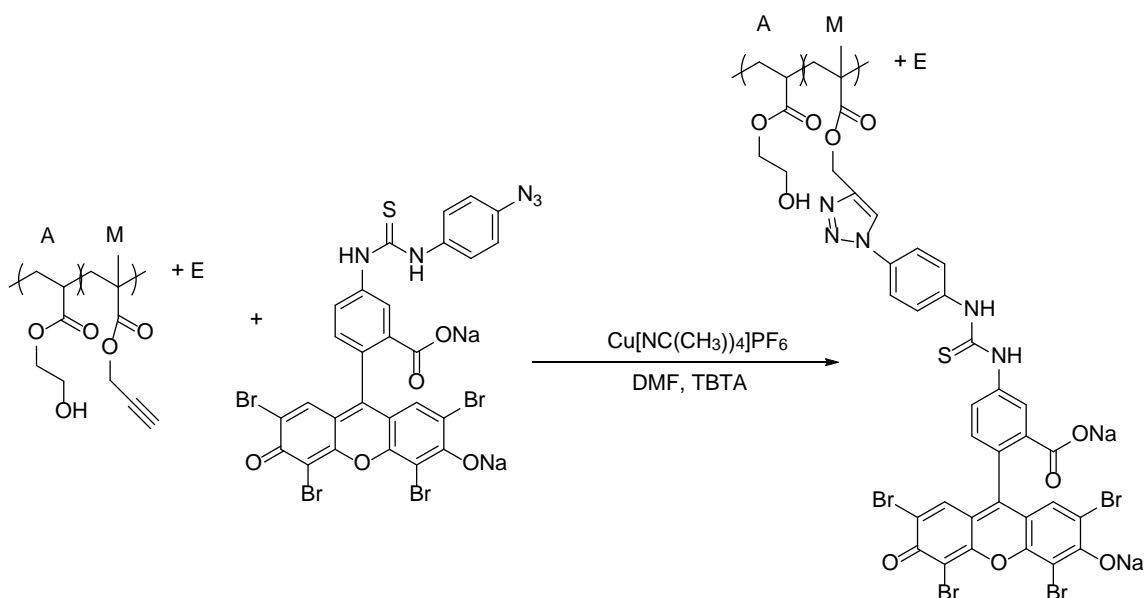
Este es otro polímero sintetizado por el grupo de polímeros de la Universidad de Burgos. Tiene la misma característica de ser estable en agua y permitir que esta penetre en su interior hinchándolo y poniéndolo en contacto con la disolución. El entrecruzante es el mismo que en el caso anterior con la diferencia que se ha añadido más proporción de este. El polímero está en forma de lámina y es incoloro y flexible.

Se probó esta segunda síntesis distinta con otro polímero diferente para comparar los resultados. Para ello se hizo reaccionar la 5-aminoeosina sintetizada anteriormente con el grupo tiocianato de 1-azida-4-isotiocianatobenceno para conseguir la formación de la tiourea y obtener la molécula con un grupo azida que servirá para la próxima síntesis. El proceso se puede ver en el esquema 10.



Esquema 10. Síntesis del producto de eosina con el grupo azida.

El siguiente paso fue la unión de este producto con el polímero del 5% de entrecruzante. Para esta tarea simplemente se pusieron los dos reactivos en DMF el colorante reaccionó a través la azida con el triple enlace del polímero mediante la conocida reacción de cicloadición [3+2] de azidas a alquinos catalizada por cobre(I). La síntesis se puede observar en el esquema 11.



Esquema 11. Síntesis del polímero con el 5% de entrecruzante con eosina.

El resultado del polímero ya sintetizado se puede apreciar en la figura 123.

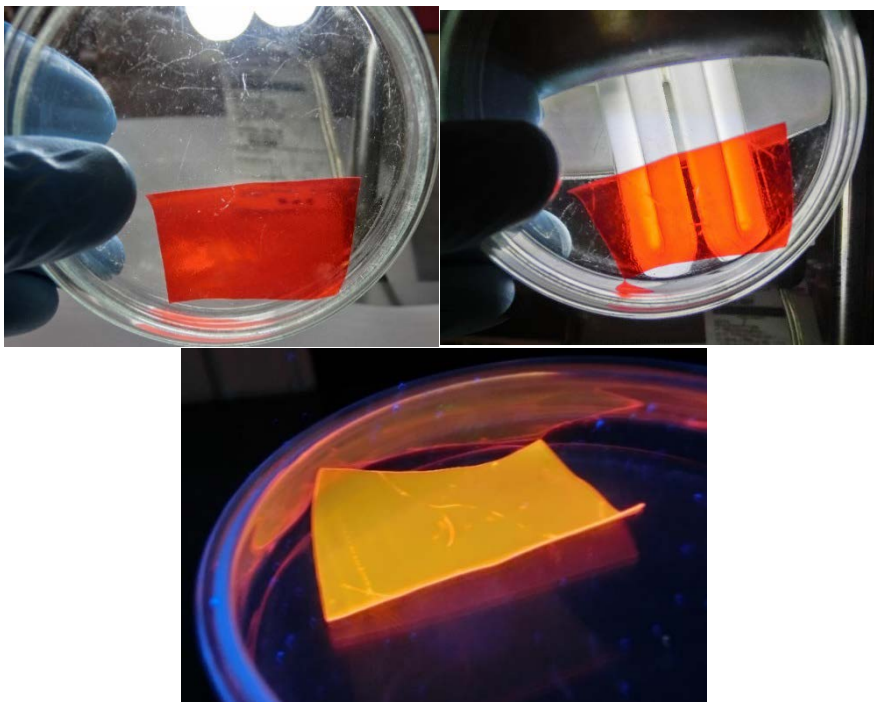


Figura 123. Fotografías del polímero sintetizado el cuál es fluorescente como se puede observar en la imagen inferior bajo la lámpara ultravioleta.

Como resultado de estas dos síntesis se obtuvieron dos polímeros con un derivado de la eosina Y los cuales son fluorescentes. Con ellos se quiso probar la reacción para la detección de aminas terciarias planteada en el capítulo 1.

Estos polímeros fueron introducidos en una cubeta a la que se añadió TEOA y medio básico (figura 124). Se eliminó el oxígeno usando un burbujeo de nitrógeno en la cubeta y se probó a iluminar. El resultado fue negativo ya que no hubo reacción y no se obtuvieron los resultados esperados. Intentando explicar este suceso, se puede pensar que es posible que el material o la estructura del polímero inhiban la reacción o que la estructura del polímero no permita la reacción por algún motivo.

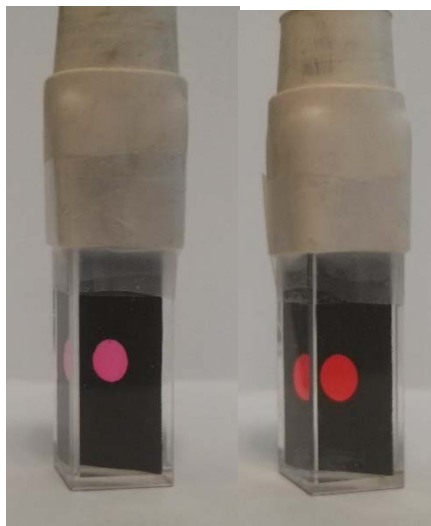


Figura 124. A la izquierda cubeta conteniendo entre dos imanes un trozo del polímero con un 2% de entrecruzante y a la derecha el polímero con el 5% de entrecruzante.

2.5.3. Conclusiones

Se han sintetizado dos nuevos polímeros fluorescentes. Se quería ver si el método de detección de aminas terciarias anteriormente descrito funcionaba con ellos, pero no ha sido así. Exhibiendo tanta fluorescencia podrían ser de utilidad en otro ámbito por lo que se seguirá investigando con ellos para ver qué uso se les puede aplicar.

2.6. Nanopartículas a partir de disoluciones de fluoresceína y eosina:

2.6.1. Nanopartículas de oro:

Como se comentó en el anterior capítulo en la parte del estudio de interferentes el resultado obtenido con el oro fue singular y se investigó un poco más. Se descubrió que el color que tomaba la disolución era por la aparición de nanopartículas de oro. Estas disoluciones suelen tomar colores entre rojos y morados dependiendo del tamaño de las nanopartículas.⁹⁸ Teniendo en cuenta este comportamiento se prepararon una serie de experimentos para confirmar esta aparición de nanopartículas variando los parámetros del colorante, concentración, pH y la iluminación con una lámpara halógena de 50 W.

Las pruebas fueron realizadas con fluoresceína y eosina Y obteniéndose los siguientes resultados.

⁹⁸ Jain, P. K.; Lee, K. S.; El-Sayed, I. H.; El-Sayed, M. A. *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110* (14), 7238–7248.

A) Fluoresceína 0,1 mM + HAuCl_4 0,1 mM + luz, después de unos 5 minutos se añadió NaOH 1mM. En la figura 51 se puede observar el resultado del experimento en estas condiciones usando un microscopio de transmisión electrónica.

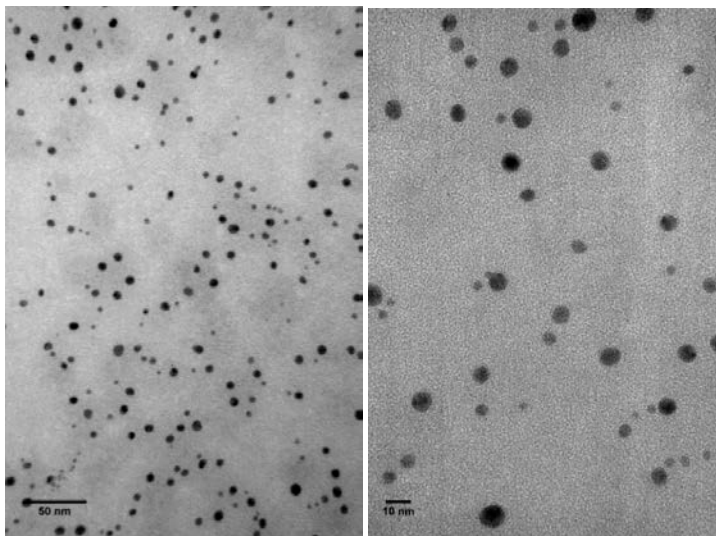


Figura 125. Nanopartículas de oro tras la adición de reactivos y la iluminación.

Aparecen las nanopartículas de oro con una forma esférica y de unos 3 a 10 nm.

B) Fluoresceína 0,1 mM + HAuCl_4 0,4 mM + luz, después de unos 5 minutos se añade NaOH 2 mM. En la figura 53 se puede observar el resultado de del experimento en estas condiciones usando un microscopio de transmisión electrónica.



Figura 126. Nanopartículas de oro.

Las nanopartículas de oro han experimentado en este caso algún mecanismo de crecimiento (tipo maduración de Ostwald⁹⁹ o adición orientada, por ejemplo), proporcionando otra morfología (tienen una apariencia alargada con puntos de fusión entre unas y otras).

I) Fluoresceína 0,1 mM + HAuCl₄ 0,2mM + luz. Sin adición posterior de NaOH. En la figura 54 se puede observar el resultado del experimento en estas condiciones usando un microscopio de transmisión electrónica.

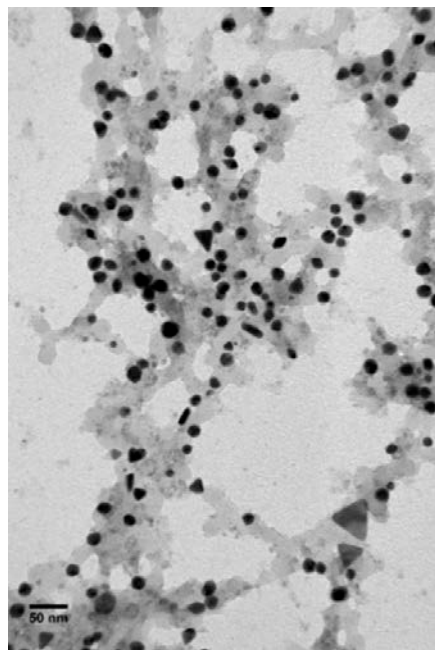


Figura 127. Nanopartículas de oro.

En este experimento las nanopartículas de oro tomaron dos formas distintas, por un lado esféricas con un tamaño de 20 nm y por otro lado triangulares con un tamaño superior. Las partes más claras corresponden a materia orgánica.

D) EosinaY 0,1mM + HAuCl₄ 0,1 mM + luz, después de unos minutos se añade 1 mM. En la figura 55 se puede observar el resultado de del experimento en estas condiciones usando un microscopio de transmisión electrónica.

⁹⁹ Thanh, N. T. K.; Maclean, N.; Mahiddine, S. *Chem. Rev.* **2014**, *114* (15), 7610–7630.

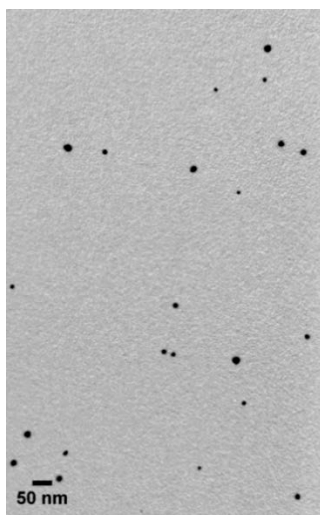


Figura 128. Nanopartículas de oro.

Se puede observar como en este caso las nanopartículas formadas quedan mucho más separadas y con tamaños de 10 a 15 nm.

E) EosinaY 0,1 mM + HAuCl₄ 0,4 mM + luz, después de unos minutos se añade NaOH 2 mM. En la figura 56 se puede observar el resultado de del experimento en estas condiciones usando un microscopio de transmisión electrónica.

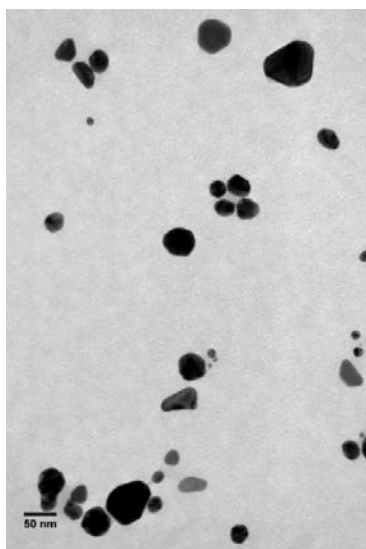


Figura 129. Nanopartículas de oro.

En este caso las nanopartículas tienen formas variadas y diferentes tamaños.

J) EosinaY 0,1 mM + HAuCl₄ 0,2 mM + luz. Espectro hecho el mismo día. En la figura 57 se puede observar el resultado de del experimento en estas condiciones usando un microscopio de transmisión electrónica.

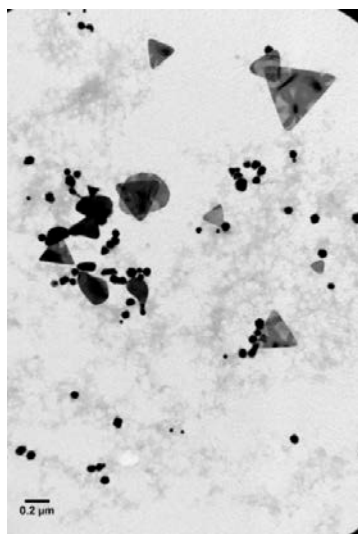


Figura 130. Nanopartículas de oro.

En este experimento también se forman nanopartículas de diversos tamaños y formas, pero llaman la atención sobre todo aquellas con forma de triángulo.

A continuación, se muestra en la figura 131 una fotografía de unos viales conteniendo los experimentos con las nanopartículas formadas.



Figura 131. Las distintas disoluciones de nanopartículas preparadas.

2.6.2. Nanopartículas de plata

Al igual que en el estudio de interferentes del capítulo anterior se comprobó la existencia de nanopartículas de oro también aparecieron las de plata. Por esta razón también se quiso realizar algún experimento y ver en qué condiciones se formaban estas.

G) Fluoresceína 0,1 mM + AgNO₃ 0,2 mM + luz. En la figura 59 se puede observar el resultado de del experimento en estas condiciones usando un microscopio de transmisión electrónica.

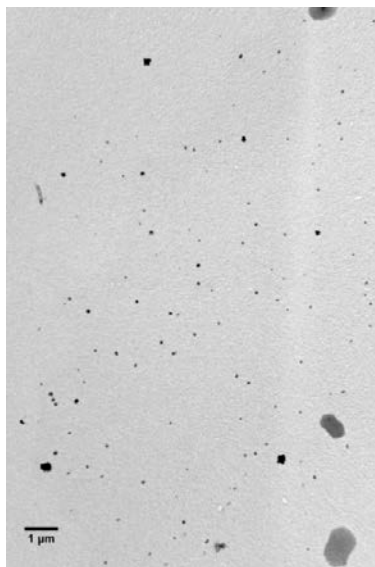


Figura 132. Nanopartículas de plata.

Nanopartículas grandes y muy variadas.

H) Eosina Y 0,1mM + AgNO₃ 0,2mM + luz. En la figura 60 se puede observar el resultado de del experimento en estas condiciones usando un microscopio de transmisión electrónica.

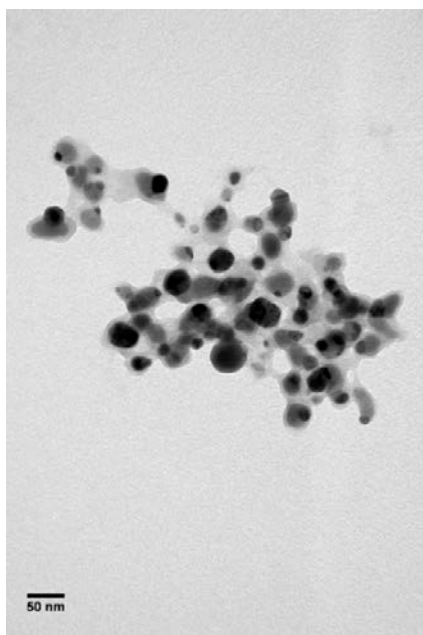


Figura 133. Nanopartículas de plata.

Aparecen agregados de nanopartículas.

2.6.3. Conclusiones

Como conclusión de este apartado se puede decir que parece que con estos colorantes se logran crear nanopartículas de oro estables en disolución, pero haría falta una investigación más exhaustiva para determinar las mejores condiciones y si es posible encontrar una correlación entre estas y los tamaños y formas que adoptan las nanopartículas. Parece que hay concordancia entre las nanopartículas en forma de triángulo y el no añadir la base.

Se debe investigar sobre este asunto para llegar a alguna conclusión interesante.

2.7. Nanopartículas de oro con los polímeros sintetizados:

Habiendo observado la aparición de nanopartículas de oro en disolución era probable que se formaran en los dos polímeros que se habían sintetizado por lo que se investigó esta posibilidad. Era una opción interesante porque si se formaban nanopartículas, estas podían

quedar depositadas en la superficie del polímero y así ser usadas por ejemplo como catalizador soportado.

Se probó a sumergir los dos polímeros en diferentes disoluciones de metales, observándose la formación de nanopartículas únicamente para el caso de las disoluciones de oro. El único caso donde se observó la aparición de nanopartículas de oro fue con el polímero del 5% de entrecruzante como se puede ver en la figura 134 utilizando el SEM.

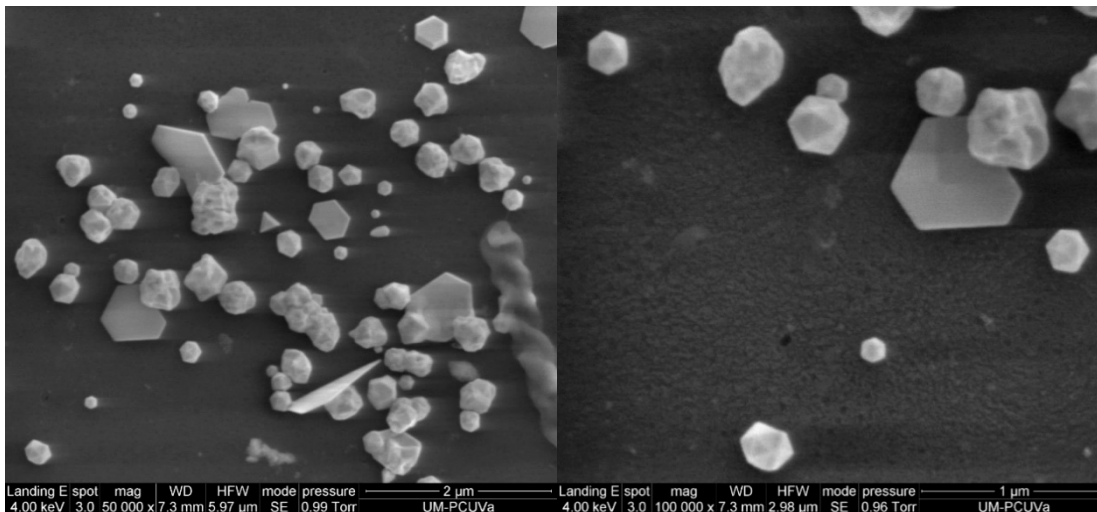


Figura 134. Nanopartículas de oro depositadas sobre el polímero con 5% de entrecruzante.

La concentración de oro en la muestra fue de 0,5 mM durante 20 horas.

Se puede observar cómo se han formado nanopartículas en forma de icosaedros de un tamaño de unos 300-400 nm aproximadamente. Aparte se puede observar también otras formas más planas y algunas nanopartículas más amorfas.

Aunque estos dos polímeros no fueron probados para ello, otros sintetizados en el grupo dieron lugar a una publicación.¹⁰⁰En esta publicación se consiguió depositar nanopartículas de oro en el polímero usándolo luego como catalizador heterogéneo en reacciones de Suzuki de acoplamiento C-C.

2.7.1. Conclusiones

A pesar de no haber encontrado utilidad a la formación de nanopartículas de oro en este polímero, en un futuro se tratará de buscar una aplicación, por ejemplo, en el campo de diseño

¹⁰⁰ García-Calvo, J.; García-Calvo, V.; Vallejos, S.; García, F. C.; Avella, M.; García, J.-M.; Torroba, T. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2016**, 8 (38), 24999–25004.

de procedimientos de obtención de nanopartículas con tamaño y morfologías controladas, que es uno de los retos que tiene planteados el campo de los nanomateriales.¹⁰¹

¹⁰¹ Sun, Y. *Science* (80-.). **2002**, 298 (5601), 2176–2179.

CAPÍTULO 3. DISEÑO DE UN SISTEMA DE MICROFLUIDOS

3. DISEÑO DE UN SISTEMA DE MICROFLUIDOS

3.1. Introducción

En este capítulo se va a exponer cómo se diseñó y construyó un primer prototipo funcional para poder aplicar el método de detección y determinación de aminas terciarias explicado en los capítulos anteriores. Este dispositivo se realizó dentro de un proyecto financiado por la DGT (Dirección General de Tráfico). La utilidad de este dispositivo se dirige a servir como detector de opiáceos en los controles realizados por la policía. Además de detectar, este método también sirve para cuantificar, lo cual es de gran interés para esta función.

El foco de este proyecto se basa en la investigación básica y traslacional en el ámbito de la detección de drogas mediante un diseño multidisciplinar con el propósito de desarrollar nuevos dispositivos para la detección rápida de alcaloides en cualquier muestra, sean muestras de la calle o muestras biológicas; con una orientación concreta a la detección de conjugados de morfina en orina. El reto específico es el desarrollo de una nueva metodología para la detección rápida de alcaloides, utilizando instrumentos portátiles que permitan una identificación y cuantificación rápida de la posesión o del consumo de drogas en conductores. El impacto esperado es desarrollar tecnologías más rápidas y más eficientes detección y cuantificación de la posesión o consumo de drogas y alcaloides, especialmente opiáceos, en conductores. La investigación que se va a llevar a cabo es potencialmente importante para el establecimiento de sistemas de detección avanzados, de forma que puedan tomarse las medidas adecuadas de forma inmediata.

La tarea de diseño y construcción del dispositivo se realizó mediante una estancia de tres meses en colaboración con el grupo del Dr. Piotr Garstecki, del Laboratorio de Química Física de la Academia de Ciencias de la Universidad de Varsovia. La tecnología de microfluidos se caracteriza por la manipulación de fluidos a escala milimétrica, y hasta la fecha ha demostrado un gran potencial en la mejora de las técnicas de diagnóstico e investigación biológica.¹⁰² Las propiedades de las tecnologías de microfluidos, como el procesamiento simple y el control preciso de los fluidos en un ensayo, han hecho de esta técnica la candidata ideal para reemplazar los experimentos tradicionales por las llamadas microtecnologías de “laboratorio sobre un chip” (lab-on-a-chip). La tecnología desarrollada por el Dr. Garstecki permite incluir en una pastilla de plástico los circuitos necesarios para llevar a cabo el mezclado preciso de muestra y reactivos, además de poder incluir componentes electrónicos sencillos, como un led de iluminación para llevar a cabo el proceso fotoquímico, y controladores de tiempo o temperatura. El sistema

¹⁰² Kaminski, T. S.; Scheler, O.; Garstecki, P. *Lab Chip* **2016**, *16* (12), 2168–2187.

constaba además de un fluorímetro portátil comercial que permite realizar las medidas experimentales recogiendo la señal mediante una fibra óptica, y de un pequeño ordenador portátil para el tratamiento numérico.

Objetivos y resultados esperados:

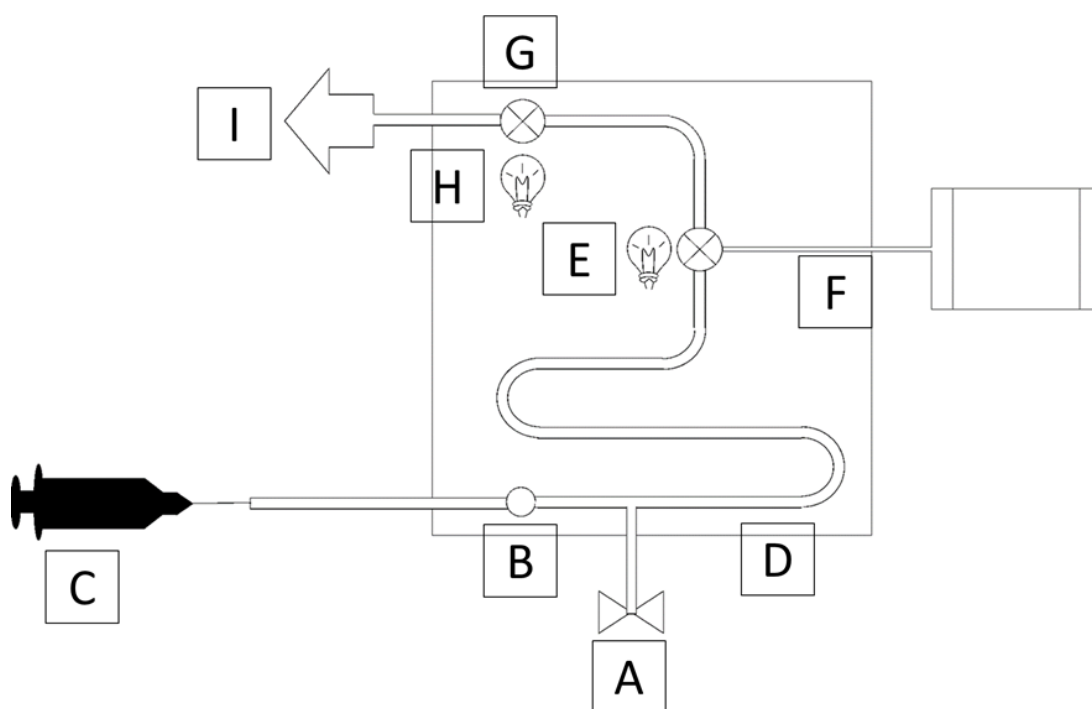
- 1 – Desarrollo de un sistema portátil para la detección de opiáceos por fluorescencia.
- 2 – Creación de una patente y publicación de los resultados del módulo de trabajo en revistas de su ámbito, con alto índice de impacto.

3.2. Primer dispositivo: prototipo

Una vez establecido el sistema por el que se lleva a cabo la reacción explicada en anteriores capítulos, se procedió a contactar con un laboratorio que elabora dispositivos para microfluídica. De esta forma se podrán realizar las medidas con mayor rapidez y precisión.

Durante la estancia en los laboratorios de Varsovia (Polonia) se diseñaron una serie de dispositivos acordes a las necesidades de nuestro proyecto. La metodología de fabricación de estos dispositivos se describe a continuación y comienza con el diseño y construcción del circuito por donde circula el fluido para seguir añadiendo componentes hasta llegar al diseño final.

Para ayudar a la comprensión y seguimiento del proceso de diseño y construcción del dispositivo, a continuación, se muestra un diagrama (esquema 12) con las partes y componentes del dispositivo final.



Esquema 12. Diseño final del dispositivo con los diferentes componentes que son expuestos a continuación.

Diferentes partes o componentes del dispositivo:

- A) Entrada de gas al circuito del dispositivo para actuar como fase móvil.
- B) Punto de entrada de la muestra.
- C) Introducción de la muestra con ayuda de una bomba de jeringas.
- D) Circuito del dispositivo.
- E) LED encargado de la excitación del colorante para producir la fluorescencia.
- F) Fibra óptica encargada de transmitir la señal luminosa hasta el detector.
- G) Espacio de reacción de la muestra.
- H) LED encargado de iluminar para provocar la reacción del colorante y la amina terciaria.
- I) Zona de desechos de las muestras después de la reacción y medición.

3.2.1. Diseño y componentes

La pieza donde se llevó a cabo la medición consta de dos placas rectangulares de policarbonato unidas por cuatro anclajes en sus correspondientes esquinas. En la placa de arriba se creó un canal fabricado mediante fresado donde se colocó un tubo de teflón, por donde fluiría

la disolución. Asimismo, se preparó otro canal más estrecho y perpendicular a éste para introducir un cable de fibra óptica de 0,5 mm que permite llevar la señal al detector. En la otra placa de policarbonato que se coloca debajo de la anterior, se introdujo una lente que actúa como filtro para restringir las longitudes de onda superiores a 500 nm que son emitidas por un LED de color verde. La figura 135 y 136 muestran las dos placas de policarbonato y los demás componentes necesarios para las primeras medidas.

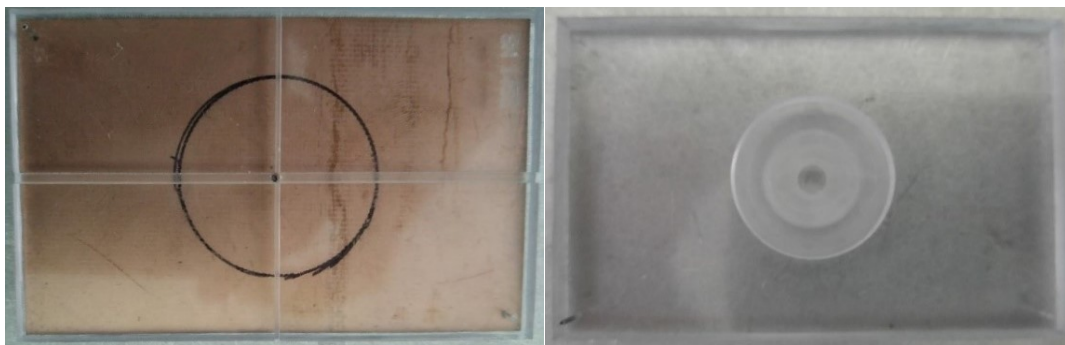


Figura 135. Primer dispositivo fabricado con policarbonato (PC) con los dos canales descritos. En la pieza de la derecha se fijan el led verde y el filtro.



Figura 136. a) Led verde. b) Filtro de 500nm, modelo MF475-35 de Thorlabs. c) Detector modelo QE Pro-FL de Ocean Optics

3.2.2 Calibrado

Para validar la funcionalidad de este dispositivo, se realizó un calibrado con fluoresceína. A continuación, se describe el proceso de preparación de las disoluciones necesarias y las condiciones utilizadas para este fin.

Disoluciones madre preparadas:

Fluoresceína: PM= 376,27 g/mol; se preparó una disolución madre de 10^{-3} M en 20 ml.

NaOH: PM = 40 g/mol; se preparó una disolución de 0,1 M en 20 ml.

Las concentraciones finales de las disoluciones de fluoresceína usadas para el calibrado fueron las siguientes: 0, 10^{-8} M, $3 \cdot 10^{-8}$ M, $7 \cdot 10^{-8}$ M, 10^{-7} M, $3 \cdot 10^{-7}$ M, $7 \cdot 10^{-7}$ M, 10^{-6} M, $5 \cdot 10^{-6}$ M y 10^{-5} M. Todas ellas contenían NaOH 1 mM y se prepararon 20 ml de cada una por dilución de la disolución madre. Este rango de concentraciones ha sido elegido en función de lo que se ha visto en el capítulo de las aplicaciones ya que es el rango en el que se miden las muestras problema. La siguiente figura muestra las disoluciones preparadas para realizar el calibrado.



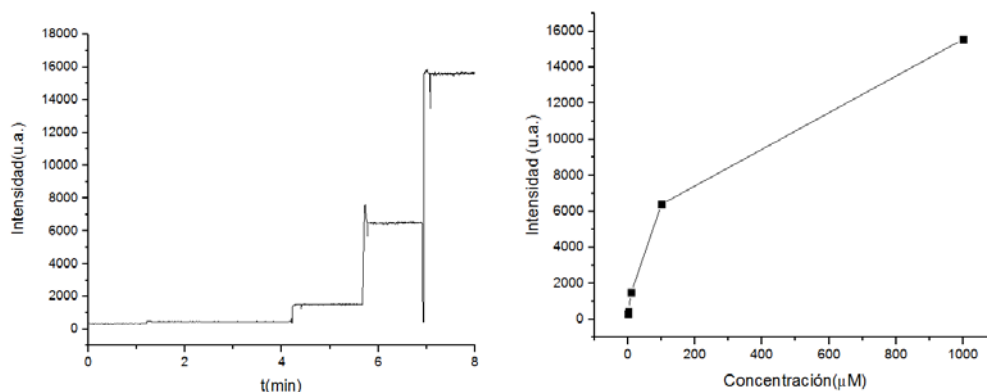
Figura 137. Las diferentes disoluciones de fluoresceína para el calibrado con el primer dispositivo.

A continuación, se detallan las dos variaciones que se probaron hasta dar con las condiciones adecuadas:

a) Las primeras condiciones del dispositivo y el experimento fueron las siguientes: Led verde (6,5 V), filtro (corta las longitudes de onda mayores de 500 nm) y fibra óptica (0,5 mm), flujo continuo proporcionado por una jeringa presionada a mano para introducir las diferentes muestras.

El calibrado con las muestras de fluoresceína se realizó mediante el llenado manual del tubo de teflón insertado en el canal del dispositivo con las disoluciones en flujo continuo: λ_{em}

=518 nm usada para los experimentos. Las gráficas obtenidas con el software Ocean View de Ocean Optics para el experimento fueron las siguientes:



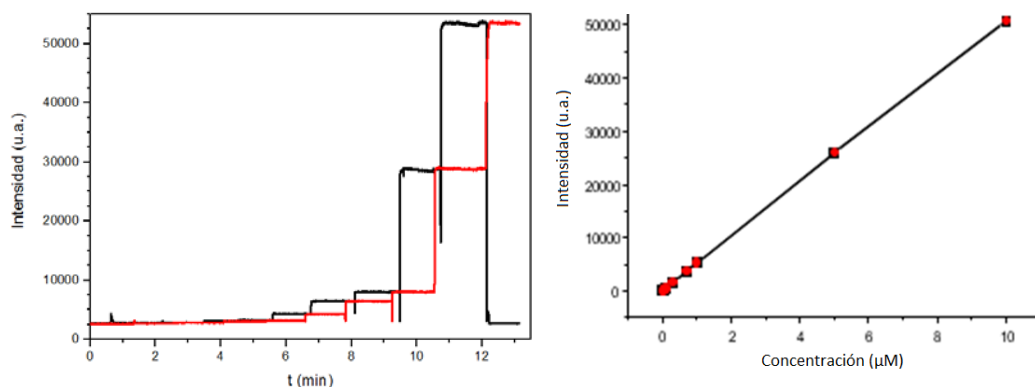
Gráfica 1. Respuesta del sistema para las disoluciones de fluoresceína ($\lambda_{em} = 518 \text{ nm}$) y su correspondiente gráfico para el calibrado representando intensidad frente a concentración (μM).

La gráfica de la izquierda muestra cómo el detector iba adquiriendo la señal continuamente a lo largo del tiempo produciéndose escalones hacia intensidades mayores según se iban inyectando disoluciones más concentradas a lo largo del tiempo. La gráfica de la derecha muestra la representación de la intensidad extraída de la gráfica de la izquierda de cada escalón que corresponde a cada concentración. Estas dos gráficas se van a ir exponiendo para los sucesivos calibrados de este capítulo.

Conclusión del experimento:

El calibrado no tenía un comportamiento lineal y las concentraciones más pequeñas no eran distinguibles por lo que este dispositivo no servía para el propósito deseado. Para mejorar el resultado se pensó en cambiar la fibra óptica.

b) Para la segunda prueba se realizó un cambio en la fibra óptica que va desde el dispositivo al detector para mejorar los parámetros analíticos incrementando el diámetro de la fibra óptica (0,5 \rightarrow 0,75mm). Los demás componentes se mantuvieron igual: Led de excitación verde (6,5 V) y filtro (500 nm). Las disoluciones de fluoresceína fueron introducidas manualmente presionando la jeringuilla con la mano llenando los tubos con las disoluciones de distintas concentraciones. La gráfica 2 muestra los resultados obtenidos con este cambio, del que se realizaron dos réplicas para comprobar que funcionaba correctamente.



Gráfica 2. Respuesta del sistema para las disoluciones de fluoresceína con sus dos réplicas y el correspondiente calibrado a la derecha.

Conclusión del experimento:

- i) La repetibilidad y sensibilidad son satisfactorias.
- ii) Necesidad de añadir un diodo de luz blanca para la iluminación de las muestras requerida por el método de detección y repetir el calibrado en el nuevo sistema para confirmar que sigue siendo óptimo.

3.3. Segundo dispositivo: introducción del diodo blanco

3.3.1. Diseño y componentes

Una vez que se corroboró que la medición era correcta, se construyó un segundo dispositivo similar al primero, con la diferencia de que se le añadió un diodo de luz blanca de 9 V que sirve para iluminar la muestra y que se produzca así la reacción (Figura 138). Los diferentes parámetros son: led verde (6,5 V), filtro (500 nm) y fibra óptica (0.75 mm):

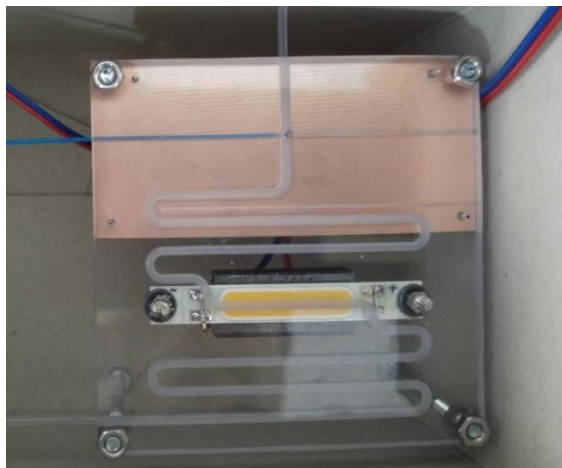


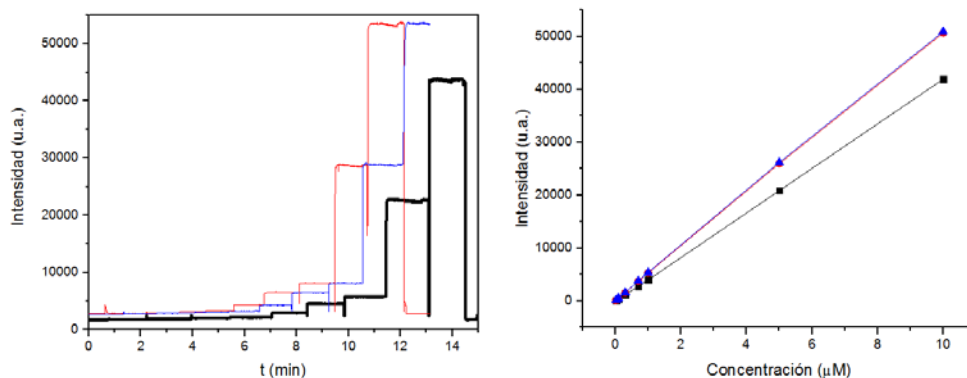
Figura 138. Segundo dispositivo. Ha sido añadido un diodo de luz blanca para la iluminación de las muestras. La parte de detrás del dispositivo es una pieza similar a la del primer dispositivo y mantiene el filtro y el led verde en su sitio.

3.3.2. Calibrado

Se realizaron diferentes calibrados con fluoresceína para este segundo dispositivo para comprobar que funcionaba correctamente. Se realizó la inyección de la muestra de tres modos diferentes, de forma manual (inyectado con la jeringa), con una micropipeta (e impulsión con aire), o con ayuda de una válvula.

3.3.2.1. Introducción de la muestra manual

El primer calibrado que se hizo con las disoluciones de fluoresceína y este segundo dispositivo fue llenando el tubo con un flujo continuo presionando la jeringa con la mano, al igual que en los dos experimentos anteriores. Esta forma de introducción implica que la impulsión de la muestra a través del circuito se realiza con la misma disolución lo que supone mucho consumo de muestra. Se obtuvieron las siguientes gráficas:



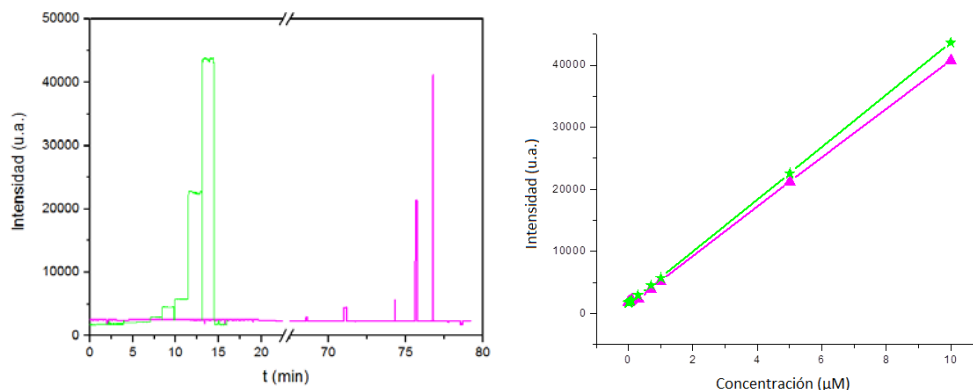
Gráfica 3. Respuesta del sistema comparando el primer dispositivo (dos réplicas en azul y rojo) y el segundo dispositivo (en negro). Calibrado de estas en la gráfica de la derecha.

Conclusión del experimento:

Este segundo dispositivo tiene menor sensibilidad, pero es suficiente para los experimentos.

3.3.2.2. Introducción de la muestra con micropipeta

Para un segundo calibrado se procedió esta vez usando solo 10 μl de cada disolución de fluoresceína y así gastar menos muestra conociendo ya pensando en el diseño final del dispositivo. Las disoluciones de fluoresceína se introdujeron en el circuito con ayuda de una micropipeta a través del capilar y como medio de impulsión del fluido a través del circuito se usó aire que se introduce manualmente mediante una jeringa por el mismo tubo por el que se insertó la muestra. La gráfica obtenida es la siguiente, que se compara con el experimento anterior:



Gráfica 4. Comparación de la respuesta de los sistemas para las disoluciones de fluoresceína. En verde con flujo continuo de las disoluciones y en rosa usando el aire como fase móvil de las gotas de 10 µl. A la derecha el calibrado.

Conclusión del experimento:

Los dos métodos tienen un comportamiento similar y sirven perfectamente para el objetivo planteado, pero siendo preferido el segundo por el menor gasto de muestra que supone.

3.3.2.3. Introducción de la muestra con válvula y bomba de jeringas

A la vista de los resultados anteriores se pensó en otro sistema que permitiese utilizar pequeños volúmenes de muestra. Esto se consigue introduciendo las muestras mediante una jeringa y haciéndolas pasar por una válvula que al girarla solo deja pasar 18,3 µl como se puede ver en el esquema 13.



Esquema 13. Diagrama de la válvula en la que se muestran las dos posiciones que tiene.

Para conseguir que se muevan estos volúmenes por el circuito se usa una bomba de jeringas que presiona automáticamente una jeringa con aire. Así se modifica el dispositivo con otros dos elementos añadidos (figura 139) la bomba de jeringas y la válvula.

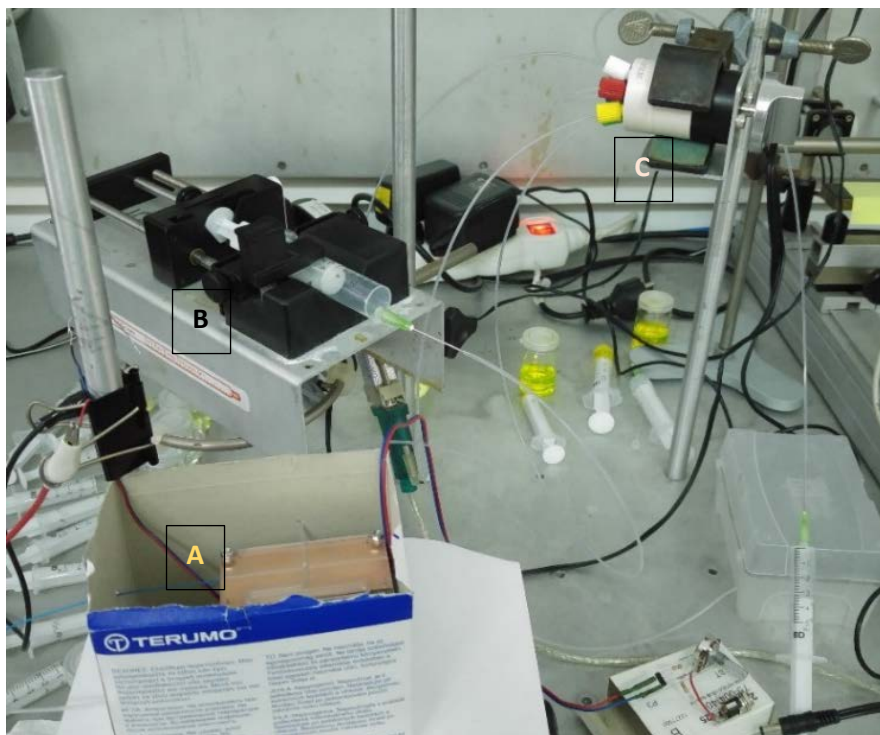
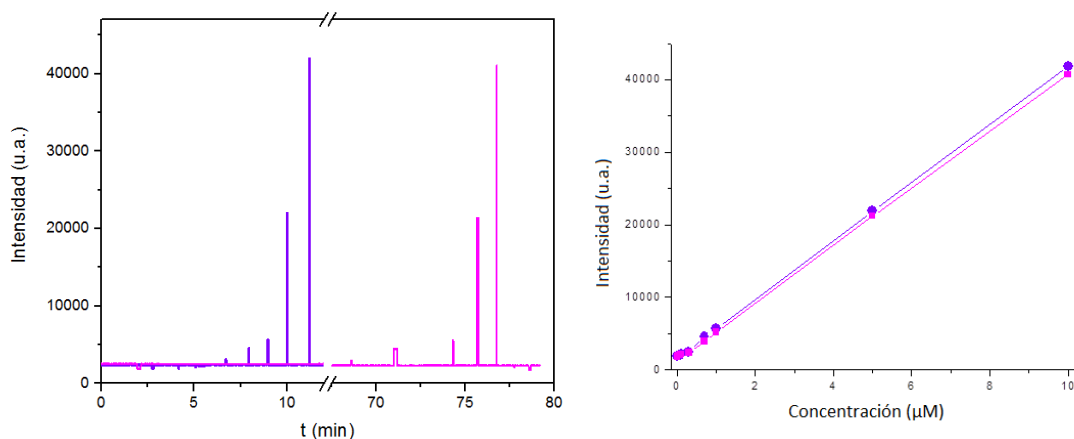


Figura 139. A la izquierda el segundo dispositivo (A) con la bomba de jeringas (B) y la válvula (C).

Teniendo ya el sistema montado se procedió a realizar el calibrado para las disoluciones de fluoresceína. La muestra se impulsa manualmente hasta la válvula por inyección con una jeringa llenándose la válvula con exactamente 18,3 μl . Después se gira la válvula lo que permite el paso de los 18,3 microlitros al dispositivo de medida. El volumen de muestra se desplaza automáticamente hasta la zona de medida mediante la bomba de jeringas que impulsa aire a una velocidad de 0,2 mL/min.



Gráfica 5. Respuesta para las disoluciones de fluoresceína con diferente forma de introducción (en morado con ayuda de la válvula y en rosa con el sistema de la micropipeta. A la derecha el gráfico del calibrado.

En la gráfica anterior puede verse como las primeras señales son menos intensas que el blanco. Esto es debido a que se ha tomado como blanco el aire en lugar del agua. No supuso un problema dado que se midió también la señal de agua y se aplicó al calibrado posteriormente quedando como se ve en la gráfica de encima a la derecha.

Conclusión del experimento:

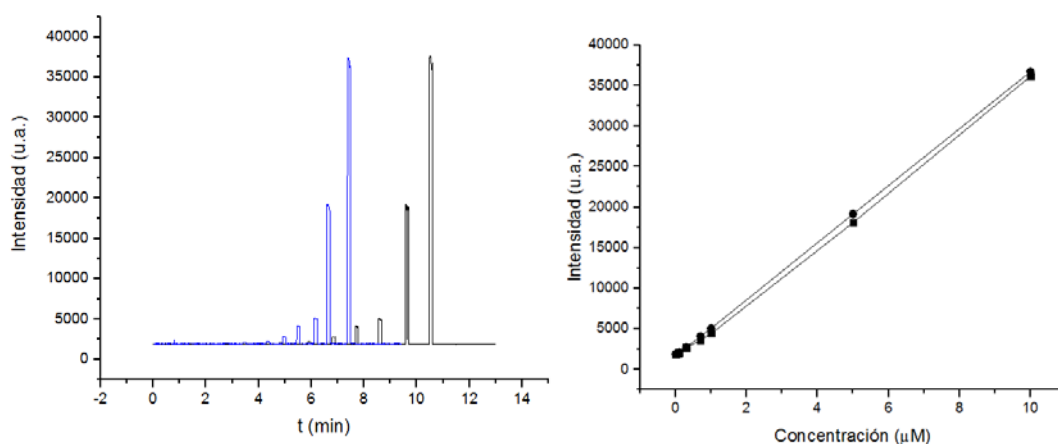
El sistema construido produce unas señales reproducibles y es lo suficientemente sensible para poder ser usado en los experimentos posteriores.

3.3.3.1. Prueba de cambio de fase móvil: fluorinert

Hasta aquí se había utilizado aire como fase móvil impulsora de la muestra. La detección de aminas por el procedimiento descrito en esta tesis requiere rigurosa ausencia de oxígeno por lo que es obvio que debemos sustituir el aire como fase móvil impulsora por otro fluido. Como primera opción se probó a utilizar un fluido inmiscible con el agua como es el Fluorinert FC-40, que usaban en el laboratorio de Varsovia para diferentes experimentos con microfluidos. Fluorinert es una marca para una serie de líquidos vendidos por 3M. Se basa en hidrocarburos totalmente fluorados los cuales son aislantes eléctricos y usados como refrigerantes de componentes electrónicos por ser bastante estables e inertes.

Las pruebas a partir de ahora se van a hacer con un dispositivo que incorpora los siguientes componentes: led verde (6.5 V), filtro (500 nm), fibra óptica (0,75 mm), bomba de jeringas, válvula y fase móvil Fluorinert:

Se montó el sistema y se procedió con el calibrado mediante disoluciones de fluoresceína. Se usaron 18.3 µl de la disolución de fluoresceína en agua y se impulsó a través del circuito con Fluorinert como fase móvil. Las muestras se introducen con el uso de la válvula y de la bomba de jeringas que inyecta fase móvil a una velocidad de 0.2 mL/min. Se obtuvieron las gráficas que se muestran a continuación:



Gráfica 6. Respuesta para dos réplicas realizadas usando como fase móvil Fluorinert. A la derecha se encuentra la gráfica del calibrado con las dos réplicas.

Conclusión del experimento:

La sensibilidad y reproducibilidad son satisfactorias por lo que se realizarán con estas condiciones los experimentos de iluminación con aminas terciarias.

3.3.3. Reacción con aminas terciarias

Una vez establecidas y optimizadas las condiciones de trabajo del sistema de microfluidos, el siguiente paso fue preparar las disoluciones madre que se iban a necesitar para hacer las distintas pruebas y experimentos. Estas disoluciones se prepararon todas ellas en agua y fueron las que siguen a continuación:

- Colorantes:

172 | Capítulo 3. Diseño de un sistema de microfluidos

Eosina Y: PM= 691,85 g/mol. Se preparó una disolución madre 10^{-4} M en 50 ml.

Eritrosina: PM = 879,86 g/mol. Se preparó una disolución madre 10^{-4} M en 20 ml.

Rosa Bengal: PM= 1017,64 g/mol. Se preparó una disolución madre 10^{-4} M en 20 ml.

Floxina: PM= 829,63 g/mol. Se preparó Una disolución madre 10^{-4} M en 20 ml.

- Aminas:

Sinomenina hidrocloreuro: PM = 365,85 g/mol. Se prepararon dos disoluciones: 10^{-3} y 10^{-4} M en 50 ml.

TEA (trietilamina): PM= 101,19 g/mol. d= 0,726 g/ml. Se preparó una disolución de trietilamina 10^{-4} M en 50 ml.

TEOA (trietanolamina): PM= 149,19 g/mol. Se preparó una disolución de trietanolamina 10^{-4} M en 50 ml.

- Medio básico:

NaOH: PM = 40 g/mol. Se preparó una disolución de NaOH 10^{-1} M en 50 ml.

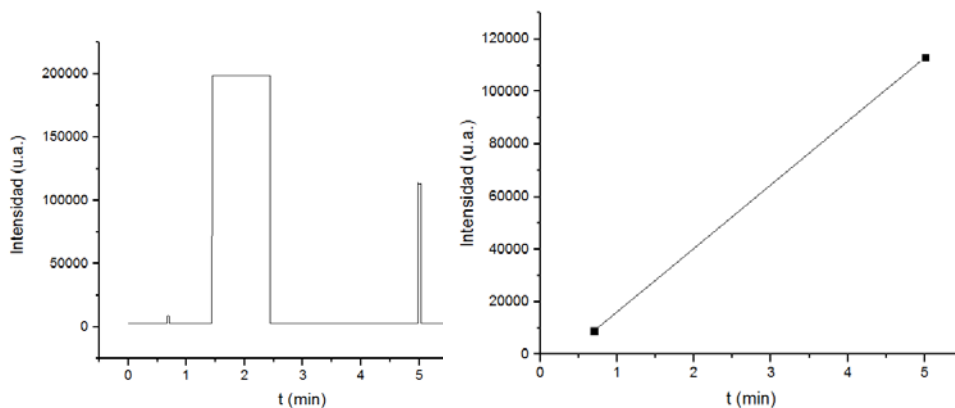
Todas las disoluciones se guardaron en el frigorífico para que no se estropearan.

3.3.3.1. Experimentos con altas concentraciones de amina.

Los experimentos en los que se lleva a cabo la iluminación de la reacción que provoca la deshalogenación del colorante y la exaltación de la fluorescencia exigen mover la muestra por el circuito primero hasta la zona de detección y de ahí hasta la de iluminación. Una vez provocada la reacción se procede a aspirar la muestra y la fase móvil para devolverla a la zona de medición y así volver a tomar la fluorescencia. Este proceso se entiende mejor observando el esquema 1. Estas operaciones se realizan automáticamente usando la bomba de jeringas, impulsando o aspirando, con los parámetros suministrados en el ordenador de control.

Para el primer experimento de prueba, se escogió una muestra que contenía la eosina Y como colorante y la TEA (trietilamina) como amina terciaria. Las concentraciones utilizadas fueron de 50 μ M para la eosina Y y 50 mM para la TEA. A concentraciones tan elevadas de amina es posible utilizar aire como fase impulsora a un flujo de 0,2 ml/min sin perjudicar el

experimento (téngase en cuenta que el precio del Fluorinert es elevado). Los resultados obtenidos se muestran en la siguiente gráfica.



Gráfica 7. En la gráfica de la izquierda se observa que la intensidad de la fluorescencia de la muestra de Eosina Y 50 μM y TEA 50 mM tras un minuto de iluminación. A la derecha el gráfico que muestra el incremento de fluorescencia que corresponde a la detección de la amina terciaria.

En la gráfica de la izquierda se muestra como la muestra pasa de una intensidad de unas 10000 u.a. antes de iluminar (antes del primer minuto) hasta una intensidad de más de 100000 u.a. (a los cinco minutos). Las señales corresponden a la eosina Y antes y después de la iluminación. La señal del medio corresponde a la fase de iluminación que es captada esta luz por la fibra óptica. Estas son las gráficas que se obtienen del detector en estos experimentos y serán así durante los posteriores experimentos.

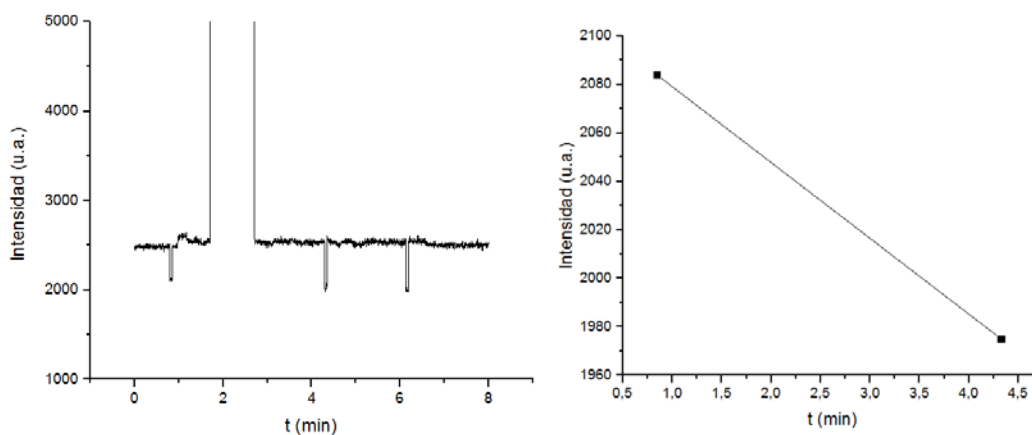
Conclusión del experimento:

El sistema funciona bien para muestras con altas concentraciones de aminas. El siguiente paso es probar con concentraciones más bajas para aproximarnos poco a poco a la realidad que perseguimos de detectar concentraciones tan bajas como se pueda.

3.3.3.2. Experimentos con pequeñas concentraciones de amina.

En el experimento siguiente se probó con concentraciones más pequeñas de colorante y amina ya que son las que realmente se van a necesitar para realizar las pruebas de análisis. Estas concentraciones fueron: eosina Y 1 μM , TEA 5 μM y NaOH 1 mM. Además, se realizó un burbujeo de argón durante 10 minutos para eliminar el oxígeno de la disolución. El tiempo de iluminación que se usó fue de 10 minutos. La fase impulsora móvil que se usó en este

experimento fue aire y su flujo fue 0,2 ml/min proporcionado por la bomba de jeringas. Se usó la válvula para introducir la muestra en el dispositivo. Aunque lo más probable era que no funcionara por tener aire como fase móvil impulsora (el oxígeno como se sabía impide la reacción) se quiso probar para ver los resultados, los cuales se observan en la siguiente gráfica.



Gráfica 8. La señal producida después de la reacción es menor que antes de la iluminación. A la derecha se muestra mejor este descenso en la fluorescencia. Eosina Y 1 μ M Sin 5 μ M fase continua es aire.

Como se puede apreciar en la gráfica anterior, las señales salen más bajas que la línea base debido a la diferencia entre el aire de la fase continua y el agua de la disolución porque el blanco se ha hecho con el aire.

Conclusión del experimento:

El experimento no funcionó, pero es lógico como ya se ha dicho, ya que se ha usado aire como fase continua y el oxígeno reacciona con el colorante en el paso de la iluminación impidiendo la reacción con la amina. El siguiente paso fue usar otra fase móvil para impulsar las muestras en lugar del aire.

3.3.3.3. Experimentos con Fluorinert como fase móvil.

Para las nuevas pruebas se cambió la fase móvil por Fluorinert con el que ya se había hecho el calibrado con fluoresceína. Se procedió primero a acortar los tubos de conexión con la válvula para que tuviera menor recorrido la disolución y así gastar menos disolución. En la imagen siguiente se puede observar este acortamiento si se compara con la figura 139.



Figura 140. Segundo dispositivo con los tubos recortados.

Siguiendo este procedimiento se midieron diferentes concentraciones de amina terciaria (en el rango de 10^{-4} a 10^{-6} M). Se siguieron estos pasos para este y futuros experimentos:

1. A partir de las disoluciones madre (amina, colorante y medio básico) se coge el volumen correspondiente de medio básico y diferentes volúmenes de las otras dos dependiendo de las concentraciones requeridas en cada caso. Se mezclan las tres en un vial llegando a un volumen total de 2,5 ml.
2. Para eliminar el oxígeno de la disolución de este vial, se tapa con un septum y se hace pasar argón durante diez minutos.
3. Con una jeringa se toma una alícuota de la muestra y se introduce al sistema.
4. El líquido (Fluorinert) ya desaireado (1 hora y media en el rotavapor a temperatura ambiente y 200 mbar de presión) es introducido al sistema por los tubos ayudado con una bomba de jeringas que controla el flujo.
5. Una vez que la muestra ha pasado por la válvula esta se gira para que la muestra pase al circuito en el dispositivo.
6. La muestra se impulsa hasta llegar al punto en el que mide la fibra óptica y recoge la primera señal de la disolución antes de iluminar.
7. Después la muestra se impulsa aún más y es conducida a la zona de iluminación donde, habiendo parado el flujo de Fluorinert, permanece 10 minutos o el tiempo correspondiente que se necesite.

- Para finalizar se aspira la muestra hasta detenerla en el lugar de la fibra óptica para recoger la nueva señal de la disolución. Una vez que se mide, se lleva la disolución fuera del dispositivo que se lava y prepara para la siguiente muestra repitiendo este procedimiento.

RESULTADOS PARA LAS MEDIDAS DE LAS DISOLUCIONES DE TRIETILAMINA (TEA):

Siguiendo el procedimiento habitual expuesto, se comprobó que para esta amina no se tienen resultados favorables. Esto es debido a que la trietilamina es volátil y al realizar el paso de burbujeo de Argón se elimina de la disolución. Por lo tanto, esta amina no sirve para los experimentos. Se procedió a utilizar otras aminas que no sean volátiles para verificar que se produce la reacción en pequeñas concentraciones.

RESULTADOS DE LAS MEDIDAS PARA LAS DISOLUCIONES DE SINOMENINA

Como en este momento no se podía trabajar con morfina ni sus derivados por temas legales y burocráticos de Polonia, se compró una amina semejante para llevar a cabo los experimentos. Esta amina escogida se llama sinomenina y se puede ver su estructura química en la figura 7. Después de llevar a cabo varios experimentos con las disoluciones de sinomenina los resultados fueron negativos. Más tarde al buscar en bibliografía se descubrió que esta amina es inestable a la luz y al calor descomponiendo.¹⁰³ A pesar de ser una molécula con estructura similar a la de las drogas que se quieren detectar, no se puede usar para los experimentos y hubo que pensar en otra. Se usó la TEOA que se sabe que funciona bien en esta reacción debido a los experimentos realizados anteriormente.

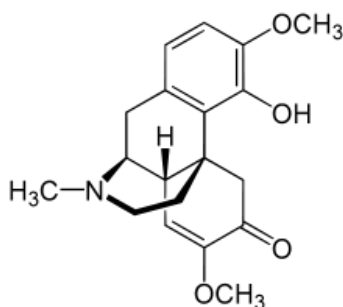


Figura 141. Molécula de sinomenina.

¹⁰³ Yao, Zhujun; Sun, Bing; Lou, Yangtong; Yang, Zhenyu; Chen, Aizhong; Ma, Z. SINOMENINE DERIVATIVES, SYNTHETIC METHODS AND USES THEREOF, **2013**.

RESULTADOS PARA LAS MEDIDAS DE LAS DISOLUCIONES DE TRIETANOLAMINA (TEOA):

A pesar de saber que con esta amina funciona bien la reacción, no lo hacía así en el dispositivo. Se probó a cambiar distintas condiciones:

- Iluminar entre 5 y 30 minutos. No funcionó en el dispositivo. Funcionó al iluminar un vial colocándolo encima del dispositivo.
- Usar otra lámpara para iluminar en vez del diodo (una bombilla fluorescente de 15 W como la de la figura 142). No funcionó en el dispositivo, pero sí que lo hace si lo que se iluminaba era el vial con la muestra y desoxigenado. Al igual se probó a iluminar usando la luz del sol y rápidamente funcionó en el vial, pero no en el dispositivo.



Figura 142. Ejemplo de una bombilla fluorescente como la usada en el experimento.

- Iluminar la muestra dentro de una jeringa de vidrio funciona. Es probable que el problema estuviera en los tubos o en la fase móvil.

Se decidió mezclar la muestra del vial después de desoxigenar con el líquido Fluorinert y agitar. Se iluminó y se observó que seguía sin funcionar; por lo tanto, el Fluorinert da problemas en la reacción. El siguiente paso fue probar otro líquido como fase móvil para ver si funcionaba. Este nuevo líquido fue el hexadecano, otro hidrocarburo inmiscible con el agua. Se siguió el mismo procedimiento que con el otro líquido para desoxigenarlo con el rotavapor (hora y media a temperatura ambiente y a 200 mbar). Además, se burbujeó argón después. Se probó en el dispositivo y en el vial mezclando varias veces burbujeando antes y después, pero no funcionó. La explicación es que estos líquidos al ser disolventes orgánicos tienen la capacidad de extraer la amina que se encuentra en estado neutro en el agua debido a que en medio básico la amina permanece en su forma neutra y es mucho más soluble en estos disolventes orgánicos.

3.3.3.4. Experimentos con argón como fase móvil.

A la vista de los resultados anteriores se pensó entonces en usar un gas inerte como es el argón como fase móvil que vaya impulsando la muestra por el dispositivo. Usando argón se comprobó que tampoco funcionaba. Se procedió a realizar un experimento para comprobar si el problema es de los tubos del dispositivo (de Teflón) ya que según bibliografía dejan pasar el oxígeno a través y podría haber estado pasando hacia la disolución.¹⁰⁴

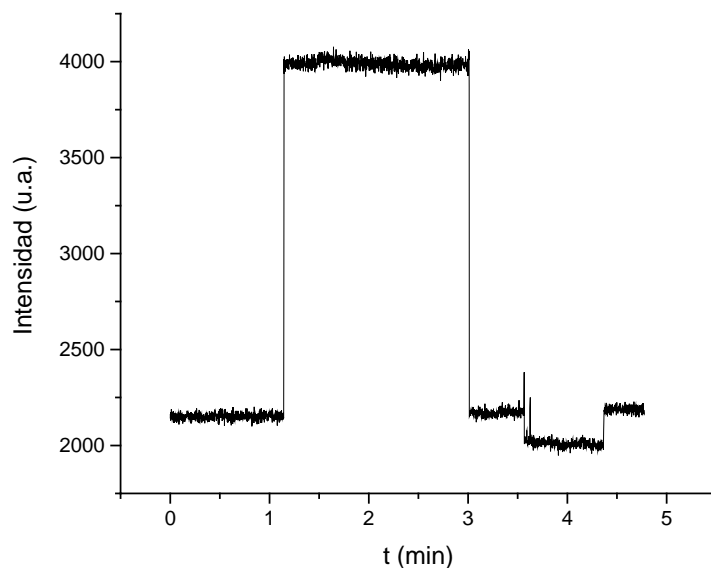
Para comprobarlo se conectaron dos viales introduciendo el tubo de teflón de unos 120 cm de longitud a través de dos tapones de goma (ver figura 143). Se introdujo el argón con una aguja de jeringa por el primero burbujear la disolución (1,25 ml) y otra aguja se insertó en el segundo vial a través del tapón para que fuera saliendo el aire durante unos 15 o 20 minutos. Se aspiró con una jeringa conectada a la aguja del segundo vial y se mantuvo la disolución en el tubo unos 10 minutos (unos 0,6 ml en su interior). Después se dejó caer esta disolución del tubo a este segundo vial. En este punto se iluminó con la lámpara durante 10 minutos.



Figura 143. Fotografía de los dos viales conectados con el tubo de teflón para la realización del experimento.

Este experimento se repitió varias veces con las concentraciones habituales 10^{-6} M para el colorante y $5 \cdot 10^{-6}$ M para la amina, además de hidróxido de sodio en 10^{-3} M. El resultado fue la consecución de la reacción en el primer vial, pero no en el segundo. El resultado queda recogido en la siguiente gráfica.

¹⁰⁴ Giacobbe, F. W. *J. Appl. Polym. Sci.* **1990**, 39 (5), 1121–1132.



Gráfica 9. Muestra la señal del primer vial que sube hasta una intensidad de 4000 y la segunda señal es para el segundo vial con una intensidad de unos 2000 ya que no ha funcionado la reacción.

La interpretación de la gráfica es la siguiente: empieza con la señal del aire, sube al introducir la muestra del primer vial hasta unas 4000 u.a. (sobre el primer minuto hasta los 3 minutos), otra vez aire, y para la muestra del segundo vial (sobre los 3 minutos y medio hasta los cuatro y medio) baja hasta unas 2000 u.a. ya que la reacción no ha funcionado. Las muestras fueron introducidas con una jeringa a mano en el dispositivo. Esto confirma que los tubos utilizados son permeables al oxígeno, el cual penetraba en la disolución impidiendo la reacción con la amina al iluminar.

Para próximos experimentos era necesario un nuevo dispositivo que no precise de estos tubos. Este sería fabricado entero con policarbonato para evitar usar tubos que tengan permeabilidad al oxígeno e interfiera con la reacción.

3.4. Tercer dispositivo: rediseño con policarbonato

3.4.1. Diseño y componentes

Para no tener que usar un tubo de teflón, el nuevo dispositivo se fabricó en dos piezas de policarbonato que hubo que unir, una lisa entera y la otra con los canales por los que irá la disolución. Estas piezas concretamente son cuadradas con un lado de 7 cm de longitud. Se unieron mediante calor y presión con la prensa que se puede observar en la siguiente figura 144:



Figura 144. Prensa y el control de temperatura usados en la unión de las dos piezas del dispositivo. Para detalles de la fabricación ver la parte experimental.

El dispositivo con las dos piezas ya unidas se muestra en la figura 145. El proceso detallado de esta unión se encuentra en el apartado de parte experimental de esta tesis.

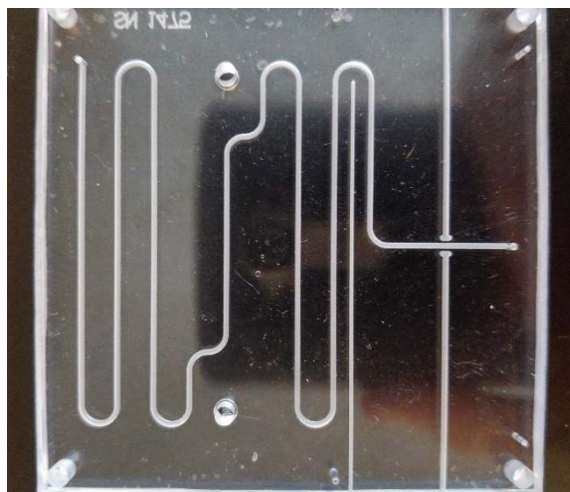
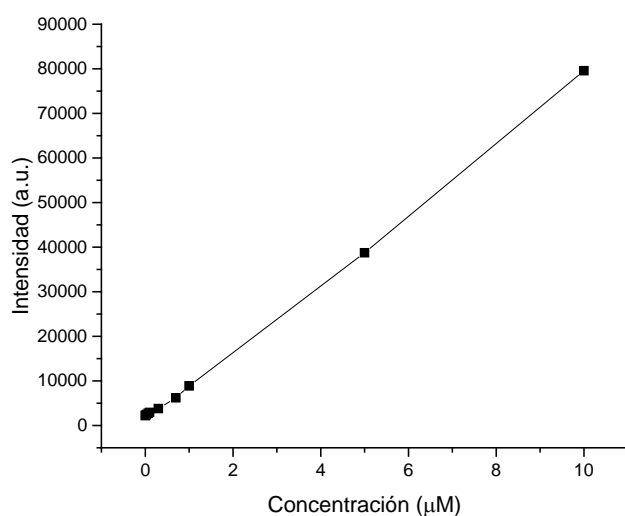


Figura 145. Nuevo dispositivo con las dos piezas de policarbonato ya unidas.

Teniendo las dos piezas ya unidas (Figura 11), se procedió a conectar el dispositivo con el led verde (6,5 V), el filtro (500 nm), la bomba de jeringas y la fibra óptica (0,75 mm) además del diodo de luz blanca que sirve para iluminar y producir la reacción.

3.4.2. Calibrado

Previamente a realizar las medidas pertinentes, se lleva a cabo un calibrado con fluoresceína introduciendo las disoluciones con una jeringa a través de un tubo metálico. A continuación, se muestra en la siguiente gráfica el calibrado.



Gráfica 10. Calibrado para el tercer dispositivo. Diferentes concentraciones de fluoresceína.

Los resultados de este experimento son favorables, por lo que se decidió continuar con las medidas, pero antes hubo que construir una pequeña pieza nueva para poder usar argón como fase móvil e impulsar la muestra en el interior del dispositivo. Esta consiste en dos placas de policarbonato unidas por el mismo procedimiento que se siguió anteriormente, que tiene dos entradas, una para la muestra y otra para el argón. Por otra parte, tiene una salida que conecta con el dispositivo mediante un capilar metálico. Además, se colocó una válvula que se puede ver en la figura 146, la cual permite el paso de gas mediante un mecanismo interno que se controla usando un imán manualmente.



Figura 146. A la izquierda la pieza unida al dispositivo para el paso de argón. A la derecha la válvula de entrada para el argón.

3.4.3. Reacción con aminas terciarias

Una vez que esta pieza está unida al dispositivo, se procede a montar el equipo, que se compone de las siguientes partes: un led verde (6,5 V), un filtro (500 nm), fibra óptica (0,75 mm), diodo de luz blanca para la iluminación, una bomba de jeringas, válvula de entrada para la fase móvil de argón. Este montaje se observa en las siguientes figuras.

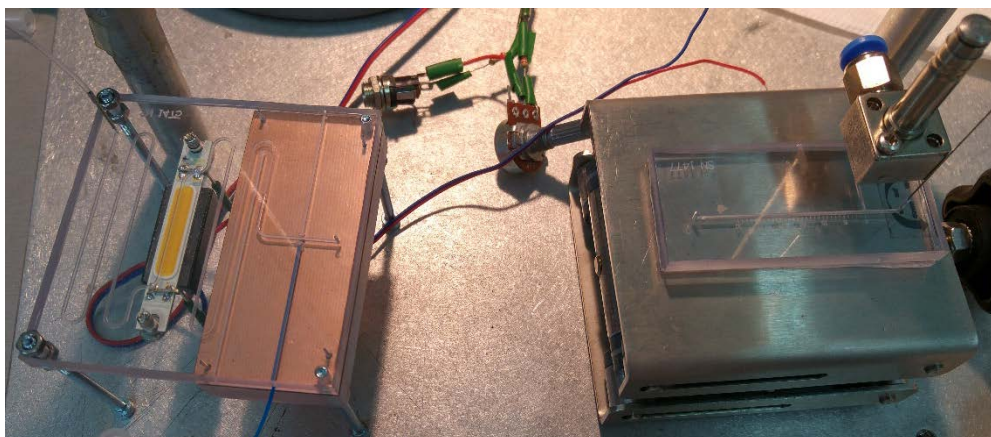


Figura 147. Montaje del equipo con las dos piezas del dispositivo.

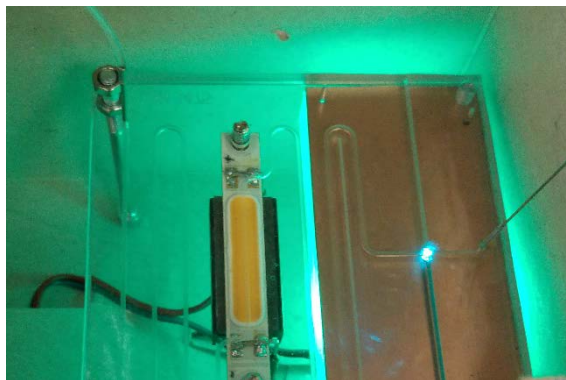


Figura 148. Dispositivo con el led verde en funcionamiento.

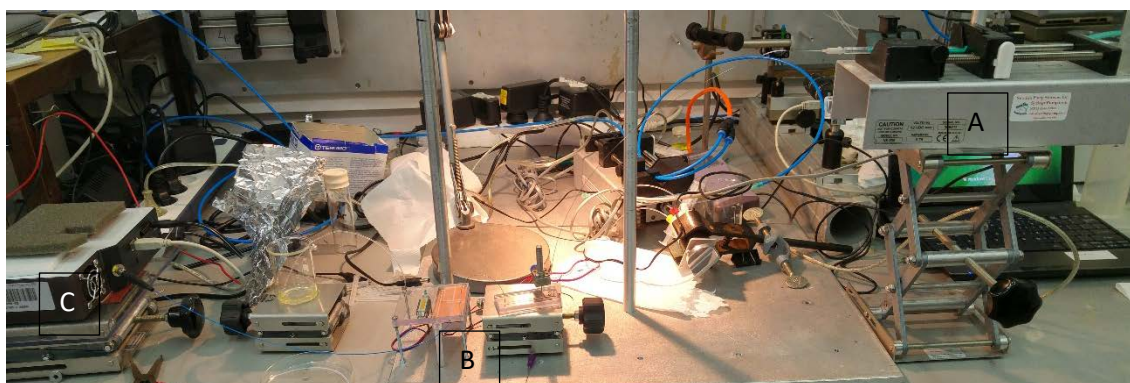


Figura 149. El dispositivo con todos los componentes conectados y en funcionamiento. A es la bomba de jeringas, B es el dispositivo y C es el detector.

Después de preparar el equipo, se introdujo la muestra que contiene eosina Y $1 \mu\text{M}$, trietanolamina $5 \mu\text{M}$ e hidróxido sódico 1 mM . Se llevó a cabo el procedimiento de medida descrito previamente, comprobándose que la reacción no funciona bajo ninguna condición de iluminación. Para comprobar si el problema procedía del dispositivo, se realizó la reacción en un vial, después de que la muestra hubiera pasado por todo el circuito, resultando ser satisfactoria. Se concluye así que la reacción solamente funcionaba usando un vial y no en el dispositivo.

Para elucidar la causa del problema, se probaron las siguientes posibilidades:

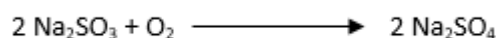
1. Limpieza exhaustiva de los tubos del dispositivo. Asegurando la ausencia de burbujas de oxígeno que pueden estar interfiriendo.

2. Separar el diodo a una distancia de 3mm aproximadamente para evitar el sobrecalentamiento y la consecuente posible evaporación de la muestra.
3. Se coloca una placa de vidrio entre el diodo y el dispositivo, de forma que se pudiera absorber alguna longitud de onda perjudicial para esta reacción.

Tras probar estas alternativas, el resultado siguió siendo negativo. Consultando bibliografía se llegó a la conclusión de que lo que está interfiriendo es el mismo material del dispositivo, el policarbonato, que desactiva el estado triplete de la eosina, impidiendo así la correcta evolución de la reacción.¹⁰⁵

A partir de este punto, se planteó un rediseño del dispositivo con un material que no interactuara con la disolución, que fuera transparente, y que dispusiera de un punto de entrada y otro de salida que atravesaran la zona de iluminación. Se propuso así una nueva fabricación eligiendo como material el vidrio para la parte de iluminación, que mediante los experimentos con el vial se sabe que funciona de forma adecuada.

El dispositivo se fabricó al final de la estancia en Varsovia. Tras un mes desde el inicio, se envió a Burgos donde se siguieron los experimentos. Mientras tanto se decidió investigar en otros métodos de desoxigenar la muestra disuelta en agua para no tener que hacer siempre el burbujeo de gas inerte durante diez minutos. Así se encontró en bibliografía un método para eliminar el oxígeno del agua mediante el uso de sulfito de sodio.¹⁰⁶ Este compuesto es un reductor que reacciona con el oxígeno para ser oxidado hasta sulfato de sodio como se muestra en el esquema siguiente.



Esquema 14. Reacción del sulfito de sodio con el oxígeno para eliminarlo del agua.

Teniendo en cuenta esta ecuación se calculó la cantidad necesaria de sulfito de sodio para eliminar el oxígeno (solubilidad de 0,28 mM en agua a 1 bar y 20°C) de una cubeta de 2,5 ml realizando el procedimiento habitual descrito en capítulos anteriores. Se hicieron varias pruebas usando 1 μM de eosina Y, 5 μM de TEOA y 1 mM de hidróxido sódico. Después de iluminar se observó que la señal de emisión de la eosina disminuía porque el sulfito no es capaz de eliminar completamente la presencia de oxígeno en el tiempo en el que ha sido expuesta. Para forzar la reacción se añadió una mayor cantidad de sulfito, sin obtener el resultado que se esperaba puesto que el sulfito reacciona con el colorante.

¹⁰⁵ Pankasem, S.; Kuczynski, J.; Thomas, J. K. *Macromolecules* **1994**, 27 (14), 3773–3781.

¹⁰⁶ Kobe, K. a.; Gooding, W. L. *Ind. Eng. Chem.* **1935**, 27 (3), 331–333.

Se planteó la posibilidad de anclar los iones sulfito a una resina de intercambio aniónico (Dowex A2) que intercambia sus aniones cloruro por los aniones sulfitos. A través de la resina se hizo pasar la disolución que contiene la eosina Y, TEOA y NaOH. Al salir de la resina se apreció una pérdida de la coloración inicial debido probablemente a que la eosina Y se quedaba atrapada en la matriz de la resina. La reacción no se produce por lo que se desecha este método de desoxigenación.

3.5. Cuarto dispositivo: adición del capilar de vidrio y unión de las dos piezas del dispositivo

Para este cuarto dispositivo se realizaron dos modificaciones. La primera fue incorporar tanto el circuito como la pieza de entrada del gas como fase móvil en un único dispositivo. La segunda fue sacar la zona de iluminación fuera del dispositivo mediante la adición de un capilar de vidrio conectado al dispositivo por unos capilares metálicos. Una vez que el dispositivo estuvo disponible en Burgos se hizo una primera comprobación para asegurar que no faltaba ningún elemento determinante para realizar los experimentos. Los componentes que llegaron fueron los siguientes:

3.5.1. Diseño y componentes

- Pieza de introducción de muestra y gases unida directamente al dispositivo
- La válvula de entrada de gas
- El led verde
- El diodo de luz blanca
- La fibra óptica
- El capilar de vidrio para la iluminación de la muestra
- Los tubos de conexión necesarios como se aprecian en la figura 150.

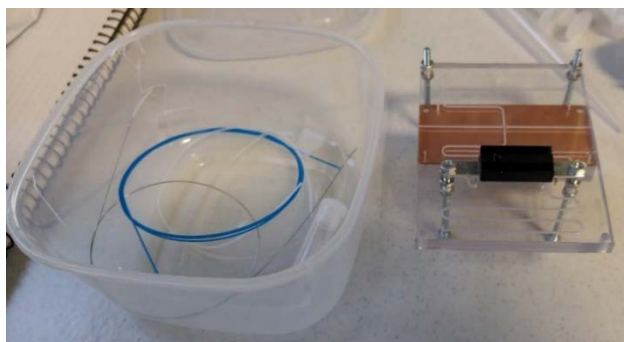


Figura 150. Dispositivo recibido en Burgos.

Por otra parte, las piezas que faltaban para que funcione el dispositivo eran:

- Dos fuentes de alimentación
- Un tubo de conexión para unir la bombona de gas con la válvula
- Un imán para accionar la válvula de forma manual
- El filtro para la excitación
- Una bomba de jeringas
- El detector de fluorescencia

Se compraron todos los componentes arriba descritos excepto la bomba de jeringas ya que se disponía de una en el laboratorio y el detector de fluorescencia (Ocean Optics modelo S2000) que fue prestado por el grupo de química analítica Análisis Instrumental, así como el software necesario (SpectraSuite de Ocean Optics) para realizar las medidas.

Una vez que se consiguieron todas las piezas se realizó todo el montaje del dispositivo como se muestra en la figura 151.

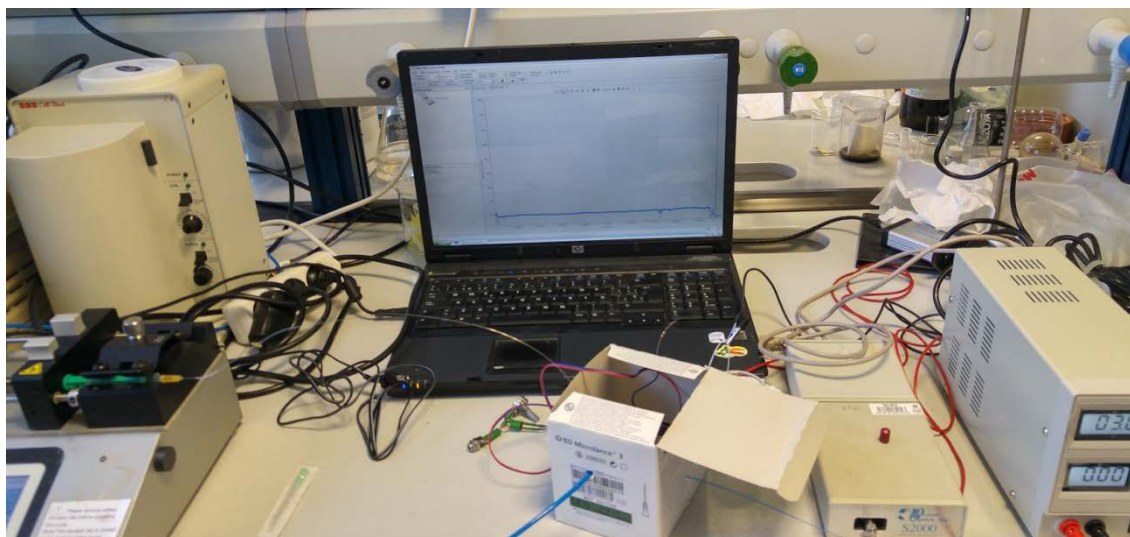


Figura 151. Dispositivo dentro de una caja para mantenerlo a oscuras en las medidas y con todas las piezas conectadas.

En la figura 152 se puede ver un primer plano del dispositivo con los cables del led verde y el diodo blanco conectados. El diodo blanco tiene sobre él una pieza de metal que actúa de disipador de calor para evitar que se sobrecaliente. Justo debajo del diodo se encuentra el capilar de vidrio cilíndrico en el que se debe producir la reacción al iluminar.

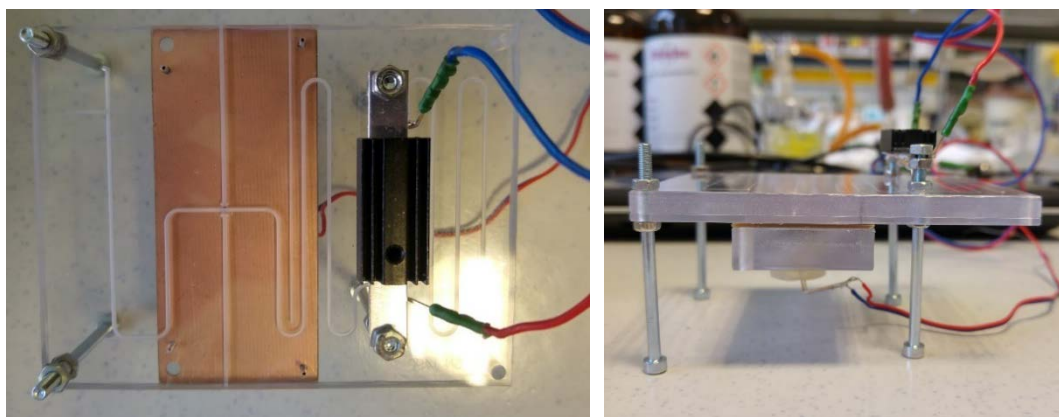
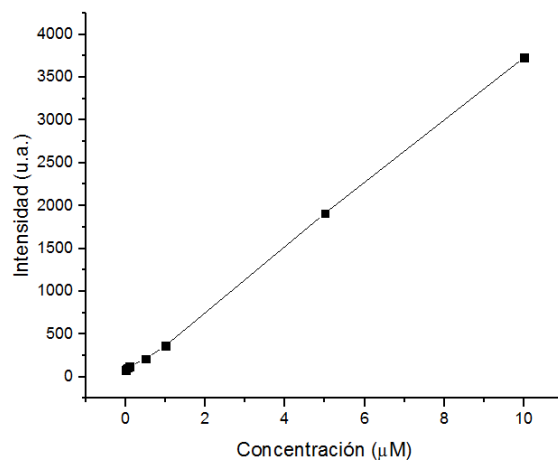


Figura 152. A la izquierda se encuentra el dispositivo visto desde arriba. A la derecha visto de perfil.

Se procedió así al montaje del dispositivo, colocando el led verde, un filtro de excitación de 500 nm, la fibra óptica de 0,75 mm, la bomba jeringas y la válvula de entrada para el gas. Se llenó de agua y seguidamente de argón para comprobar que no existieran fugas en el sistema.

3.5.2. Calibrado

El primer experimento que se llevó a cabo fue un calibrado con fluoresceína tal y como se había realizado en los dispositivos anteriores. El resultado se muestra en la siguiente gráfica:



Gráfica 11. Calibrado con fluoresceína para el dispositivo 4.

Como se puede observar el calibrado es correcto para el dispositivo modificado.

3.5.3. Reacción con aminas terciarias

Tras comprobar que el calibrado de la fluoresceína es bueno, se comenzó a trabajar con la reacción entre el colorante y las aminas terciarias. Se probaron diversos métodos:

- Variando los tiempos de iluminación desde un minuto hasta la media hora.
- Usando distintas concentraciones de amina terciaria desde 0,1 μM hasta 10 μM .
- Probando diferentes tipos de aminas terciarias como TEOA, heroína, morfina, etc.
- Cambiando los tiempos de desoxigenación de la muestra desde un minuto hasta la media hora usando argón o nitrógeno.

Ninguna de estas pruebas resultó satisfactoria. La única variable que restaba por investigar era el propio capilar de vidrio donde se hace produce la reacción. Tras estudiar esta opción, se llegó a la conclusión de que la geometría cilíndrica del tubo es lo que está impidiendo que la reacción se desarrolle correctamente. En la figura 153 que se muestra a continuación, se puede observar cómo la luz se refracta de forma que solo deja pasar una leve cantidad de luz a la disolución (insuficiente en este caso).

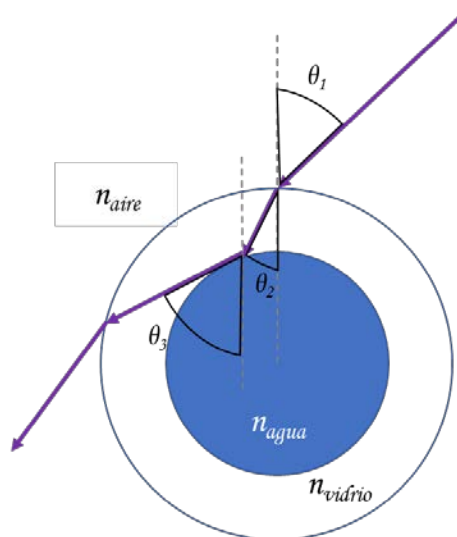


Figura 153. Refracción de la luz incidente en el capilar.

Para confirmar esta hipótesis se intenta crear un dispositivo que tenga una forma plana por donde la luz pueda incidir de forma perpendicular para que ilumine bien la reacción. Con material del laboratorio se construyeron diversos prototipos que emulaban esta descripción.

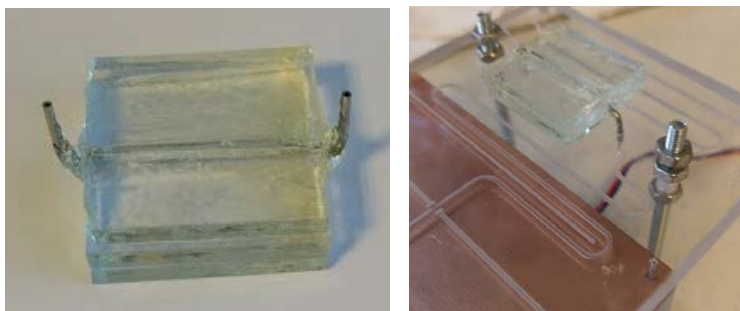


Figura 154. A la izquierda se muestra la pieza de vidrio construida pegando tres capas de vidrio. A la derecha está la pieza de vidrio montada en el dispositivo.

Debido a la presencia de microfugas en el recorrido de las placas selladas, la reacción no se produce. En última instancia se probó a realizar la reacción en una cubeta de metilmetacrilato y fabricar la misma pieza de este material en vez de vidrio, pero el resultado fue el mismo. Por este motivo se decidió comprar cubetas de volumen reducido (del orden de microlitros) que permitiesen llevar a cabo la reacción. El proveedor de las cubetas es la empresa HELIMA que confirmó el pedido de cubetas con diferente camino óptico y volúmenes.

3.5.4. Prueba con cubetas

En la siguiente figura se exponen las cubetas pedidas y utilizadas para el dispositivo.



Figura 155. Cubetas para el experimento en el cuarto dispositivo.

Una vez que se dispuso de las cubetas se procedió a adaptarlas al dispositivo. Para ajustar el tubo de la cubeta con la aguja de salida del dispositivo se usó cinta de teflón y por fuera se recubrió el tubo con parafilm como se puede apreciar en la figura 156. Se comprobó que no existieran fugas y se dispuso todo para iniciar el experimento. Se realizó un calibrado con

190 | Capítulo 3. Diseño de un sistema de microfluidos

diferentes concentraciones de amina terciaria, iluminando durante diez minutos por cada medición. El resultado es que la reacción funciona como se esperaba con lo que se concluye que este nuevo montaje es apto para realizar más experimentos con aminas terciarias.

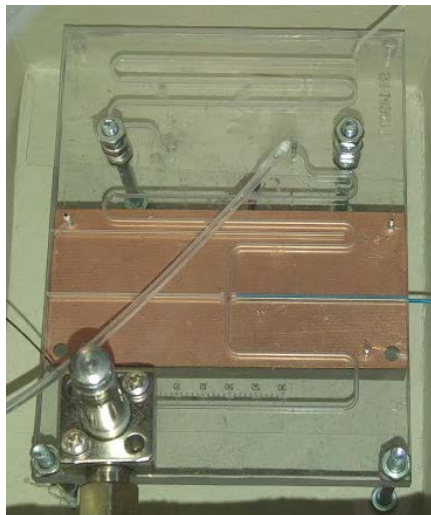
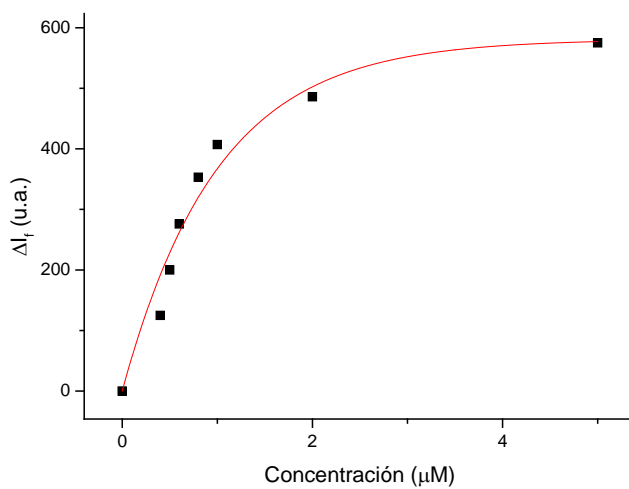


Figura 156. Unión del tubo de la cubeta con el dispositivo.

El resultado del calibrado se expone en la gráfica 12, observándose el ajuste con la ecuación utilizada en los capítulos anteriores.



Gráfica 12. Calibrado con distintas concentraciones de heroína.

Los resultados del ajuste son los que se encuentran en la tabla 1 a continuación utilizando la ecuación de ajuste vista en el capítulo anterior (ecuación 15).

Parámetro	Valor	Error
ΔA (u.a.)	580	40
B (M^{-1})	430000	60000

Tabla 40. Ajuste para el calibrado con eosina Y.

$$\Delta I_f = \Delta A(1 - 10^{-BC})$$

Ecuación 15. Ecuación de ajuste para el calibrado de heroína mediante eosina Y en el dispositivo.

La siguiente tabla recoge los resultados obtenidos para el análisis de las muestras de heroína incautadas por la policía que son las mismas que las del capítulo 2.

Muestra	ΔI_f (u.a.)	Concentración (μM)	Pureza neutra	Pureza sal	Pureza (%)	Pureza policía (%)
M1	426	1,32	0,264	0,303	30,3	17 ± 5
M2	310	0,76	0,153	0,175	17,5	16 ± 5
M3	279	0,65	0,131	0,150	15,0	13 ± 5
M4	473	1,68	0,336	0,386	38,6	54 ± 5

Tabla 41. Comparación de los resultados obtenidos con el dispositivo y los ofrecidos por la policía.

Estos resultados concuerdan con los obtenidos en el capítulo anterior de aplicaciones salvo para la muestra 1 con la que existe una discrepancia que no se ha analizado en profundidad.

En las siguientes fotografías de la figura 157 se puede observar el dispositivo funcional con el que se han realizado las medidas.

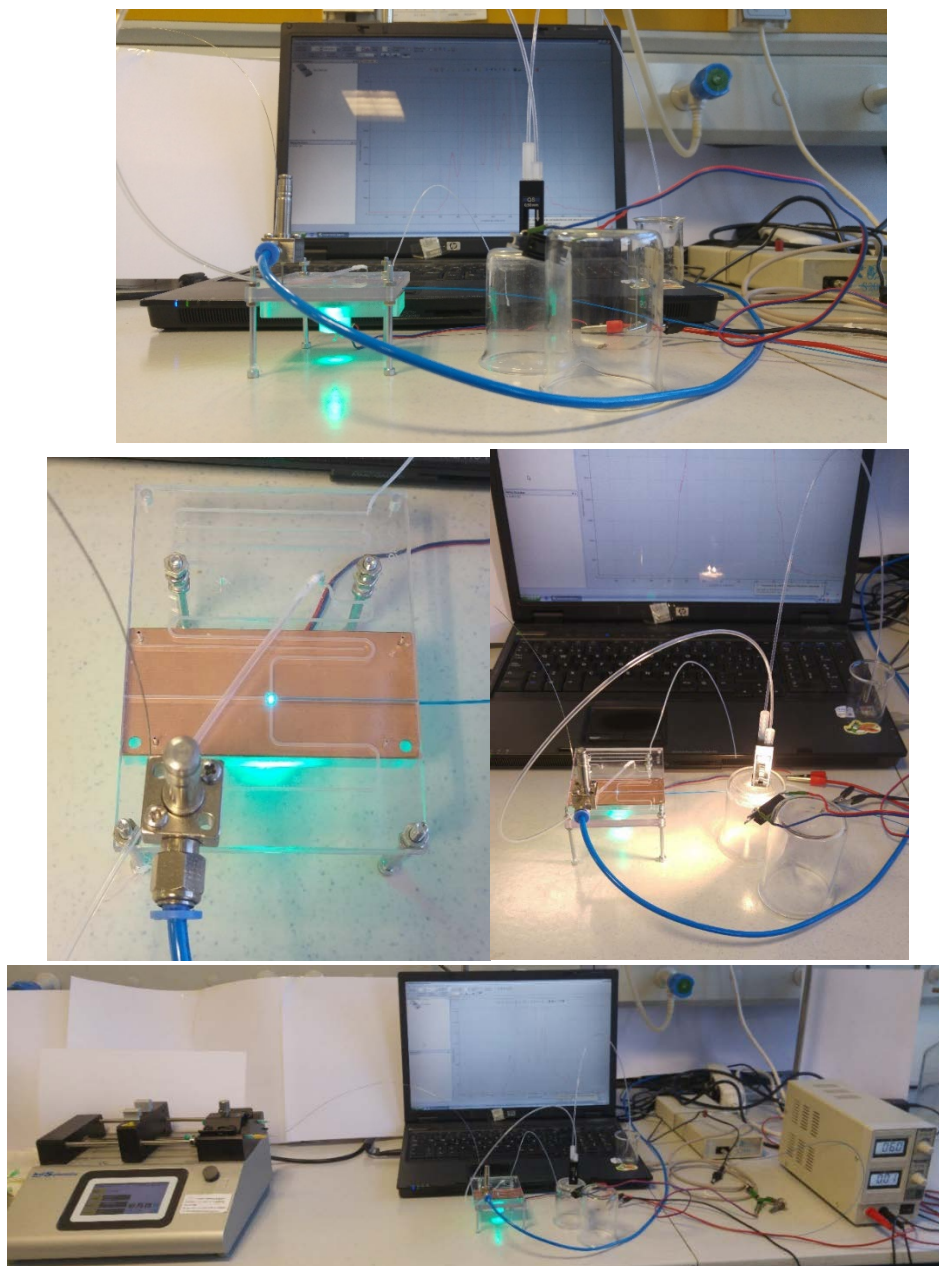


Figura 157. Fotografías del microdispositivo en funcionamiento con todo el equipamiento.

Como resultado de este trabajo se ha solicitado una patente para proteger el dispositivo: Dispositivo para determinación fluorimétrica de aminas terciarias (P201730530).

3.6. Experimentos futuros

Para experimentos posteriores se requiere un nuevo dispositivo en el que se adapte la cubeta perfectamente, un control mejor de la presión del gas de la fase móvil e investigar sobre el tema de la desoxigenación de la muestra.

3.7. Conclusión

Se ha conseguido diseñar y construir un dispositivo que después de varios obstáculos en su desarrollo, ha sido funcional. A pesar de estar en una fase temprana de desarrollo con muchas mejoras que implementar el dispositivo ya es capaz de detectar y cuantificar aminas terciarias mediante un calibrado anterior.

**CAPÍTULO 4. SÍNTESIS DE UNA SONDA
DE PERILENO COMO SENSOR DE
FULLERENOS.**

4. SÍNTESIS DE UNA SONDA DE PERILENO COMO SENSOR DE FULLERENOS.

4.1. Introducción

Los intereses de investigación del grupo en el que se ha realizado la presente tesis doctoral persiguen de un modo general el desarrollo de sensores capaces de detectar y determinar la presencia y la concentración de todo tipo de especies que puedan ser de interés por su interacción con las diferentes actividades de nuestra sociedad.

Durante la investigación del método de detección y determinación de aminas terciarias mediante exaltación de la fluorescencia descrito en el capítulo 1, se suscitó el interés en encontrar un método (diseñar y sintetizar una sonda) para la detección de fullerenos. Por ello buena parte de la investigación sobre el método y aplicaciones en el asunto de la detección de aminas terciarias se simultaneó con la búsqueda de sondas de detección de fullerenos.

En este capítulo se expone el diseño y síntesis de una sonda para detectar fullerenos. Para el diseño de la sonda se partió de la base del conocimiento previo existente sobre la existencia de interacciones dipolares y la complementariedad con los fullerenos debido a la concavidad de la molécula de coranuleno.¹⁰⁷ La estructura central se pensó como un derivado del perileno gracias a su gran fluorescencia, rendimiento cuántico y fotoestabilidad¹⁰⁸, y como sustituyentes de este, cuatro moléculas de coranuleno encargadas de interactuar con los fullerenos. La idea surgió al mezclar los conocimientos del grupo de investigación en síntesis de perilenos como sensores¹⁰⁹ y el conocimiento del funcionamiento de los coranulenos como coordinantes de fullerenos.¹

Se decidió entonces abordar la síntesis de la siguiente molécula esperando que pudiera comportarse como sensor de fullerenos. La molécula **PDI(Cor)₄** (figura 158) tiene un esqueleto de perileno diimida con cuatro extremidades de coranuleno. Parece justificado analizar con detalle los fragmentos perileno y coranuleno.

¹⁰⁷ Álvarez, C. M.; Aullón, G.; Barbero, H.; García-Escudero, L. a.; Martínez-Pérez, C.; Martín-Álvarez, J. M.; Miguel, D. *Org. Lett.* **2015**, *17* (11), 2578–2581.

¹⁰⁸ G. Geissler and H. Remy (Hoechst AG), Ger. Pat. Appl., DE 1130099, **1959** (*Chem. Abstr.*, **1962**, 57, P11346f).

¹⁰⁹ A) García-Calvo, J.; Ibeas, S.; Antón-García, E.-C.; Torroba, T.; González-Aguilar, G.; Antunes, W.; González-Lavado, E.; and Fanarraga, M. L. Potassium-Ion-Selective Fluorescent Sensors To Detect Cereulide, the Emetic Toxin of *B.cereus*, in Food Samples and HeLa Cells. *ChemistryOpen* **2017**. (Publicación aceptada). b) Soh, N.; Ueda, T. *Talanta* **2011**, *85* (3), 1233–1237.

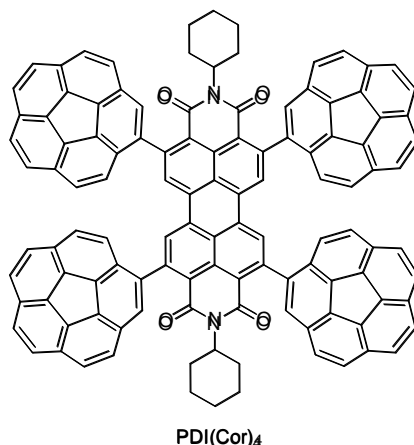
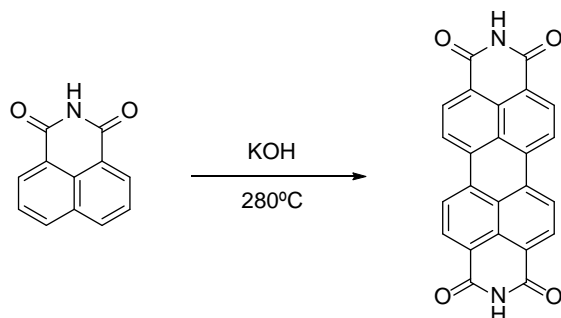


Figura 158. Sensor de fullerenos objetivo de este capítulo.

4.1.1. Perilenos

La molécula de perileno fue sintetizada por primera vez por Roland Scholl en 1910.¹¹⁰ Más tarde derivados de esta molécula de perileno fueron sintetizados y patentados por primera vez por Kardos como un colorante rojo. Esta síntesis la llevó a cabo calentando una mezcla de 1,8-naftaleno dicarboxiimida junto a KOH a una temperatura de 280°C. Como resultado obtuvo un perileno diimida como se puede ver en el esquema 15.¹¹¹



Esquema 15. Síntesis del primer perileno por Kardos.

En los años 1950 se comenzaron a comercializar estos pigmentos por la empresa estadounidense Harmon Colors.¹¹² Así por ejemplo tuvieron gran importancia los pigmentos rojos 149, 178 y 179 (figura159).

¹¹⁰ Scholl, R.; Seer, C.; Weitzenböck, R. *Berichte der Dtsch. Chem. Gesellschaft* **1910**, 43 (2), 2202–2209.

¹¹¹ Dieter A. Schluter; Craig Hawker; Junji Sakamoto; *Synthesis of Polymers: New Structures and Methods*, Volume 1 Chapter 13, Wiley-VCH. **2012**.

¹¹² Herbst, W.; Hunger, K. *Industrial Organic Pigments* (Segunda edición); Weinheim, **1997**.

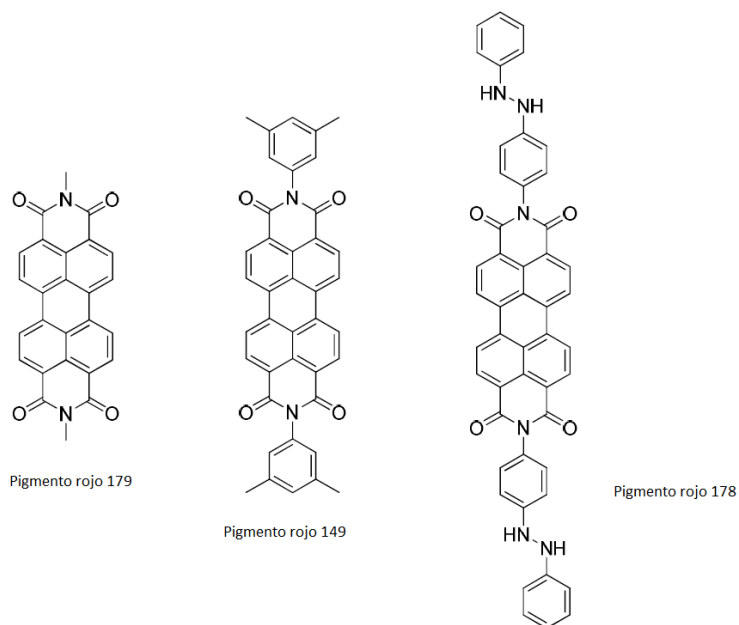
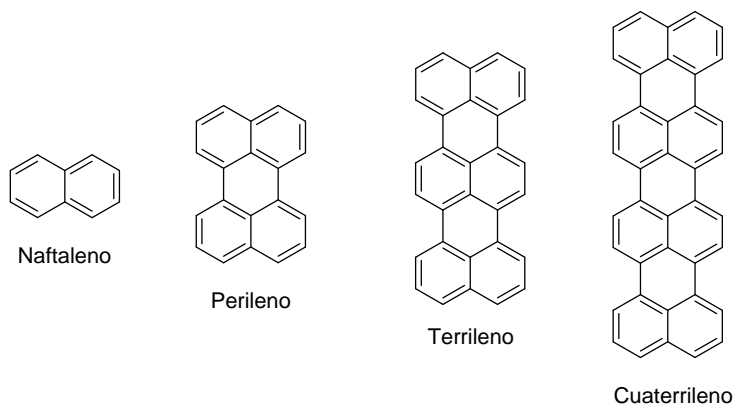


Figura 159. Estructuras químicas de tres de los PDI más utilizados como pigmentos en la industria.

Desde un punto de vista económico estos pigmentos son caros y solo son utilizados en aplicaciones de gran calidad y durabilidad de los colores como la industria del automóvil.^{111,113}

Los perilenos pertenecen a la familia de los rilenos, caracterizados por tener unidades de naftaleno unidos por las posiciones peri como se puede ver en el esquema 16.



Esquema 16. Ejemplo de compuestos de la familia de los rilenos.

¹¹³ Würthner, F. *Chem. Commun.* **2004**, 14, 1564–1579.

Centrándose en la molécula de perileno que es la base estructural que se usará para las síntesis de este sensor se pueden observar distintas posiciones de funcionalización como se puede ver en la figura 160.

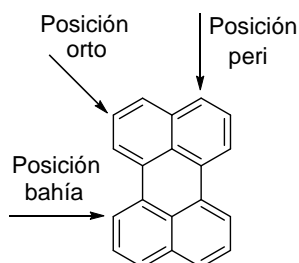


Figura 160. Posiciones de funcionalización para el perileno.

Estos compuestos tienen propiedades fotofísicas (absorbancia, fluorescencia, etc.) y electroquímicas muy interesantes.¹¹⁴ También tienen alta estabilidad térmica y química. Gracias a estas propiedades estos compuestos han sido muy utilizados por ejemplo, como colorantes de plásticos en el mundo del automóvil como ya se ha comentado anteriormente.¹¹⁵

La forma más común de derivatizar estos productos es creando el bis-anhídrido y posteriormente funcionalizando estas posiciones principalmente formando imidas como las mostradas en la figura 161. Esto proporciona un aumento de la solubilidad de estos compuestos y diversas propiedades diferentes. Los sustituyentes imida alteran en gran medida la solubilidad del compuesto formado ya que si las aminas introducidas son voluminosas se evita la aparición de agregados por la interacción de los anillos (π - π stacking).¹¹⁶

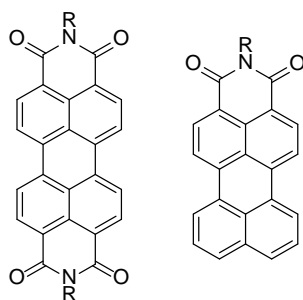


Figura 161. Ejemplo de perileno bis-imida a la izquierda y perileno mono-imida a la derecha.

¹¹⁴ Torres, É.; Berberan-Santos, M. N.; Brites, M. J. *Dye. Pigment.* **2015**, *112*, 298–304.

¹¹⁵ Harris, R.M. *Coloring Technology for Plastics*. Plastics Design Library. **1999**.

¹¹⁶ Balakrishnan, K.; Datar, A.; Naddo, T.; Huang, J.; Oitker, R.; Yen, M.; Zhao, J.; Zang, L. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128* (22), 7390–7398.

Los usos de estos compuestos derivados del perileno son muy diversos y algunos de ellos se exponen a continuación:

-Células fotovoltaicas:¹¹⁷ gracias a su estabilidad térmica y química, así como otras propiedades como los altos rendimientos cuánticos, estos compuestos son idóneos para construir células solares.

-Sensores químicos:¹¹⁸ las propiedades de fluorescencia y absorbancia de estos compuestos los hacen ser muy útiles en este tipo de aplicaciones como cromóforos o fluoróforos.

-LED (Light Emitting Diode):¹¹⁹ por sus propiedades fluorescentes y electrónicas estos compuestos pueden funcionar como diodos emisores de luz.

-Filtros de colores en pantallas LCD:¹²⁰ las propiedades de absorbancia y las distintas solubilidades al modificar los grupos de estas moléculas confieren utilidad en este campo de aplicación.

4.1.2. Fullerenos

Los fullerenos son moléculas compuestas de átomos de carbono con una forma alotrópica distinta al grafito o al diamante como se puede ver en la figura 162. Estos fueron generados por primera vez por Kroto et al. en 1985¹²¹ y sus autores ganaron el premio nobel de química por este hecho en 1996. Más tarde se descubrió que estas moléculas también se producen en las combustiones de hidrocarburos como las de los vehículos y están presentes en el hollín.¹²² También han sido encontradas estas moléculas en el espacio o producidas por descargas eléctricas en la atmósfera.

¹¹⁷ A) Kotowski, D.; Luzzati, S.; Scavia, G.; Cavazzini, M.; Bossi, A.; Catellani, M.; Kozma, E. *Dye. Pigment.* **2015**, *120*, 57–64. b) Kozma, E.; Catellani, M. *Dye. Pigment.* **2013**, *98* (1), 160–179. c) Li, C.; Wonneberger, H. *Adv. Mater.* **2012**, *24* (5), 613–636.

¹¹⁸ A) Hariharan, P. S.; Pitchaimani, J.; Madhu, V.; Anthony, S. P. **2016**, 395–401. b) Wang, H.; Lang, Y.; Wang, H.; Lou, J.; Guo, H.; Li, X. *Tetrahedron* **2014**, *70* (11), 1997–2002.

¹¹⁹ Kozma, E.; Mróz, W.; Galeotti, F. *Dye. Pigment.* **2015**, *114* (C), 138–143.

¹²⁰ Kim, J. Y.; Choi, J.; Namgoong, J. W.; Kim, S. H.; Sakong, C.; Yuk, S. B.; Choi, S.; Lee, W.; Kim, J. P. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **2015**, *82* (1–2), 203–212.

¹²¹ Kroto, H. W.; Heath, J. R.; O'Brien, S. C.; Curl, R. F.; Smalley, R. E. *Nature* **1985**, *318* (6042), 162–163.

¹²² Howard, J. B.; McKinnon, J. T.; Makarovskiy, Y.; Lafleur, A. L.; Johnson, M. E. *Nature* **1991**, *352* (6331), 139–141.

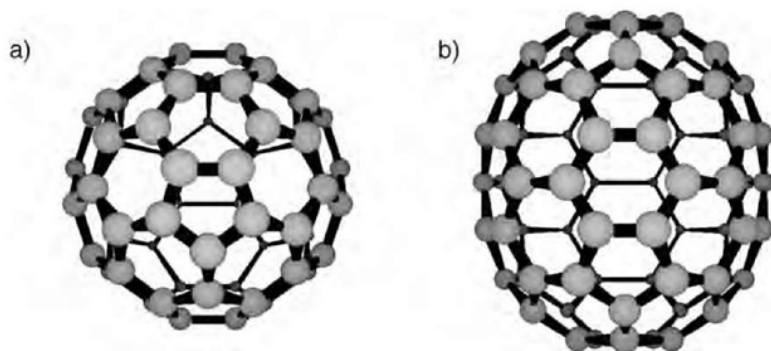


Figura 162. Dos de las moléculas de fullerenos más comunes: a) C_{60} y b) C_{70} .

Las propiedades de los fullerenos¹²³, y en especial del C_{60} , permiten su uso en diferentes aplicaciones médicas:¹²⁴

-Actividad antivírica: han demostrado ser eficaces en el tratamiento del VIH.

-Fotosensibilizadores: son capaces de producir oxígeno singlete para usar en terapias fotodinámicas.

-Actividad antioxidante: debido a su gran número de dobles enlaces conjugados son capaces de retirar múltiples radicales libres del entorno.

-Distribución de fármacos y biomoléculas: los fullerenos pueden ser modificados y atravesar las membranas de la célula para introducir fármacos en su interior.

-Aplicaciones de diagnóstico: estas moléculas pueden albergar en su interior átomos y moléculas radiactivas, por ejemplo.

Otras aplicaciones de los fullerenos son: componente de células solares¹²⁵, almacenamiento de gases como hidrógeno¹²⁶, aditivos de refuerzo en distintos materiales¹²⁷, etc.

¹²³ Jensen, A. W.; Wilson, S. R.; Schuster, D. I. *Bioorg. Med. Chem.* **1996**, 4 (6), 767–779.

¹²⁴ Bakry, R; Vallant, R.M; Najam-ul-Haq, M; Rainer, M; Szabo, Z; Huck, C.W; Bonn, G.K. *International Journal of Nanomedicine.* **2007**, 2(4) 639–649.

¹²⁵ Thompson, B. C.; Fréchet, J. M. J. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2008**, 47 (1), 58–77.

¹²⁶ Thornton, A. W.; Nairn, K. M.; Hill, J. M.; Hill, A. J.; Hill, M. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131 (30), 10662–10669.

¹²⁷ Choi, K.; Seo, J.; Bae, D.; Choi, H. *Trans. Nonferrous Met. Soc. China* **2014**, 24 (SUPPL. 1), s47–s52.

También se está estudiando la toxicidad de estas moléculas¹²⁸ para conocer los riesgos en la salud humana.

Por otro lado, el coranuleno (figura 163) puede considerarse una parte del C₆₀.¹²⁹ Como se ha dicho anteriormente en la parte de introducción de este capítulo interacciona con el C₆₀ gracias a su forma curvada y se usará con este fin.

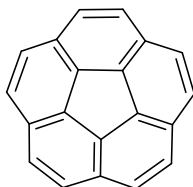
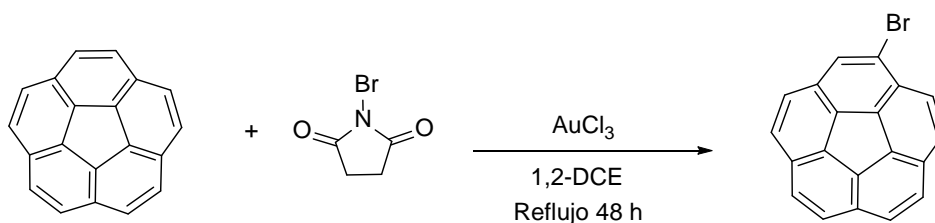


Figura 163. Estructura del coranuleno o también llamado [5]circuleno.

4.2. Síntesis de la sonda PDI(Cor)₄ para la detección de fullerenos

La síntesis de esta molécula consta de dos partes, la primera es la bromación del coranuleno y la segunda la síntesis del perileno con los cuatro grupos con boro. Una vez se tienen estos dos compuestos se procede al paso final que es la reacción entre ellos para formar el sensor de PDI(Cor)₄.

La síntesis del sensor entonces, se inició partiendo de la molécula de coranuleno. La primera etapa consistió en la bromación de este compuesto para obtener bromocoranuleno mediante el uso de N-bromo succinimida y AuCl₃ como catalizador¹³⁰ como se muestra en el esquema 17.



Esquema 17. Síntesis del bromo coranuleno.

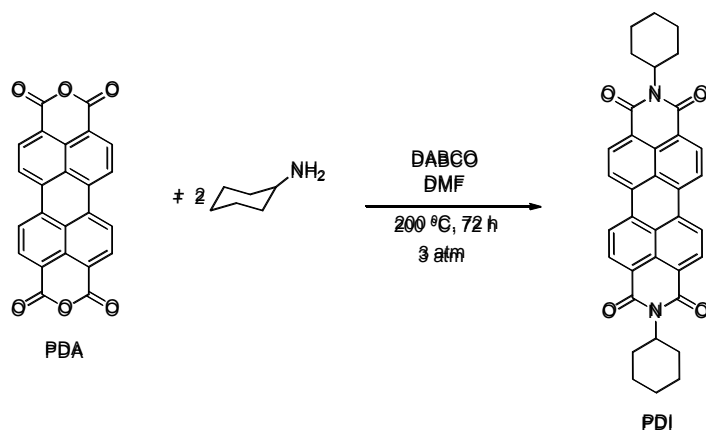
¹²⁸ Aschberger, K.; Johnston, H. J.; Stone, V.; Aitken, R. J.; Tran, C. L.; Hankin, S. M.; Peters, S. A. K.; Christensen, F. M. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **2010**, 58 (3), 455–473.

¹²⁹ Wu, Y.-T.; Siegel, J. S. *Chem. Rev.* **2006**, 106 (12), 4843–4867.

¹³⁰ Mo, F.; Yan, J. M.; Qiu, D.; Li, F.; Zhang, Y.; Wang, J. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2010**, 49 (11), 2028–2032.

204 | Capítulo 4. Síntesis de una sonda de perileno como sensor de fullerenos

El otro fragmento de la molécula final que se desea obtener es el perileno diimida. En primer lugar, se hizo reaccionar perileno con dos aminas primarias para conseguir el perileno diimida (PDI) como se puede ver en el esquema 18. Se usó el reactor que se muestra en la figura 164.



Esquema 18. Síntesis del PDI.

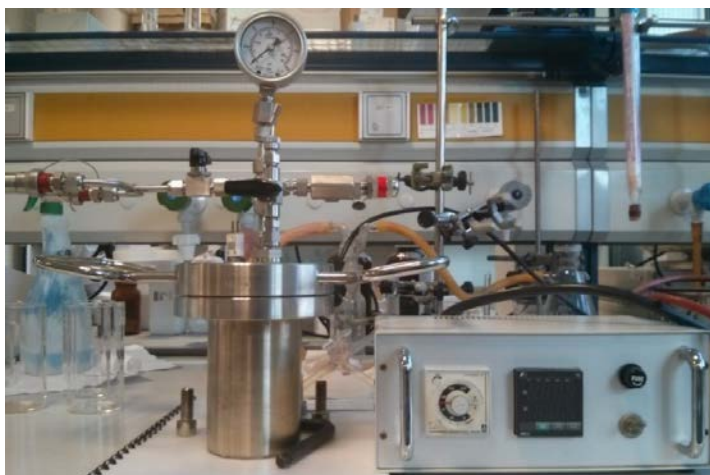


Figura 164. Reactor usado para la síntesis de PDI.

La siguiente síntesis para formar el tetra pinacolato de boro del PDI (esquema 19) se probó con varios catalizadores y ligandos como el $\text{RuH}_2(\text{CO})(\text{PPh}_3)_3$ con mesileno y pinacolona¹³¹ pero el que mejor resultado dio fue con el catalizador de iridio.¹³²

¹³¹ Zhang, J.; Singh, S.; Hwang, D. K.; Barlow, S.; Kippelen, B.; Marder, S. R. *J. Mater. Chem. C* **2013**, *1* (33), 5093.

¹³² Teraoka, T.; Hiroto, S.; Shinokubo, H. *Org. Lett.* **2011**, *13* (10), 2532–2535.

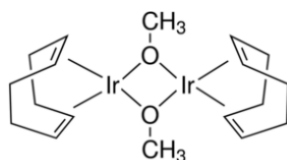
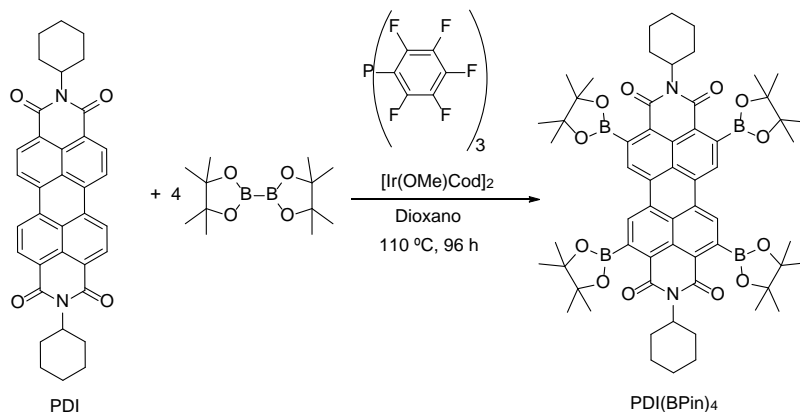
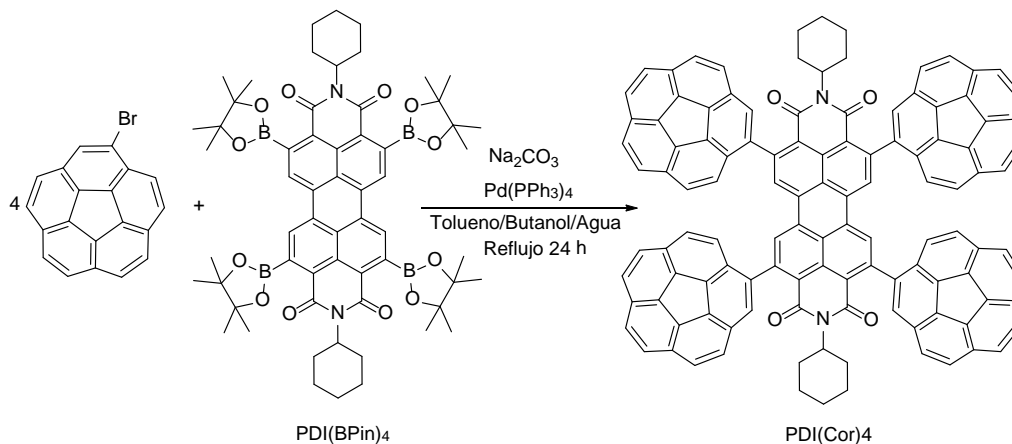


Figura 165. Catalizador de Ir utilizado para la síntesis del derivado borilado del PDI.



Esquema 19. Síntesis del PDI borilado.

La última parte de la reacción consistió en hacer reaccionar el bromocoranuleno sintetizado con el derivado del perileno borilado. Esto se llevó a cabo mediante una reacción de acoplamiento de Suzuki con catalizador de paladio como se puede observar en el esquema 20.



Esquema 20. Síntesis del PDI tetracoranuleno.

4.3. Pruebas de detección de fullerenos

Para comprobar si los fullerenos interaccionaban con el compuesto sintetizado PDI(Cor)₄ se procedió a realizar diferentes experimentos. Esto se hizo de dos formas, mediante experimentos de resonancia magnética nuclear y por experimentos de fluorescencia. Estos experimentos fueron llevados a cabo en tolueno como disolvente, tanto los experimentos por RMN como los de fluorescencia, ya que el C₆₀ es poco soluble en la mayoría de disolventes y en este tiene mayor solubilidad.¹³³ Los estudios por RMN fueron realizados en la Universidad de Valladolid.

4.3.1. Estudios por RMN

Este estudio se basa en el desplazamiento de alguna señal en el espectro de RMN del sensor PDI(Cor)₄ al interaccionar con el analito de interés. Teniendo en cuenta este desplazamiento y las concentraciones añadidas se puede conocer la constante de equilibrio de la formación de esta interacción.

Antes de este estudio se procedió a hacer un estudio Job plot para conocer la estequiometría de la especie formada entre el sensor y el analito. El análisis puede observarse en la siguiente figura.

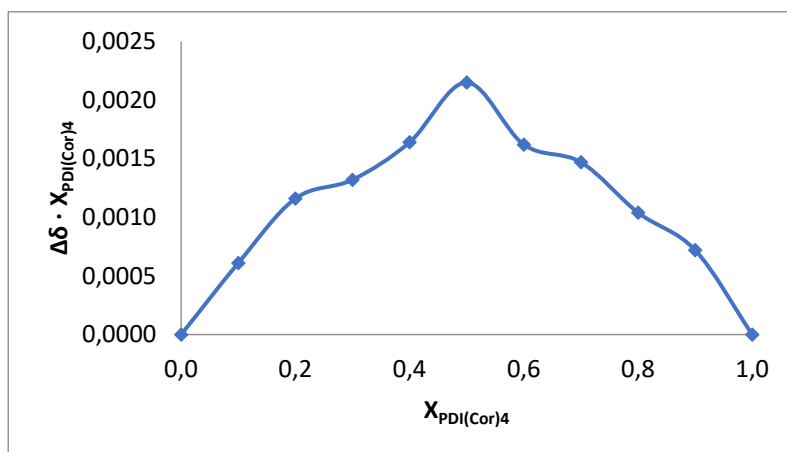


Figura 166. Estudio Job plot de la interacción del C₆₀ con el sensor PDI(Cor)₄

El resultado de este análisis es que el sensor y el C₆₀ tienen una estequiometría de asociación de 1:1. De todas formas este estudio es de poco valor ya que como se demuestra en

¹³³ Ruoff, R. S.; Tse, D. S.; Malhotra, R.; Lorents, D. C. *J. Phys. Chem.* **1993**, 97 (13), 3379–3383.

esta publicación de Hibbert y Thordarson¹³⁴ este análisis para determinar la estequiometría de asociación en estos casos es ineficaz y solo cuando los valores de las constantes de asociación son altas, son acertados estos estudios. La propuesta de estos autores recae en la prueba de ajuste de los datos de la valoración para distintas proporciones. Esto quiere decir que se debe intentar ajustar los resultados obtenidos en la valoración sensor:analito a las diferentes proporciones 1:1, 1:2, 1:3, etc. Así comprobando la que mejores resultados ofrezca será el ajuste que muestre la estequiometría sensor:analito.

Por todo esto se procedió a realizar las valoraciones con fullerenos. Estas valoraciones fueron realizadas con una concentración de sonda PDI(Cor)₄ de 10 μM sobre la que se fue añadiendo cantidades crecientes de fullereno. Como se ha dicho antes todos estos experimentos fueron hechos en tolueno como disolvente. La figura 167 muestra el resultado de varias adiciones de C₆₀ y como la señal que aparece a 7,74 ppm se va desplazando hasta llegar a casi 7,80 ppm.

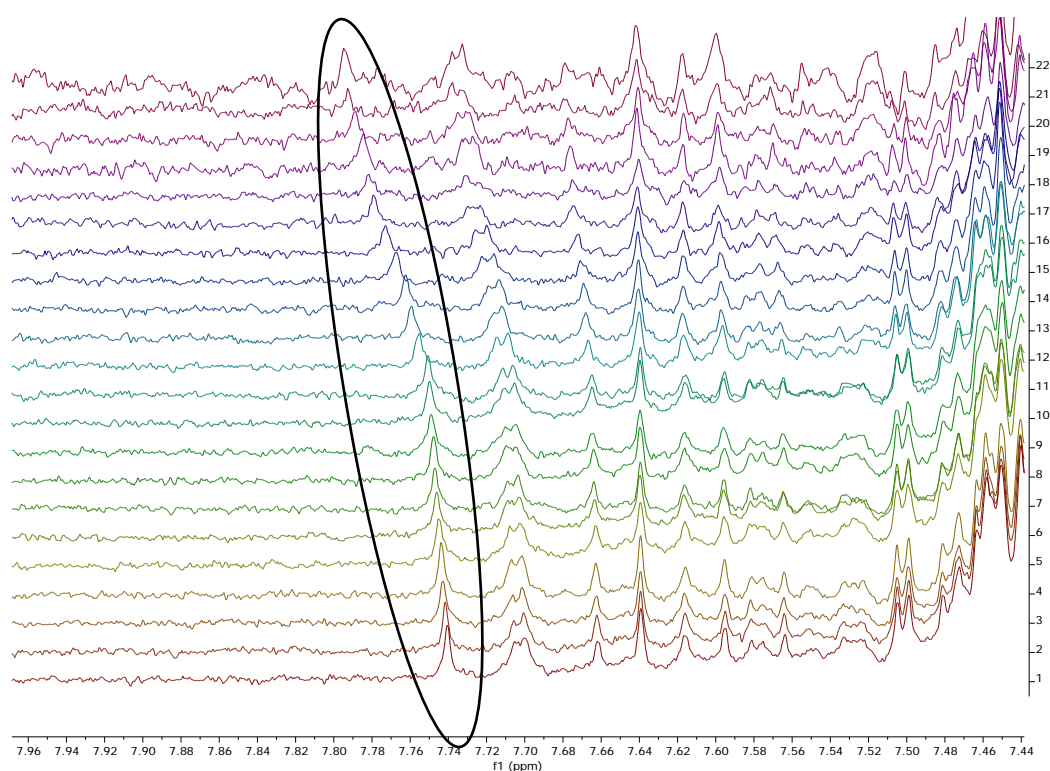


Figura 167. Valoración de la sonda PDI(Cor)₄ con C₆₀ donde cada espectro muestra una adición de fullereno.

Representando la concentración de fullereno frente al desplazamiento de la señal en RMN se obtiene una gráfica es la que se debe ajustar a las diferentes proporciones de

¹³⁴ Brynn Hibbert, D.; Thordarson, P. *Chem. Commun.* **2016**, 52 (87), 12792–12805.

estequiometría y así hallar la constante de asociación. Las ecuaciones de ajuste correspondientes a cada estequiometría se encuentran en el apartado de parte experimental de esta tesis. Con estos datos obtenidos se llegó a la conclusión de que la asociación era 1:1 puesto que los valores de las constantes obtenidos para otras proporciones estequiométricas no eran razonables (valores negativos o una constante demasiado grande y otra muy pequeña).

Los resultados de las constantes de asociación obtenidas fueron:

$$K_{C60} = 1000 \pm 17 \text{ M}^{-1}$$

$$K_{C70} = 1070 \pm 9 \text{ M}^{-1}$$

Estas constantes del orden de 10^3 M^{-1} no son muy altas por lo que se puede pensar que la interacción entre los fullerenos y el sensor no es muy grande.

4.3.2. Estudios por fluorescencia

Este estudio se basa en el cambio de alguna señal en el espectro de fluorescencia del sensor al interactuar con el analito de interés. Teniendo en cuenta este desplazamiento y las concentraciones añadidas se puede conocer la constante de equilibrio de la formación de esta interacción.

Lo primero que se realizó fueron los espectros de absorción (figura 168) y fluorescencia (figura 169) del compuesto para comprobar a qué longitudes de onda absorbía y emitía. También se realizó un calibrado para comprobar a qué concentraciones se podía trabajar y se comprobó que a concentraciones del orden de 10^{-4} M no era lineal el comportamiento, lo que indicaba que se producían apilamientos entre las moléculas.

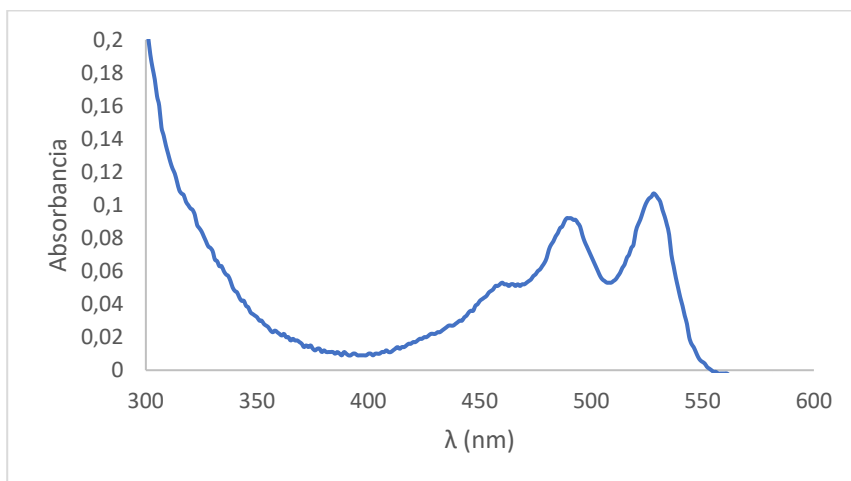


Figura 168. Espectro de absorción del sensor PDI(Cor)₄ 7,8 μM.

Con los datos de estos espectros de absorción a diferentes concentraciones se calcularon los diferentes coeficientes de absorción molar para los tres máximos encontrados.

$$\epsilon_{460} = 7868 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$$

$$\epsilon_{491} = 13360 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$$

$$\epsilon_{528} = 15269 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$$

Se comprobó también que el máximo de excitación se encontraba a una longitud de onda de 478 nm, lo que se utilizó para recoger el espectro de fluorescencia.

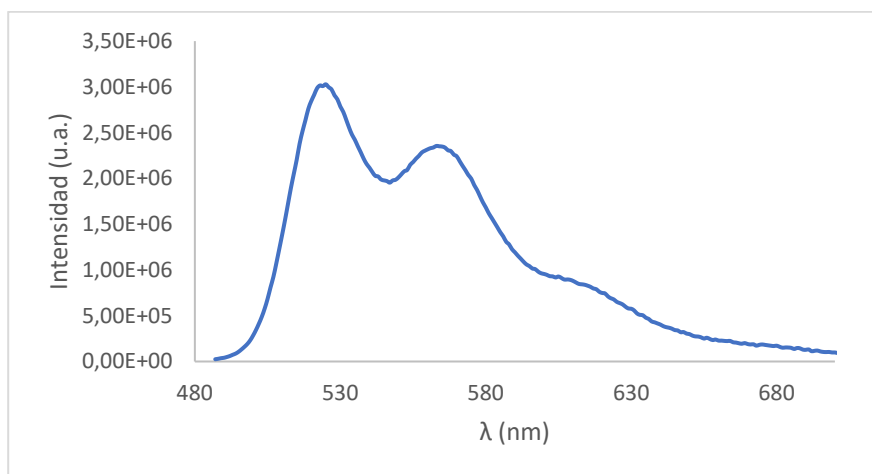


Figura 169. Espectro de fluorescencia para el sensor PDI(Cor)₄ 7,8 μM.

Se calculó el tiempo de vida para el sensor PDI(Cor)₄. $\tau = 4,71 \text{ ns}$. $\chi^2=1,087$.

El rendimiento cuántico calculado para el sensor fue de $\phi = 0,55$, realizado con ayuda de una esfera integradora, lo cual se detalla mejor en la parte experimental de esta tesis.

Después de conocer estos datos, se llevó a cabo una valoración del sensor PDI(Cor)₄ con C₆₀. A una disolución en una cubeta del sensor se le fueron añadiendo concentraciones crecientes de C₆₀ y se observó cómo disminuía la intensidad de fluorescencia como se puede observar en la gráfica de la figura 170 por lo que estamos ante una sonda de tipo on-off.

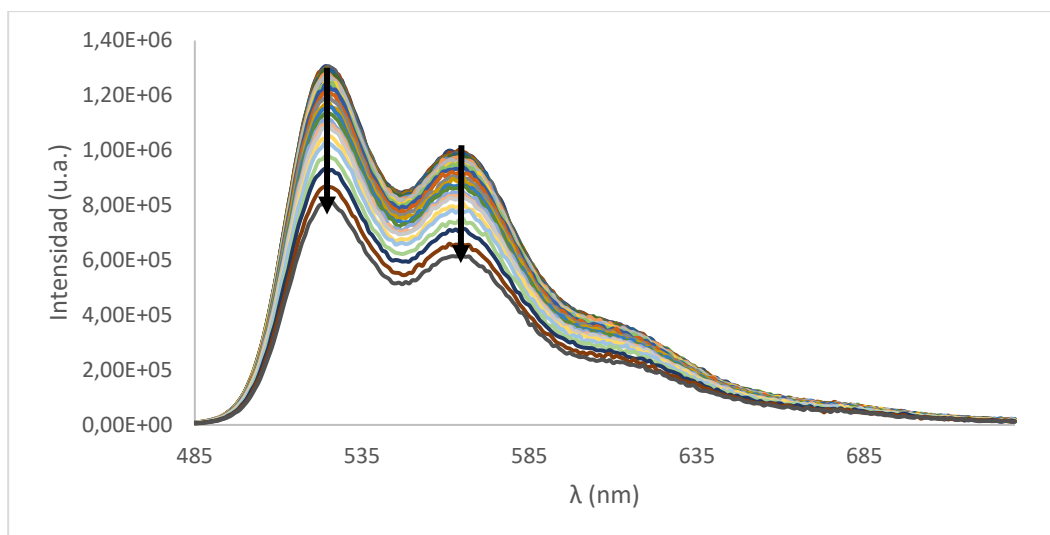


Figura 170. Valoración del sensor PDI(Cor)₄ con C₆₀ mediante múltiples adiciones.

Al ajustar estos valores de intensidad de fluorescencia de una de las longitudes de onda a la que se encuentra un máximo, a la ecuación de ajuste de asociación 1:1 (ver parte experimental) se obtiene la gráfica de la figura 171. Las otras ecuaciones de ajuste vuelven a dar el mismo problema que el visto anteriormente con el estudio por RMN.

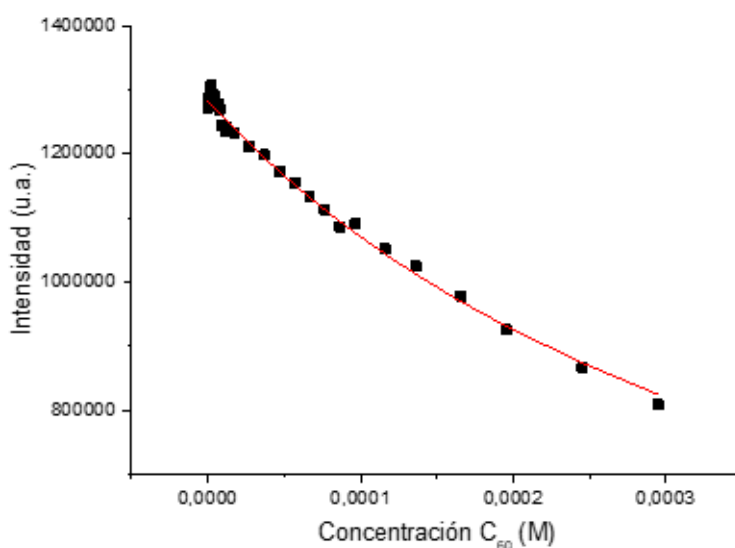


Figura 171. Ajuste de la valoración a una curva cuya ecuación deriva de la complejación 1:1

Con este ajuste se obtiene el valor de la constante de asociación que es $K = 2350 \pm 80 \text{ M}^{-1}$. No se trata de un valor muy grande, del orden de 10^3 M^{-1} por lo que se puede deducir que la asociación no es muy fuerte. El valor no coincide exactamente con el obtenido por RMN, pero es del mismo orden de magnitud. Esto se debe a las diferentes sensibilidades de cada método y las particularidades.

4.4. Cálculos mecanocuánticos sobre la interacción de la sonda con el C_{60}

Este estudio se realizó para apoyar los resultados obtenidos en las valoraciones con el C_{60} . Se quiere comprobar que estos cálculos ayudan a comprender los resultados mediante los parámetros energéticos y estructurales de la molécula formada mediante la interacción del $\text{PDI}(\text{Cor})_4$ y el C_{60} .

Los cálculos DFT se llevaron a cabo con la revisión D.01 de Gaussian 09,⁴⁵ utilizando el funcional de intercambio-correlación M062X¹³⁵ junto con juegos de bases 6-31G(d). Se optimizaron las geometrías de los estados fundamentales (S_0) y de los estados de transición además de los cationes radicales. Todos los cálculos se llevaron a cabo en fase gas a 1 atm y 298 K.

Lo primero fue calcular la geometría para la molécula de $\text{PDI}(\text{Cor})_4$ libre con menor energía. Para ello se optimizó la geometría de las distintas conformaciones de esta molécula, las cuales se resumen en la figura 172. Después se calcularon también las diferentes estructuras para el sensor al interaccionar con un C_{60} o dos de ellos. Con estos datos se calcularon las diferentes energías de las distintas estructuras del sensor y del C_{60} como se irá viendo en los siguientes apartados.

¹³⁵ Zhao, Y.; Truhlar, D. G. *Theor. Chem. Acc.* **2008**, *120* (1–3), 215–241.

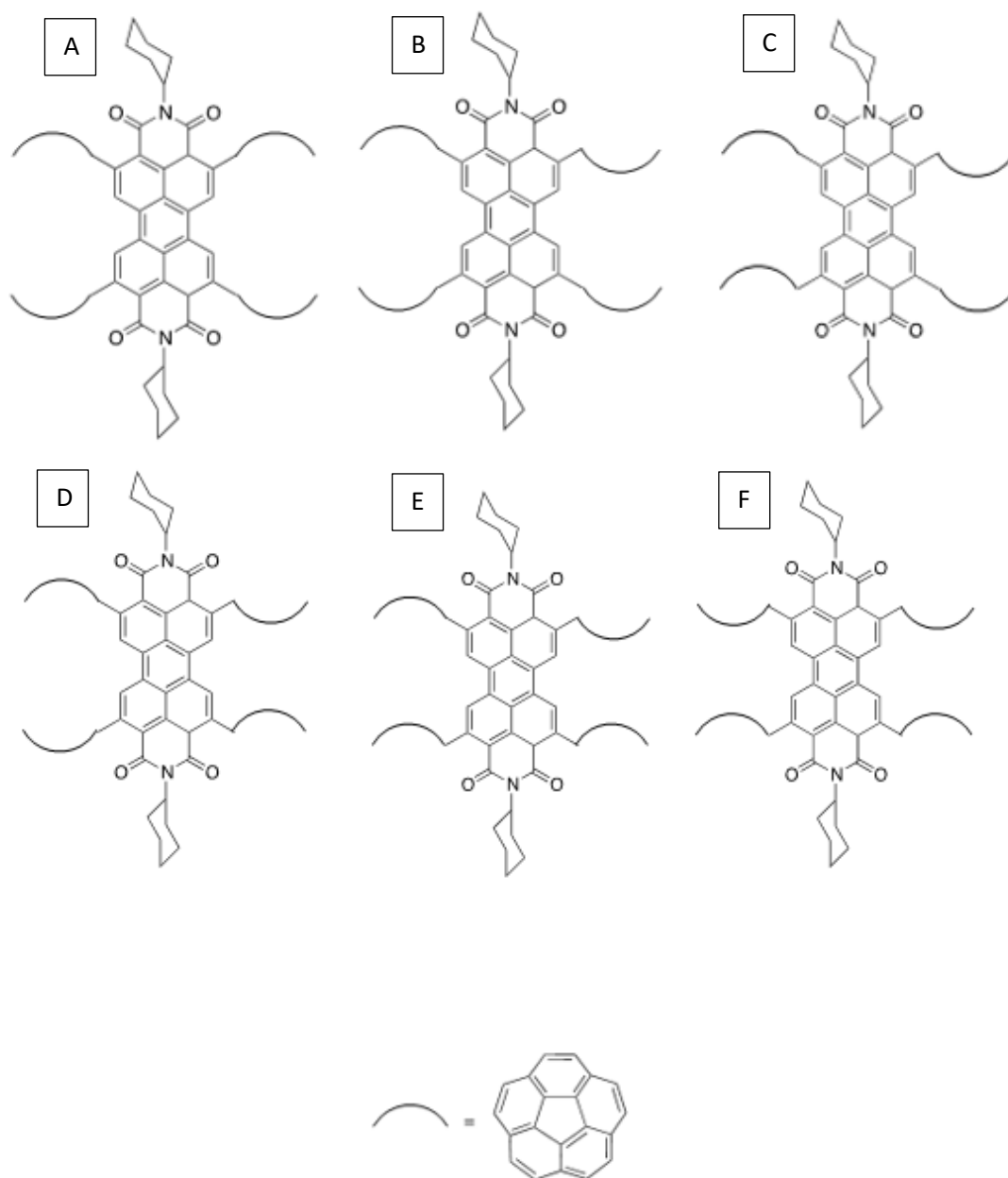


Figura 172. Distintas estructuras para la molécula de PDI(Cor)₄.

4.4.1. Estructura A

En esta estructura se encuentran los coranuleno en la mejor posición para albergar los C_{60} ya que la disposición de estos es la adecuada para la interacción como si fueran unas pinzas. Al realizar los cálculos parece que salen dos estructuras estables diferentes que se exponen a continuación como figuras 173 y 174.

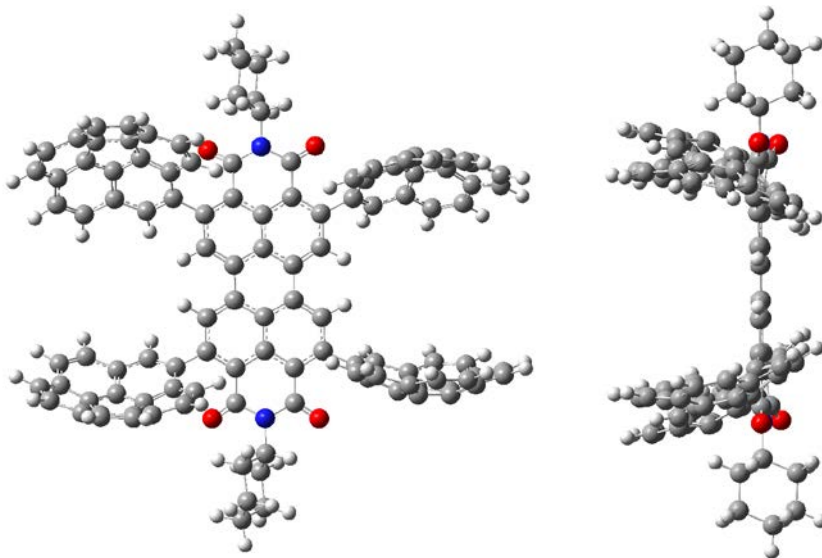


Figura 173. Estructura A1.

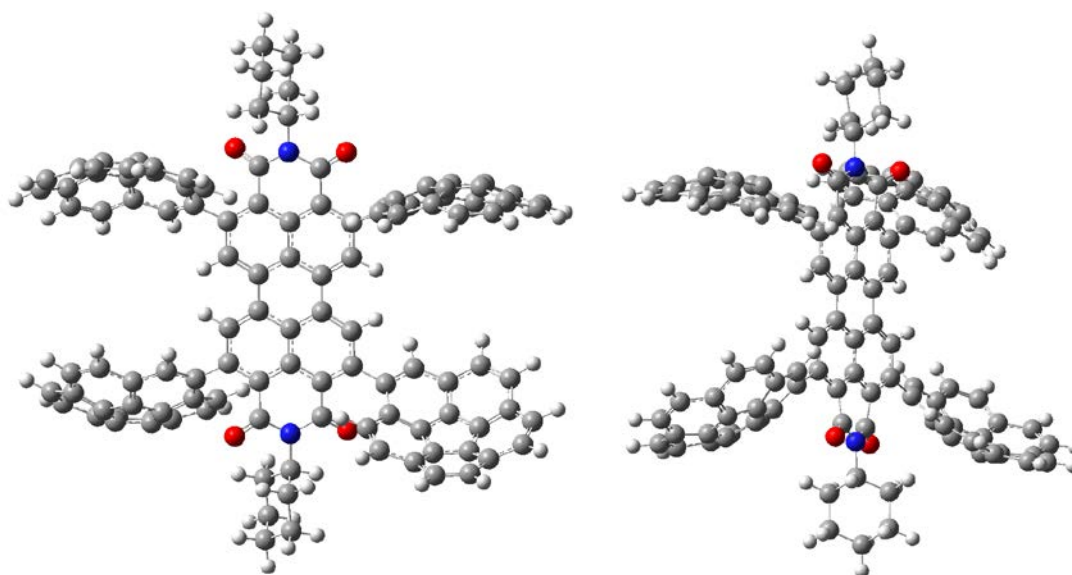


Figura 174. Estructura A2.

214 | Capítulo 4. Síntesis de una sonda de perileno como sensor de fullerenos

La diferencia en estas dos estructuras reside en que en A2 uno de los coranulenos se encuentra parcialmente girado poniéndose paralelo al que forma la pinza con él.

4.4.2. Estructura B

Esta estructura se diferencia de A en que un coranuleno de los 4 está girado 180°.

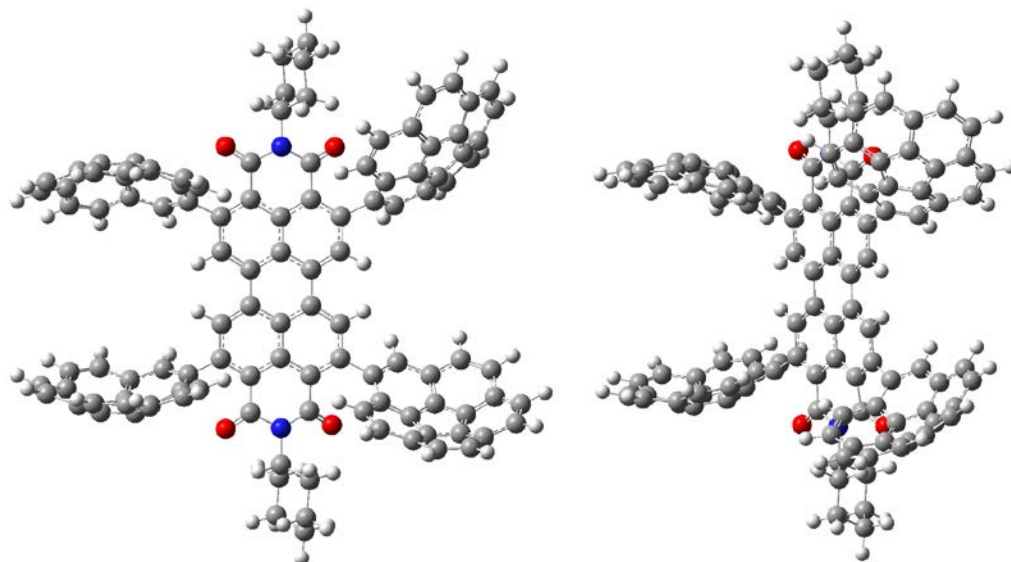


Figura 175. Estructura B

4.4.3. Estructura C

En este caso los coranulenos están dos coranulenos de un lateral del perileno orientados hacia un lado y los otros dos en la dirección opuesta.

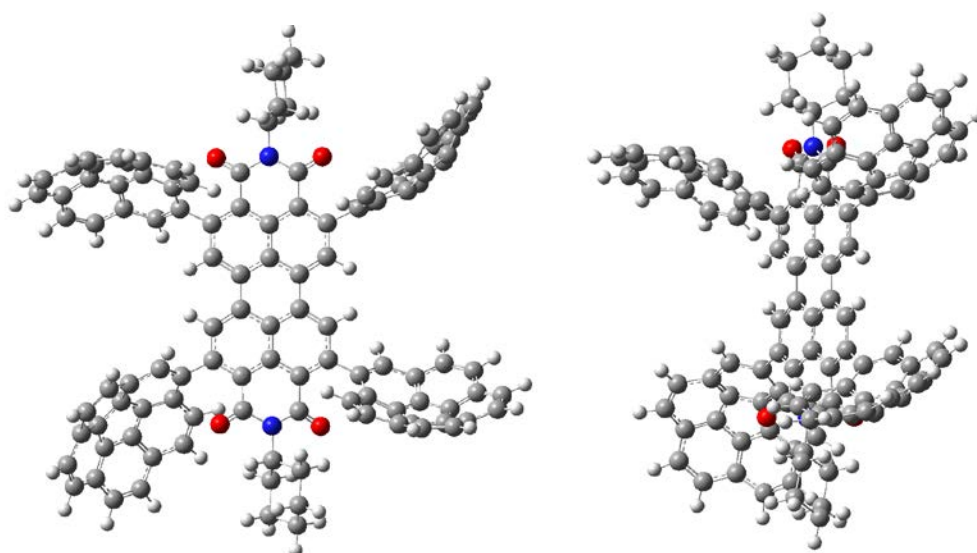


Figura 176. Estructura C

4.4.4. Estructura D

En esta estructura dos coranulenos están en forma de pinza y los otros dos cada uno orientado en una dirección.

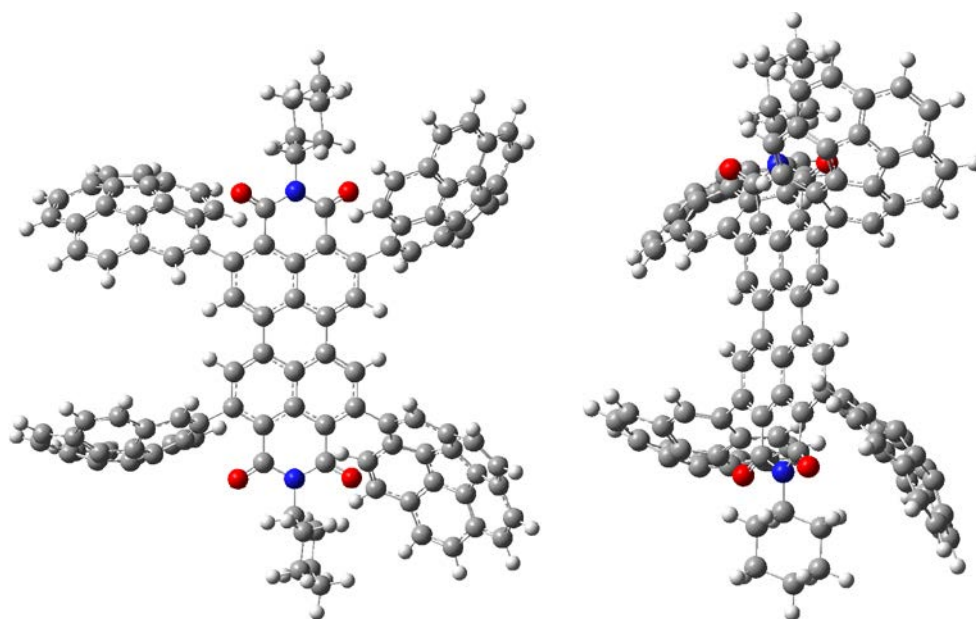


Figura 177. Estructura D

4.4.5. Estructura E

Esta estructura es como la estructura C, pero con uno de los coranulenos que estaba formando la pinza girado 180°.

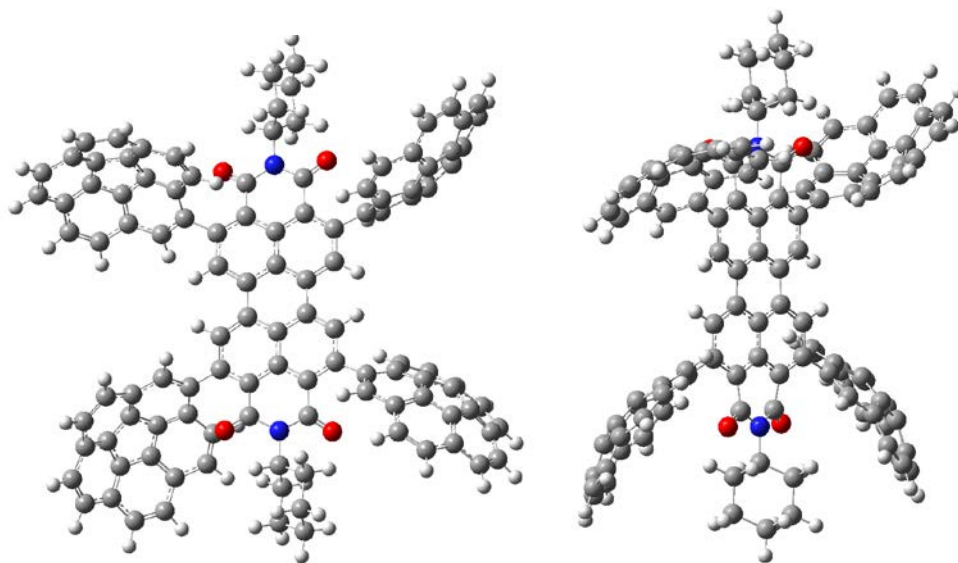


Figura 178. Estructura E.

4.4.6. Estructura F

Este es el caso opuesto a la estructura A donde los coranulenos están en la peor disposición para alojar los fullerenos.

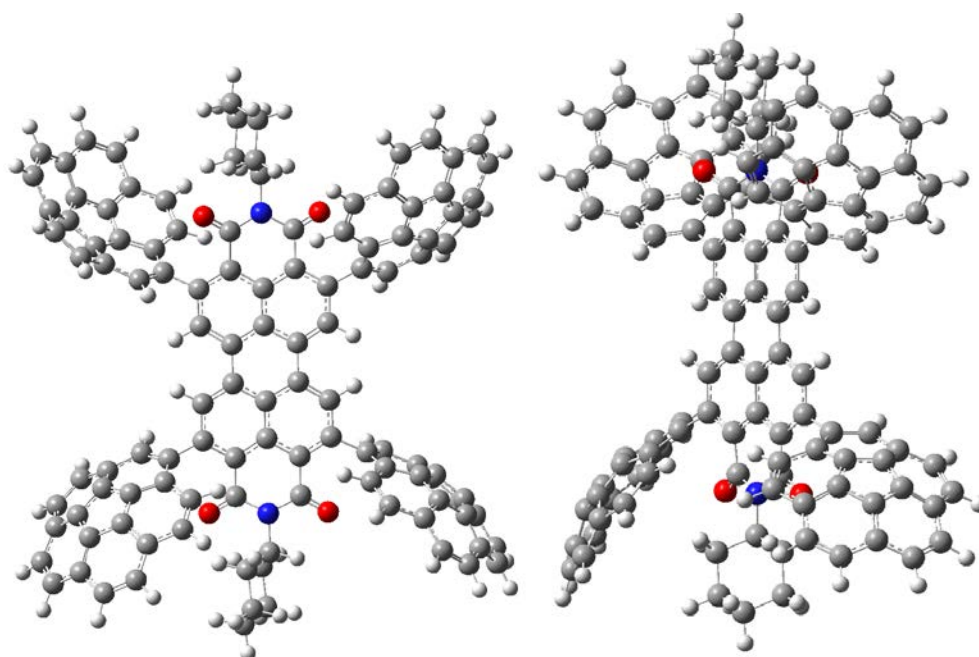


Figura 179. Estructura F.

4.4.7. Estructuras con C₆₀

En este apartado se reflejan las figuras obtenidas con los cálculos de las configuraciones estructurales del sensor al interactuar con un C₆₀ y con dos de ellos. Se puede observar como al interactuar con uno o dos moléculas de C₆₀ el perileno se dobla, saliéndose de su configuración plana normal.

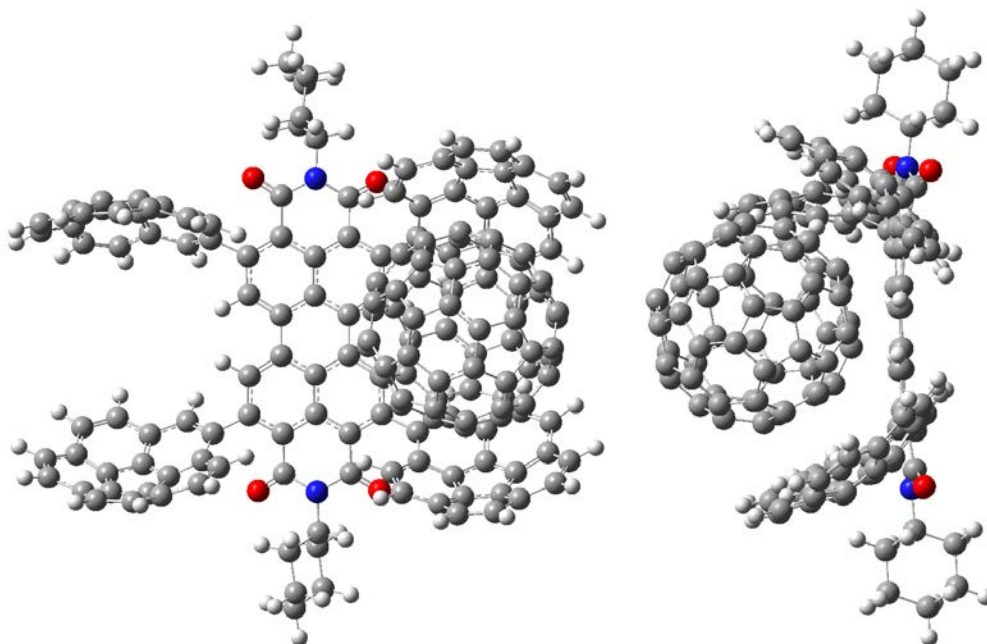


Figura 180. Estructura del sensor con un C_{60} .

La siguiente figura muestra el sensor interactuando con dos C_{60} por caras contrarias del perileno y se le ha denominado estructura “trans”.

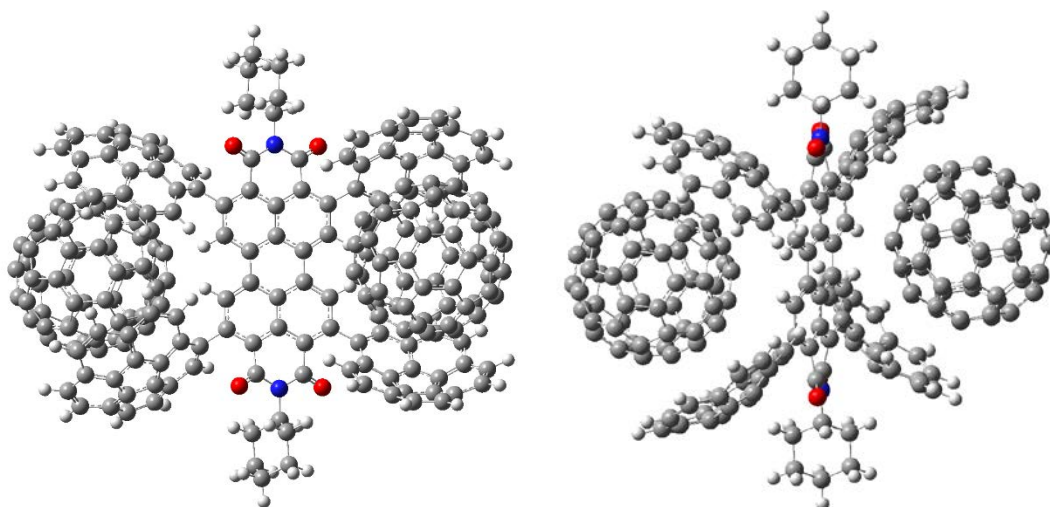


Figura 181. Estructura del sensor con dos C_{60} en “trans”

En la siguiente figura se encuentra la otra posibilidad de asociación con dos C₆₀ a la que se ha denominado “cis”.

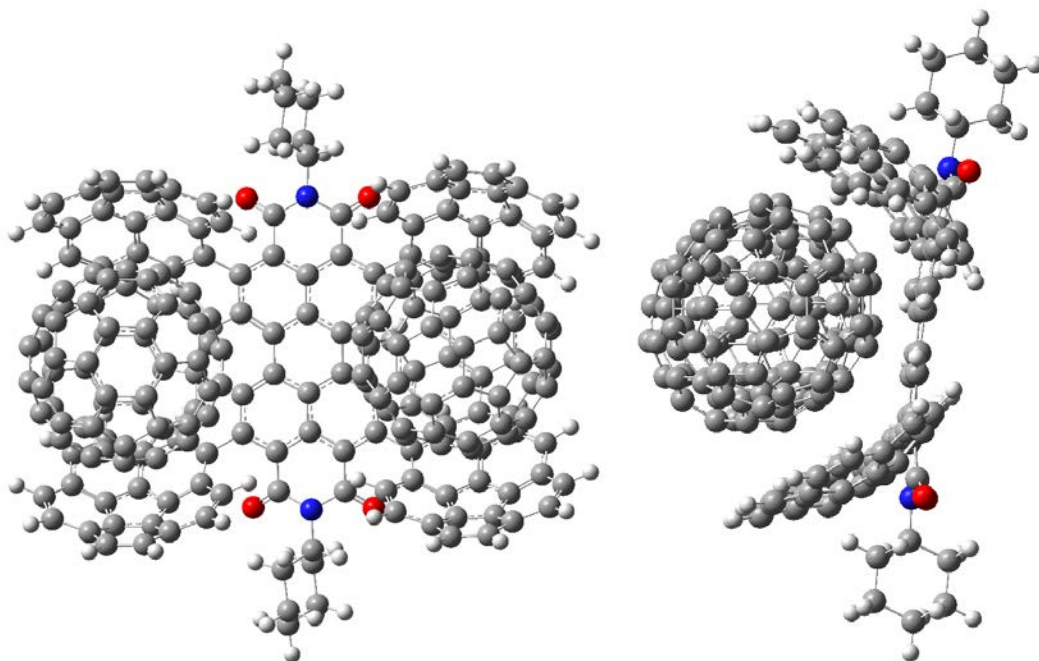


Figura 182. Estructura del sensor con dos C₆₀ en “cis”

4.4.8. Resultados

Las energías para las diferentes estructuras del sensor fueron las que se muestran en la siguiente tabla.

Estructura	Energía (u.a.)	Diferencia de energía (u.a.)	Diferencia de energía (kcal/mol)	Orden de estabilidad
Estructura A1	-4866,39459	0,00218	1,37	6
Estructura A2	-4866,39677	0	0	1
Estructura B	-4866,39512	0,00165	1,03	3
Estructura C	-4866,39503	0,00174	1,09	4
Estructura D	-4866,39604	0,00074	0,46	2
Estructura E	-4866,39199	0,00478	3,00	7
Estructura F	-4866,39464	0,00214	1,34	5

Tabla 42. Diferencia de energías y orden de estabilidad de las distintas conformaciones estructurales de PDI(Cor)₄.

La diferencia de energías es baja siendo la más alta de 3 kcal/mol. Esto quiere decir que hay mucha facilidad para que el compuesto altere su estructura estando en equilibrio con todos ellos.

Compuesto	Energía (u.a)	Diferencia de energía (u.a.)	Diferencia de energía (kcal/mol)
C_{60}	-2285,4566	-	-
PDI(Cor)₄ A1	-4866,3946	-	-
PDI(Cor)₄ + C₆₀	-7151,8992	-0,0480	-30,12
PDI(Cor)₄ + 2 C₆₀ Trans	-9437,4034	-0,0955	-59,91
PDI(Cor)₄ + 2 C₆₀ Cis	-9437,4096	-0,1017	-63,81

Tabla 43. Diferencia de energías entre el sensor con un C_{60} o dos de ellos para las posibles estructuras.

La configuración más estable es la que tiene asociados a dos C_{60} en “cis”, los dos en la misma cara del perileno interaccionando con los coranulenos de la molécula sensor. Esto no parece explicar los resultados experimentales encontrados de asociación 1:1. Por esto se hizo un análisis más detallado de las estructuras.

Se hallaron las distancias entre los coranulenos y los ángulos de los planos formados por estos, para hacerse una idea del proceso de interacción y estabilidad. Para esto se utilizó el programa Mercury 3.9. A continuación se exponen los resultados obtenidos de las distancias y ángulos además de las figuras correspondientes. Las distancias fueron calculadas tomando como referencia el centroide formado por los 10 átomos de carbono más externo de cada coranuleno. Los ángulos de igual manera hallando el plano formado por esos 10 mismos átomos. Los resultados de distancias y ángulos se recogen en tabla 44 al final de las figuras siguientes.

4.4.8.1. PDI(Cor)₄ con un C_{60}

En este primer caso se calculan las distancias entre los coranulenos y los ángulos formados por los planos como se puede ver en las siguientes figuras, cuando interacciona el sensor con una única molécula de C_{60} .

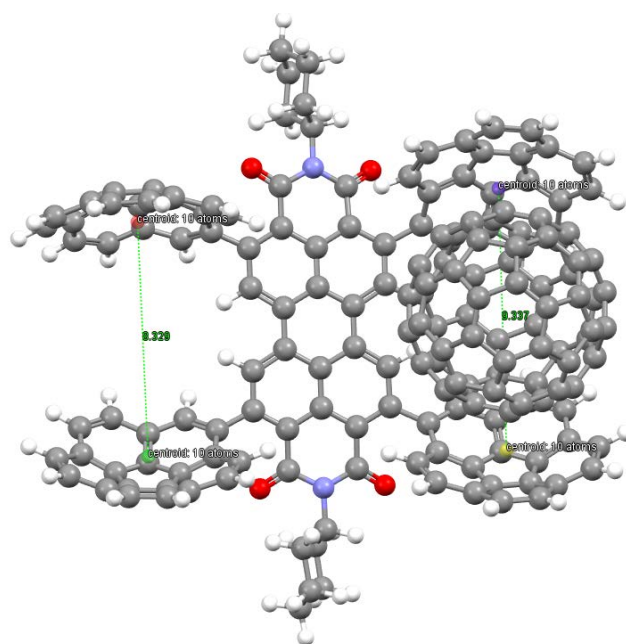


Figura 183. Distancias entre los coranulenos del sensor PDI(Cor)₄ conteniendo un C₆₀.

En esta figura se puede observar como la pinza que interactúa con el fullereno se encuentra más separada que la que no lo contiene.

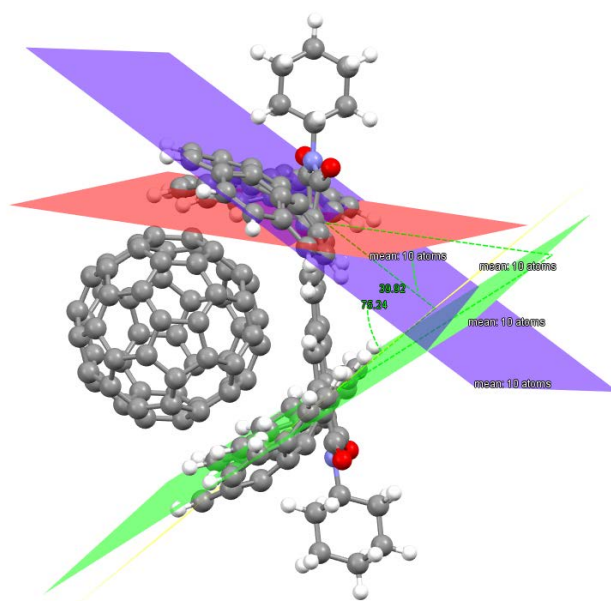


Figura 184. Ángulos formados por los planos descritos por los coranulenos del sensor PDI(Cor)₄ conteniendo un C₆₀.

En esta otra figura se observan los planos formados por los coranulenos donde el mayor ángulo corresponde a los planos de los coranulenos que contienen al fullereno.

Como se puede observar parece que al asociarse el primer fullereno provoca una apertura de la pinza de los otros dos coranulenos a la vez que el esqueleto de perileno se dobla un poco.

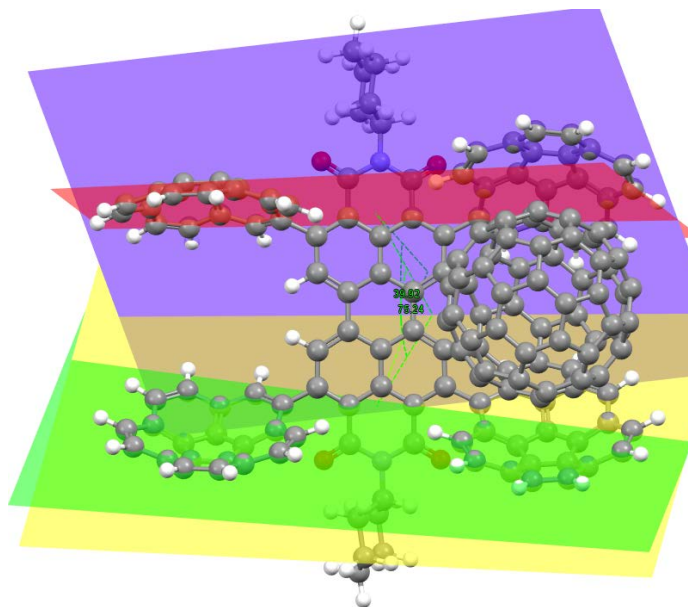


Figura 185. Vista frontal de los planos formados por los coranulenos cuando el sensor $PDI(Cor)_4$ interactúa con un C_{60}

4.4.8.2. $PDI(Cor)_4$ con dos C_{60} en "cis"

En este caso se encuentra la molécula de sensor interactuando con dos C_{60} por el mismo lado "cis". Al igual que en el caso anterior se calcularon las distancias y los ángulos de los planos formados por los coranulenos.

En la figura 186 se puede observar como ambas distancias son similares.

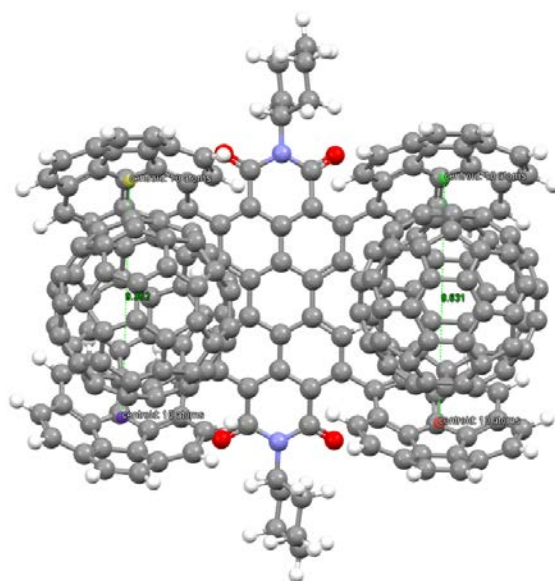


Figura 186. Distancias entre los centroides descritos por los coranulenos resultado de la Interacción de dos moléculas de C_{60} con el sensor en "cis"

En las dos figuras siguientes se puede ver como los ángulos formados por los planos también se asemejan bastante.

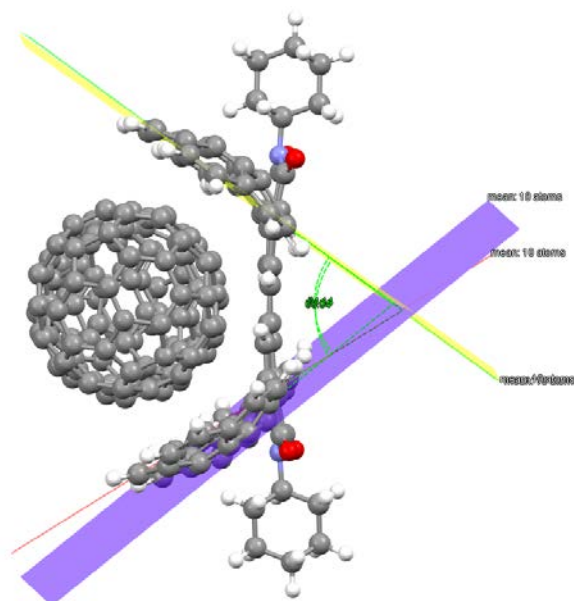


Figura 187. Ángulos formados por los planos descritos por los coranulenos del sensor $PDI(Cor)_4$ conteniendo dos C_{60} en "cis"

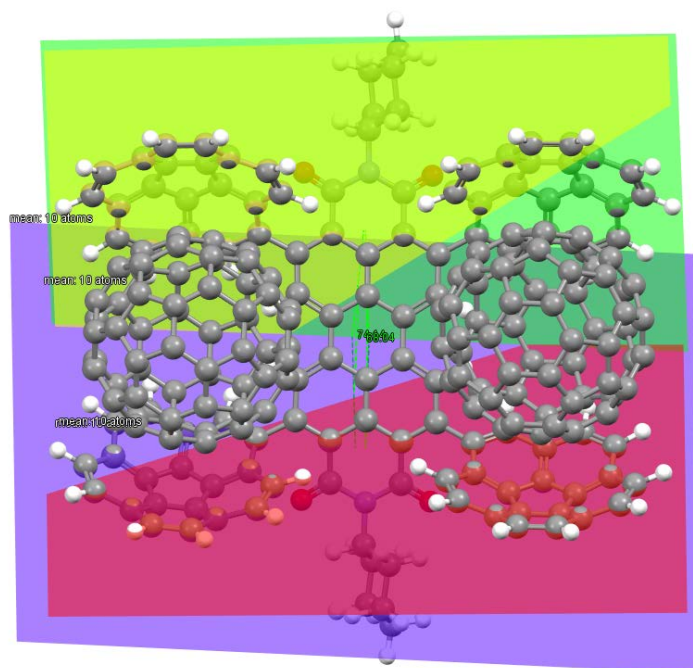


Figura 188. Vista frontal de los planos formados por los coranulenos cuando el sensor $PDI(Cor)_4$ interactúa con dos C_{60} en "cis"

4.4.8.1. $PDI(Cor)_4$ con dos C_{60} en "trans"

Para el último caso se encuentra la molécula de sensor interactuando con dos C_{60} por caras opuestas "trans". Al igual que en los dos casos anteriores se calcularon las distancias y los ángulos de los planos formados por los coranulenos.

En la figura 189 se puede observar como ambas distancias no son tan similares como para el resultado encontrado en "cis"

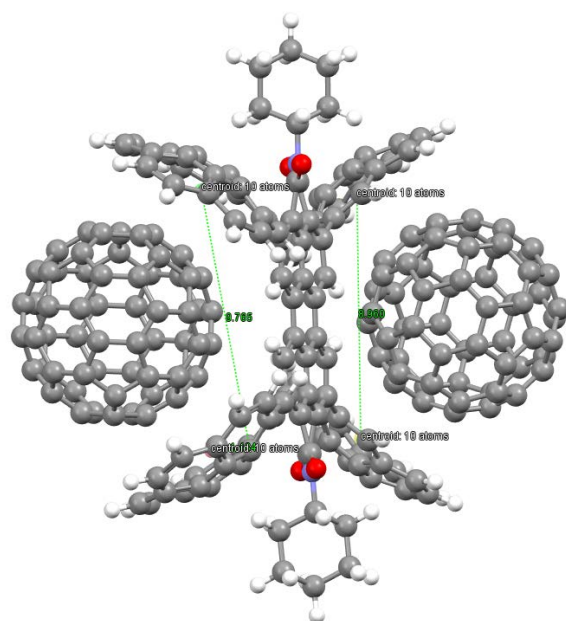


Figura 189. Distancias entre los centroides descritos por los coranulenos resultado de la Interacción de dos moléculas de C_{60} con el sensor en “trans”

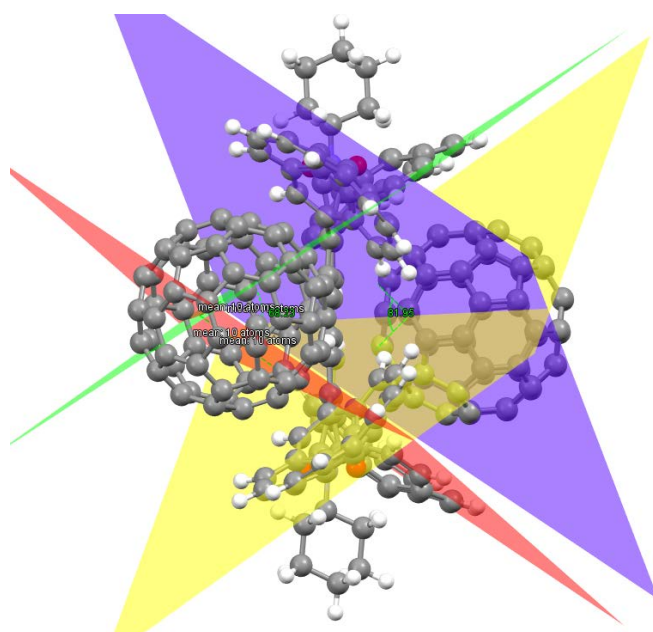


Figura 190. Ángulos formados por los planos descritos por los coranulenos del sensor $PDI(Cor)_4$ conteniendo dos C_{60} en “trans”

Los resultados obtenidos de distancias y ángulos se encuentran recogidos en la siguiente tabla. También se calculó la distancia entre el centroide del coranuleno y el de la molécula del C₆₀ resultando una distancia media de 5,9 Å en todos ellos.

Compuesto	Distancia 1 (Å)	Distancia 2 (Å)	Ángulo 1 (°)	Ángulo 2 (°)
PDI(Cor)4 + C60	8,33	9,34	39,92	75,24
PDI(Cor)4 + 2 C60 Cis	9,35	9,63	68,04	74,14
PDI(Cor)4 + 2 C60 Trans	8,96	9,77	68,23	81,95

Tabla 44. Resultados de las distancias entre los coranulenos y los ángulos formados por los planos descritos por estos.

A la vista de los resultados obtenidos se pueden tratar varios aspectos:

-Cuando se asocia el primer C₆₀ a una pinza de coranulenos, la segunda pinza vacía parece que se cierra y podría provocar que el segundo C₆₀ no pudiera asociarse, lo que explica el comportamiento de asociación 1:1.

-Cuando dos moléculas de C₆₀ se asocian lo pueden hacer de dos formas, cis o trans, siendo más estable la primera con una diferencia de unas 4 kcal/mol.

-Al asociarse dos moléculas de C₆₀, las distancias entre los centroides y los ángulos de los planos son similares en el caso de la forma cis pero diferentes en el caso de trans, lo que indica cierta tensión.

4.5. Conclusiones

Aunque el estudio de energías resulte ser más estable para la asociación de dos moléculas de C₆₀, los resultados experimentales muestran que la asociación es 1:1. Como se ha visto puede deberse al cambio de estructura experimentado por la parte contraria a la asociación del C₆₀ que impide la entrada de una segunda molécula. En experimentos futuros se cambiará el disolvente para comprobar si también tiene influencia en el sistema y se probará con C₇₀ en el método de valoración por fluorescencia y los cálculos mecanocuánticos. Además, se sigue investigando también en la modificación del sensor hacia cambios en la unión de los coranulenos al perileno posibilitando que tengan mayor movilidad y flexibilidad.

CAPÍTULO 5. PARTE EXPERIMENTAL

5. PARTE EXPERIMENTAL

5.1. Técnicas y equipos utilizados

5.1.1. Disolventes

Los disolventes utilizados en las reacciones son de al menos grado de síntesis y fueron tratados de la siguiente forma: la DMF y etanol del 96 % fueron comercialmente adquiridos. El CH_2Cl_2 fue secado usando CaCl_2 y destilándolo bajo atmósfera de nitrógeno en la oscuridad. El THF y n-hexano fueron secados con sodio y destilados antes de usarse. El tolueno fue secado con CaCl_2 seguido de una destilación.

Para eliminar el disolvente y llevar los productos a sequedad, estos disolventes fueron evaporados mediante un rotavapor Heidolph y su con una bomba de vacío VWR VP820.

5.1.2. Reactivos

Los reactivos de partida fueron comprados en casas comerciales como Sigma-Aldrich, Fluka, Acros o TCI y usados sin purificaciones posteriores.

Las reacciones y técnicas que requerían trabajar bajo atmósfera inerte fueron llevadas a cabo usando Argón 99,999% o N_2 99,999% de Air liquide o carburos metálicos.

Las sales usadas para las pruebas de interferentes fueron compradas en Sigma-Aldrich.

Los cuatro colorantes xanteno utilizados (eosina Y, eritrosina, floxina y rosa bengal) fueron comprados como sales disódicas.

5.1.3 Cromatografía

Todas las columnas cromatográficas fueron realizadas usando sílica gel 60 de Merck (0,040 – 0,063 mm). Las cromatografías en capa fina fueron realizadas láminas de aluminio para TLC de la marca Merck (sílica gel 60 F254) y reveladas con luz ultravioleta de 366 nm. Como fase móvil se usaron diferentes disolventes tales como diclorometano, acetato de etilo, hexano, ...) y sus mezclas.

5.1.4. Resonancia magnética nuclear (RMN)

Los espectros de RMN fueron adquiridos en un Varian Mercury Plus de 300 MHz o en un Varian Inova de 400 MHz a temperatura ambiente. La valoración de fullerenos con la molécula de $\text{PDI}(\text{C}_{60})$ fue realizada en Valladolid en un Agilent de 500MHz con consola DD2 y sonda fría.

Todos los espectros están referenciados con respecto a TMS usando como referencia interna la señal residual de los disolventes deuterados. (para $^1\text{H-NMR}$: CHCl_3 (7,26 ppm) y DMSO-d^6 (2,50 ppm) y para $^{13}\text{C-NMR}$: CHCl_3 (77,16 ppm) y DMSO-d^6 (39,52 ppm). Las constantes de acoplamiento están dadas en Hertzios (Hz) y los desplazamientos químicos en ppm. Las abreviaturas usadas para la multiplicidad de las señales son las siguientes: s (singlete), d (doblete), dd (doble doblete), dt (doble triplete), t (triplete), m (multiplete). Todos los espectros fueron analizados mediante el programa MestreNova 9.0

5.1.5. Espectrometría de masas

Los espectros de masas fueron realizados en un VG-Micromass AutoSpec o en un Bruker Maxis Impact. Los espectros de masas obtenidos en un sistema MALDI-TOF fueron realizados usando matrices DCTB o DIT.

5.1.6. SEM (microscopio electrónico de barrido) y TEM (microscopio electrónico de transmisión)

Para estas dos técnicas se acudió al parque científico de la Universidad de Valladolid. Para el SEM se ha utilizado un equipo (ESEM), modelo FEI-Quanta 200FEG provisto de un filamento de emisión de campo Schottky. Los análisis han sido llevados a cabo bajo un modo de vacío usando vapor de agua como gas auxiliar. Este modo de imagen permite trabajar con muestras no conductoras sin necesidad de una preparación de recubrimiento metálico. La presión de trabajo en la cámara de análisis estuvo entre 0,9 Torr hasta 2 Torr. La diferencia de potencial para estas medidas estuvo en el rango entre 4 y 10 kV.

Para la caracterización utilizando un TEM se utiliza un equipo JEOL JEM-1011HRP trabajando a 100kV and para alta Resolución TEM (HR-TEM) el equipo fue un JEM-2200F trabajando a 200kV. Para la visualización de las partículas se usó el programa de caracterización ImageJ.

5.1.7. Espectroscopía UV/Vis

Los espectros de ultravioleta- visible fueron registrados en un espectrofotómetro Hitachi U-3900. Se usó el rango entre 700 y 200 nm, 1 cm de camino óptico, cubetas de cuarzo y termostatizado a 25 °C. Los disolventes utilizados para este fin fueron de grado espectroscópico.

5.1.8. Espectroscopía de luminiscencia

Los espectros de emisión y excitación fueron registrados en un espectrofluorímetro Hitachi F-7000 FL o en un FLS980 (Edinburgh Instruments) como se puede ver en la figura 191. Para el dispositivo de microfluidos se usaron el detector modelo QE Pro-FL y el modelo modelo S2000 ambos de Ocean Optics.

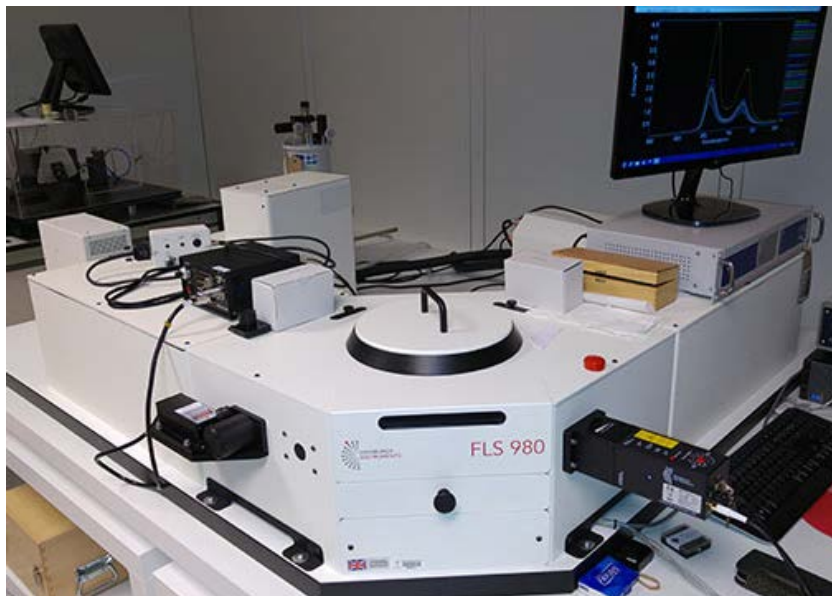


Figura 191. Equipo de fluorescencia (FLS 980) utilizado en las medidas de las muestras.

Los espectros de emisión y excitación fueron registrados en el rango 300-700 nm, con 1 cm de camino óptico en cubetas de cuarzo y termostatzado a 25 °C. Los disolventes utilizados para este fin fueron de grado espectroscópico. Las anchuras de rendija fueron modificadas dependiendo de la muestra, pero siempre manteniendo con igual o menor apertura la de emisión en el caso de un espectro de emisión y viceversa para el caso de la excitación.

Los tiempos de vida fueron realizados en una cubeta de cuarzo utilizando un láser de pulsos de picosegundos. El ruido en la señal del equipo fue obtenido usando una dispersión coloidal de sílica (Ludox, Sigma-Aldrich). Los resultados obtenidos fueron tratados con el software del equipo para conseguir el resultado como se puede ver en la figura 192. Este programa es FAST (Fluorescence Analysis Software Technology) y sirve para el análisis avanzado de los decaimientos en la fluorescencia y fosforescencia para el cálculo de los tiempos de vida medios.

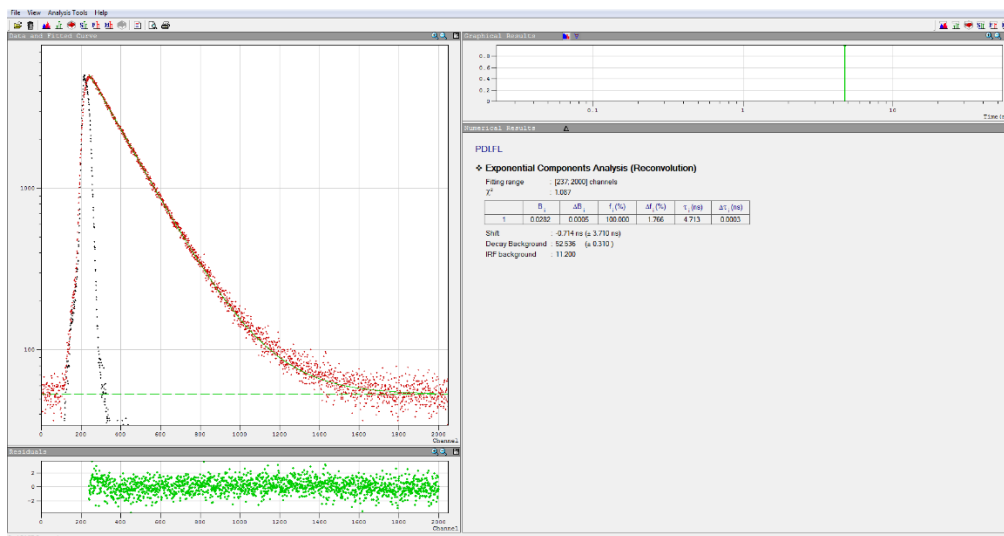


Figura 192. Ejemplo del cálculo del tiempo de vida medio con el fluorímetro FLS 980. Una captura de pantalla usando el programa FAST.

Para calcular los rendimientos cuánticos de las moléculas se ha utilizado el método absoluto basado en el uso de una esfera integradora (figura 193) que es un accesorio del fluorímetro FLS 980. Está diseñada para medir en sólidos y líquidos de diferentes formas (polvo, cubeta, polímeros, etc.).



Figura 193. Esfera integradora conteniendo una cubeta.¹³⁶

¹³⁶ Guía de uso de la esfera integradora de Edinburgh instruments: <https://www.edinst.com/wp-content/uploads/2016/02/FLS980-Series-Reference-Guide-Integrating-Sphere.pdf>

Consiste en una esfera interna de 12 cm de diámetro recubierta de teflón con una reflectancia > 99% en el rango de 400 nm- 1500 nm. Para las medidas primero se registra el espectro del disolvente como blanco y después el del compuesto calculando el programa del equipo el rendimiento cuántico total, igualando las dispersiones a la longitud de onda de excitación e integrando la diferencia de emisión. Siempre trabajando en condiciones de alta dilución ya que no puede haber sólido en suspensión en disoluciones ni efecto de agregación o desactivación por choques, cuando se trabaja en disolución.

5.1.9. Estudios mecanocuánticos

Los cálculos mecanocuántico fueron llevados a cabo usando modelos de la teoría del funcional de la densidad (DFT), el cuál es una herramienta muy útil para obtener las propiedades en el estudio de un sistema en el estado fundamental.¹³⁷

Los cálculos de energía de un sistema en DFT se realizan teniendo en cuenta la suma de seis componentes:¹³⁸

$$E_{\text{DFT}} = E_{\text{NN}} + E_{\text{T}} + E_{\text{V}} + E_{\text{coul}} + E_{\text{exch}} + E_{\text{corr}}$$

Donde E_{NN} es la energía debida a la repulsión entre núcleos, E_{V} es la atracción núcleos-electrones y E_{coul} es la repulsión entre electrones. Estas energías son las mismas que las utilizadas para los cálculos mediante la teoría Hartree-Fock. Las aproximaciones consideradas en esta teoría diferentes a la de Hartree-Fock son E_{T} (energía cinética de los electrones) además de E_{exch} (energía de intercambio electrón-electrón). El último término E_{corr} describe la correlación entre los movimientos de los electrones de diferentes espines.

Varias aproximaciones existen para calcular los términos de intercambio y correlación. Estas aproximaciones son llamadas métodos locales (considerando solo la densidad electrónica), aproximación de gradiente generalizada (considerando la densidad electrónica y sus gradientes) y los funcionales híbridos (aproximaciones a la energía de intercambio y de correlación, que incorporan una parte de intercambio exacto de la teoría de Hartree-Fock con intercambio y correlación de otras fuentes (ab initio o empíricos).

¹³⁷ R. G. Parr, W. Yang, Density Functional Theory of Atoms and Molecules, Oxford University Press, New York, **1989**.

¹³⁸ W. Koch, M. C. Holthausen, A Chemist's Guide to Density Functional Theory, Wiley-VCH, Weinheim, **2000**.

Los resultados de estos estudios fueron visualizados en los programas los resultados visualizados en Gaussview 5¹³⁹ o Mercury 3.0¹⁴⁰. Las moléculas se optimizaron en fase gas y los mínimos de energía encontrados fueron confirmados por su análisis vibracional. La energía libre de Gibbs se calculó a 1 atm y 298 K.

5.1.10. Estudios cualitativos de interferentes catiónicos y aniónicos

Para comenzar a caracterizar el comportamiento de un sensor novedoso se empieza con un estudio cualitativo en el que se enfrenta a varios analitos de cierta importancia. Estos analitos se pueden dividir en catiónicos: Ag⁺, Ni²⁺, Sn²⁺, Cd²⁺, Zn²⁺, Pb²⁺, Cu²⁺, Fe³⁺, Sc³⁺, Al³⁺, Hg²⁺, Au³⁺, Co²⁺ o aniónicos: F⁻, Cl⁻, Br⁻, I⁻, BzO⁻, NO₃⁻, H₂PO₄⁻, HSO₄⁻, AcO⁻, CN⁻, SCN⁻. La siguiente table muestra las sales utilizadas en la elaboración de las disoluciones de cada uno de ellos.

Cationes		Aniones	
Ag⁺	AgClO ₄ × xH ₂ O	F⁻	[CH ₃ (CH ₂) ₃] ₄ NF
Ni²⁺	Ni(ClO ₄) ₂ × 6H ₂ O	Cl⁻	[CH ₃ (CH ₂) ₃] ₄ NCl
Sn²⁺	Sn(CF ₃ SO ₃) ₂	Br⁻	[CH ₃ (CH ₂) ₃] ₄ NBr
Cd²⁺	Cd(ClO ₄) ₂	I⁻	[CH ₃ (CH ₂) ₃] ₄ NI
Zn²⁺	Zn(CF ₃ SO ₃) ₂	BzO⁻	[CH ₃ (CH ₂) ₃] ₄ N(OCOC ₆ H ₅)
Pb²⁺	Pb(ClO ₄) ₂	NO₃⁻	[CH ₃ (CH ₂) ₃] ₄ N(NO ₃)
Cu²⁺	Cu(ClO ₄) ₂ × 6H ₂ O	H₂PO₄⁻	[CH ₃ (CH ₂) ₃] ₄ N(H ₂ PO ₄)
Fe³⁺	Fe(ClO ₄) ₃ × xH ₂ O	HSO₄⁻	[CH ₃ (CH ₂) ₃] ₄ N(HSO ₄)
Sc³⁺	Sc(CF ₃ SO ₃) ₃	AcO⁻	[CH ₃ (CH ₂) ₃] ₄ N(OCOCH ₃)
Al³⁺	Al(ClO ₄) ₃ × 9H ₂ O	CN⁻	[CH ₃ (CH ₂) ₃] ₄ N(CN)
Hg²⁺	Hg(ClO ₄) ₂ × xH ₂ O	SCN⁻	[CH ₃ (CH ₂) ₃] ₄ N(SCN)
Au³⁺	HAuCl ₄ × 3H ₂ O		
Co²⁺	Co(BF ₄) ₂ × 6H ₂ O		

Tabla 45. Sales empleadas en los ensayos de interferentes.

Estas disoluciones se prepararon en agua con una concentración de 5 mM. En viales estrechos se añadieron 0,5 ml de disolución 0,1 mM de la sonda. En estos se van añadiendo diferentes cantidades de las disoluciones de interferentes preparadas comenzando por 10 µl que es la cantidad correspondiente a un equivalente. Se toman fotografía tanto con luz blanca como bajo luz ultravioleta (366 nm).

¹³⁹ GaussView, Version 5, Dennington, R.; Keith, T.; Millam, J. Semichem Inc., Shawnee Mission, KS, 2009.

¹⁴⁰ Macrae, C. F.; Bruno, I. J.; Chisholm, J. A.; Edgington, P. R.; McCabe, P.; Pidcock, E.; Rodriguez-Monge, L.; Taylor, R.; van de Streek, J.; Wood, P. A. *J. Appl. Crystallogr.* **2008**, 41, 466-470.

Para las adiciones de estos volúmenes de interferentes y en otros experimentos de valoraciones se usaron diferentes micropipetas Eppendorf Research Plus, de la cuáles se muestran los datos técnicos a continuación.

Modelo	Puntas (μL)	Volumen	Error sistemático	Error aleatorio
2 - 20 μL	2 - 200	2 μL	± 5,0 %	± 1,5 %
		10 μL	± 1,2 %	± 0,6 %
		20 μL	± 1,0 %	± 0,3 %
10 - 100 μL	2 - 200	10 μL	± 3,0 %	± 1,0 %
		50 μL	± 1,0 %	± 0,3 %
		100 μL	± 0,8 %	± 0,2 %
100 - 1000 μL	50 - 1000	100 μL	± 3,0 %	± 0,6 %
		500 μL	± 1,0 %	± 0,2 %
		1000 μL	± 0,6 %	± 0,2 %
500 - 5000 μL	100- 5000	500 μL	± 2,4 %	± 0,6 %
		2500 μL	± 1,2 %	± 0,25 %
		5000 μL	± 0,6 %	± 0,15 %

Tabla 46. Datos técnicos para las micropipetas empleadas.

Estos analitos pueden provocar un cambio de color o de fluorescencia en la sonda. Así se puede comprobar la selectividad de la sonda ante estos analitos y en qué medida aproximadamente van a afectarla. Con las fotografías tomadas se puede comprobar cuáles afectan a la sonda y cuáles no.

5.1.11. Estudios cuantitativos de interferentes catiónicos y aniónicos

Para llevar a cabo un análisis de una sonda con un analito de forma más específica lo primero que hay que saber en qué rango de concentraciones se va a poder llevar a cabo. El rango de concentraciones necesario para poder llevar a cabo una posterior valoración del analito de interés debe presentarse como una regresión lineal de la absorbancia y emisión frente a la concentración. También hay que tener en cuenta que es conveniente trabajar con bajas concentraciones para evitar efectos de interacción entre las moléculas de sonda.

Sabiendo todo lo anterior se usa una cubeta de cuarzo para medir la absorbancia y la fluorescencia de concentraciones crecientes de sonda añadiendo más cantidad de sonda de una disolución madre preparada anteriormente después de cada medida. Una vez comprobado el rango lineal se pasa a realizar la valoración del analito.

5.1.11.1. Valoración del analito de interés mediante el uso de absorbancia ultravioleta visible y/o fluorescencia

Estas valoraciones se hacen de forma conjunta introduciendo primero la cubeta en el espectrofotómetro de absorción y seguidamente en el fluorímetro. Se comienza con una concentración conocida de sonda dentro del rango de concentraciones aceptables estudiado anteriormente y se van añadiendo concentraciones crecientes de analito. Al hacer esto la sonda se va diluyendo y es algo a tener en cuenta más tarde en los cálculos, por lo que la disolución madre de analito suele hacerse concentrada para minimizar esto. Un ejemplo de las cantidades a añadir de analito y cómo van variando las concentraciones de ambos se muestra a continuación.

$V_{\text{analito}} (\mu\text{L})$	$C_{\text{analito}} \text{ disolución (mM)}$	$V_{\text{total}} (\mu\text{l})$	$C_{\text{sonda}} (\mu\text{M})$	$C_{\text{analito}} \text{ cubeta } (\mu\text{M})$	$C_{\text{sonda}}/C_{\text{analito}}$
2,5	1,25	2502,5	25,0	1,25	0,05
5	1,25	2505	25,0	2,50	0,1
7,5	1,25	2507,5	24,9	3,74	0,15
10	1,25	2510	24,9	4,98	0,2
12,5	1,25	2512,5	24,9	6,22	0,25
15	1,25	2515	24,9	7,46	0,3
17,5	1,25	2517,5	24,8	8,69	0,35
20	1,25	2520	24,8	9,92	0,4
22,5	1,25	2522,5	24,8	11,1	0,45
25	1,25	2525	24,8	12,4	0,5
30	1,25	2530	24,7	14,8	0,6
35	1,25	2535	24,7	17,3	0,7
40	1,25	2540	24,6	19,7	0,8
45	1,25	2545	24,6	22,1	0,9
50	1,25	2550	24,5	24,5	1
60	1,25	2560	24,4	29,3	1,2
70	1,25	2570	24,3	34,0	1,4
80	1,25	2580	24,2	38,8	1,6
90	1,25	2590	24,1	43,4	1,8
100	1,25	2600	24,0	48,1	2
125	1,25	2625	23,8	59,5	2,5
150	1,25	2650	23,6	70,8	3
175	1,25	2675	23,4	81,8	3,5
200	1,25	2700	23,1	92,6	4
250	1,25	2750	22,7	114	5

262,5	5,00	2762,5	22,6	136	6
275	5,00	2775	22,5	158	7
287,5	5,00	2787,5	22,4	179	8
312,5	5,00	2812,5	22,2	222	10
337,5	5,00	2837,5	22,0	264	12
375	5,00	2875	21,7	326	15
437,5	5,00	2937,5	21,3	426	20

Tabla 47. Ejemplo de una valoración.

En este proceso se va cambiando de micropipeta para adaptarse a los volúmenes requeridos en cada adición. La valoración acaba cuando ya no se aprecian cambios en los diferentes espectros ya sea por cambio de absorción o intensidad o desplazamiento del máximo y los espectros sean iguales o constantes.

La valoración por absorbancia suele llevarse a cabo entre unas longitudes de onda de 800 y 200 nm. Se realiza una corrección de la línea base y la muestra se mide junto a otra cubeta como blanco que contiene el disolvente utilizado.

La valoración por fluorescencia depende de la longitud de onda de excitación del compuesto. La anchura de las ventanas se pondrá lo más pequeña posible tanto para excitación como emisión y la velocidad de adquisición será lo suficiente como para obtener un buen espectro. También se puede seguir la evolución de la dispersión Rayleigh ya que puede indicar la precipitación del compuesto.

En el caso de que hubiera efectos cinéticos hay que cambiar la forma de adición del analito teniendo que preparar la disolución de este junto con la sonda para evitarlo o al menos controlarlo teniéndolo en cuenta.

Al finalizar la valoración y obtener los datos se procede a realizar el ajuste a diferentes curvas para calcular la constante de equilibrio usando el software Origin 7.5.

5.1.11.2. Valoración del analito de interés mediante el uso de ¹H-RMN

Esta valoración fue realizada en un Agilent de 500 MHz.

El procedimiento es similar al caso anterior. La sonda se pesa y se disuelve dentro de un tubo de RMN en el disolvente deuterado apropiado. Además, se puede preparar otra disolución madre concentrada del analito junto con la misma concentración anterior de sonda para evitar efectos cinéticos.

En este caso lo que va a ocurrir algún cambio en las señales de protón desplazándose en el espectro. Representando este desplazamiento frente a la concentración de analito se obtiene la correspondiente constante de equilibrio al ajustarlo a una curva con el software Origin 7.5.

5.1.12. Cálculo de las constantes de equilibrio

La constante de equilibrio, en este caso de formación o asociación, se refiere a la interacción entre el analito (M) y la sonda (L) para formar el complejo entre ambos. M y L viene de la semejanza con la formación de complejos metálicos donde M es el centro metálico y L el o los ligandos que se unen a él.

Esta formación del complejo puede darse con diferentes proporciones entre M y L por lo que se necesitan diferentes ecuaciones para ajustar los resultados y hallar la constante.

5.1.12.1. Complejos ML (1:1)

La constante de formación para esta proporción se define como:



$$K = \frac{[ML]}{[M][L]}$$

Ecuación 16.

Teniendo en cuenta el balance de masas del equilibrio y la absorbancia (se podría igualmente usar la fluorescencia u otra propiedad observable que vaya variando), se puede expresar como:

$$C_L = [L] + [ML]$$

Ecuación 17.

$$C_M = [M] + [ML]$$

Ecuación 18.

$$A = f_L [L] + f_{ML} [ML]$$

Ecuación 19.

Donde:

C_L : Concentración total de sonda.

C_M : Concentración total de analito a lo largo de la valoración.

[L], [M], [ML]: Concentración de las diferentes especies en el equilibrio.

A: Absorbancia a lo largo de la valoración.

f_L : Factor de proporcionalidad de absorbancia de la sonda libre.

f_{ML} : Factor de proporcionalidad de absorbancia del complejo formado.

Sustituyendo en la ecuación 18 la concentración de analito en el equilibrio de la ecuación 16 se obtiene la siguiente ecuación:

$$A = f_L C_L - f_L [ML] + f_{ML} [ML]$$

Ecuación 20.

$$A = f_L C_L + (f_{ML} - f_L) [ML]$$

Ecuación 21.

Cuando comienza la valoración la absorción solo es debida a la sonda. De esta manera al final de la valoración la absorción se corresponde con el complejo formado.

$$A_0 = f_L C_L$$

Ecuación 22.

$$A_{\text{lim}} = f_{ML} C_{ML} = f_{ML} C_L$$

Ecuación 23.

La combinación de las ecuaciones 22 y 23 con la ecuación 6 lleva a la siguiente expresión:

$$A_{\text{lim}} - A_0 = f_{ML} C_L - f_L C_L = (f_{ML} - f_L) C_L$$

Ecuación 24.

Sustituyendo la expresión 22 en la ecuación 21 se obtiene:

$$A = A_0 + (f_{ML} - f_L) [ML]$$

Ecuación 25.

Si se sustituye la ecuación 24 en la 25 se llega a la expresión siguiente:

$$A = A_0 + \frac{A_{\text{lim}} - A_0}{C_L} [ML]$$

Ecuación 26.

La siguiente expresión se consigue al combinar las ecuaciones 17 y 18 con la ecuación 16:

$$K = \frac{[ML]}{[M][L]} = \frac{[ML]}{(C_M - [ML])(C_L - [ML])}$$

Ecuación 27.

Despejando [ML] de la ecuación anterior y sustituyendo en 26 da la siguiente expresión:

$$A = A_0 + \frac{A_{\text{lim}} - A_0}{2C_L} \left[C_L + C_M + \frac{1}{K} - \sqrt{\left(C_L + C_M + \frac{1}{K} \right)^2 - 4C_L C_M} \right]$$

Ecuación 28.

Donde:

A_0 es la absorbancia de la sonda libre.

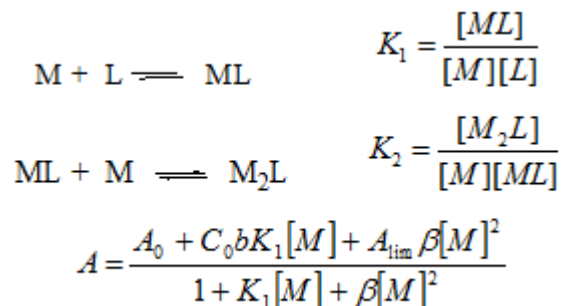
A_{lim} es la absorbancia del complejo ML.

K es la constante de equilibrio.

Así la constante de equilibrio K puede ser calculada mediante un ajuste no lineal representando la absorbancia frente a la concentración de analito. Esto se consigue realizando iteraciones sobre el ajuste de la ecuación mediante el software Origin 7.5.

De forma similar se pueden calcular los modelos necesarios de ajuste para otras estequiometrías entre la sonda y el analito. La expresión que mejor ajuste los datos experimentales será indicativa de la estequiometría del complejo.

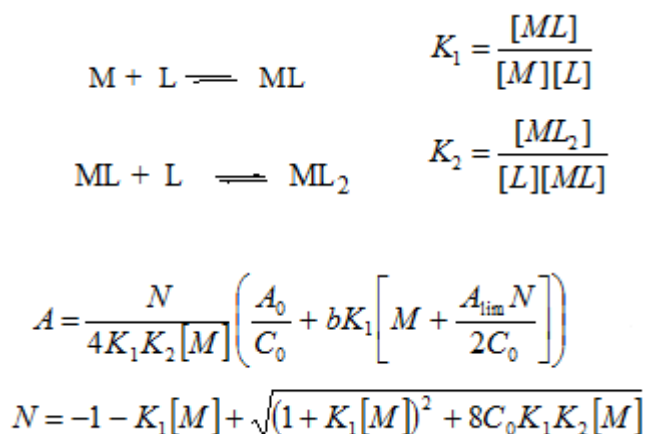
5.1.12.2. Complejos M₂L (2:1)



Ecuación 29.

El símbolo β representa la constante total. Puede ser expresada como $\beta = K_1 K_2$. Por otro lado, b es el coeficiente de extinción molar del intermedio ML.

5.1.12.3. Complejos ML₂ (1:2)



Ecuación 30.

5.1.13. Job's plot o método de la variación continua

Este experimento se usa para determinar la estequiometría de una unión o interacción.¹⁴¹

En este método la concentración molar de la sonda y analito se mantiene constante variando únicamente la fracción molar de estos. La absorción o fluorescencia es representada

¹⁴¹ Z. D. Hill, P. MacCarthy, *J. Chem. Educ.* **1986**, *63*, 162-167.

frente a la fracción molar y el máximo o mínimo de la representación se corresponde con la estequiometría del complejo. Aunque como se ha comentado en el capítulo 4 este método es de poco valor ya que como se demuestra en esta publicación de Hibbert y Thordarson¹⁴² este análisis para determinar la estequiometría de asociación en estos casos es ineficaz y solo cuando los valores de las constantes de asociación son altas, son acertados estos estudios.

Para aplicar este método deben darse ciertas condiciones como son:

- Se debe cumplir la ley de Lambert-Beer en el sistema.
- Un complejo debe ser el predominante en las condiciones del experimento.
- La concentración total de los compuestos debe permanecer constante.
- El pH y la fuerza iónica deben ser constantes.

Cada disolución es preparada en diferentes viales, teniendo en total 11 disoluciones por ejemplo como muestra la siguiente tabla:

X_{Sonda}	$V_{\text{Sonda}} (\mu\text{l})$	$V_{\text{Analito}} (\mu\text{l})$
1	2500	0
0,9	2250	250
0,8	2000	500
0,7	1750	750
0,6	1500	1000
0,5	1250	1250
0,4	1000	1500
0,3	750	1750
0,2	500	2000
0,1	250	2250
0	0	2500
Total	13750	13750

Tabla 48. Ejemplo de las disoluciones preparadas para un experimento de Job plot.

Todas las disoluciones contienen la misma concentración total. La fuerza iónica se puede hacer constante añadiendo sales como NaCl 0,1 M en todas las disoluciones.

Una vez se tienen las disoluciones preparadas se procede a medir por ejemplo la absorbancia en un espectrofotómetro UV-Visible. La representación de la absorbancia multiplicada por la fracción molar frente a la fracción molar da como resultado una curva cuyo

¹⁴² Brynn Hibbert, D.; Thordarson, P. *Chem. Commun.* **2016**, 52 (87), 12792–12805.

máximo coincide con la estequiometría de la interacción entre la sonda y el analito tal que 0,5 indicaría una asociación 1:1, 0,33 indica una asociación 1:2, etc.

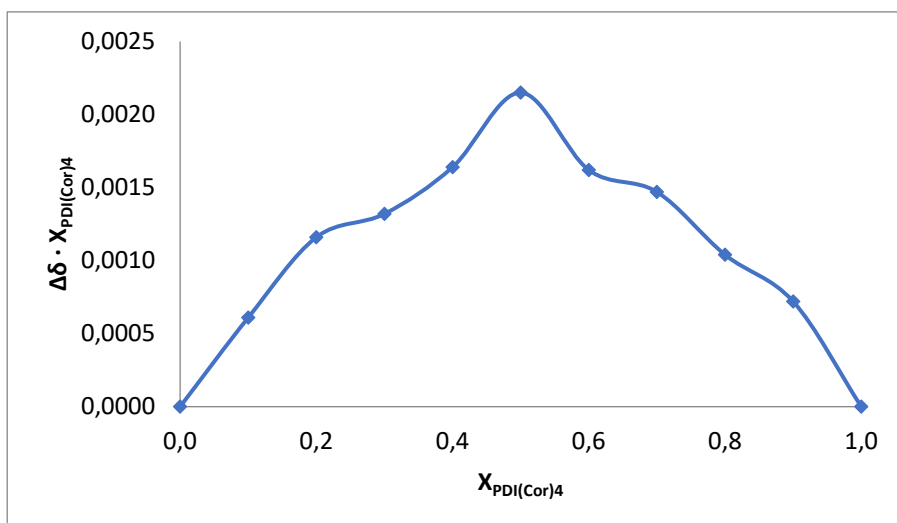


Figura 194. Ejemplo de una representación del experimento Job plot donde se puede observar que el máximo indica una estequiometría 1:1 del complejo.

5.2. Parte experimental del capítulo 2.

5.2.1. Extracción de las pirrolizidinas de miel y polen

A continuación, se detalla el proceso de extracción de los APs en mieles y pólenes:

Se prepararon varias disoluciones con las que proceder a la extracción: disolución 0,05 M de H_2SO_4 en agua, disolución al 1% de NH_3 en agua, disolución al 1% de NH_3 en metanol y patrón de retrorsina. Para extraer se usaron cartuchos Strata (500 mg/3 mL) de intercambio de cationes duros (SCX) columnas de extracción en fase sólida (Phenomenex, Torrance, CA).¹⁴³ Se probaron varios métodos de extracción con distintas cantidades de las disoluciones y al final se llegó a la optimización.

Se partió de miel refrigerada a una temperatura de 4°C y se calentó toda la muestra al baño maría mediante una placa calefactora, a una temperatura 40 ± 2 °C, consiguiendo que fuera más fluida, para poder pesarla. Posteriormente, se procedió a pesar aproximadamente 4 g de la miel en tubos centrífuga.

¹⁴³ Descripción de los cartuchos de extracción: <http://www.phenomenex.com/Products/SPDetail/Strata-X/X-C,%20Strong%20Cation%20Mixed%20Mode>

A continuación, se añadieron 5 mL de la disolución ácido sulfúrico 0,05 M y 1 mL de la disolución de retrorsina como patrón interno en una concentración de 1 µg/mL. Las muestras fueron agitadas hasta su completa disolución, y fueron introducidas en la centrífuga a 7500 rpm durante 30 min. Con esto se consigue precipitar los componentes que no son de interés de la miel como son los propóleos o la cera. Finalmente se separó el sobrenadante.

El sobrenadante se introdujo directamente a través de los cartuchos de intercambio catiónico (Phenomenex Strata-X-C (60 mg / 3 mL).

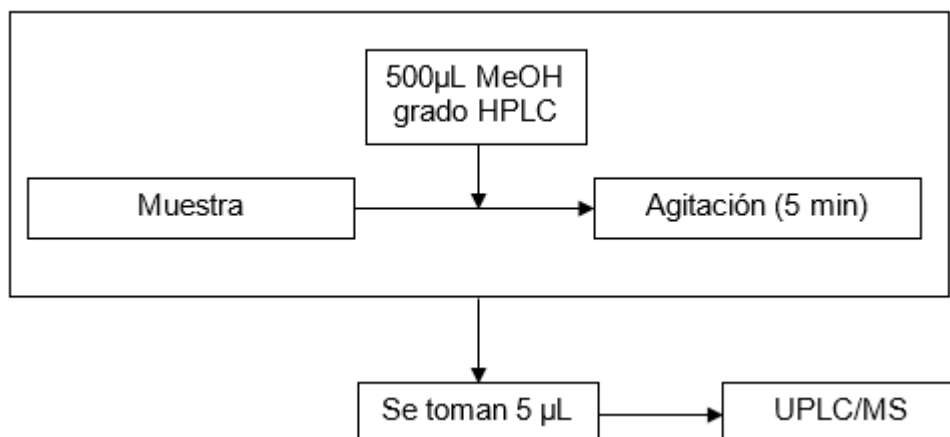
A continuación, se adicionaron 3 mL de agua destilada para lavar los restos de azúcar que haya presentes en el cartucho. Después, se adicionaron otros 3 mL de metanol también para lavar restos de azúcar y otros componentes de la miel, para que, de esta forma, quedaran solo los alcaloides de pirrolizidina (APs) retenidos en el polímero.

Para finalizar, se adicionaron 9 mL de metanol amoniacal 1% para extraer estos APs. Este volumen fue recogido en un vial de 10 mL y evaporado a 45 ± 1 °C hasta la eliminación total del disolvente, obteniéndose así el extracto de muestra donde están presentes los APs.

El procedimiento seguido con las muestras de polen fue el mismo que con la miel con la única diferencia que antes de introducir los 4 g de polen en el tubo de centrífuga estos fueron machacados en un mortero hasta que quedó un polvo finamente dividido. Los siguientes pasos fueron exactamente los mismos, aunque al final el sólido resultante tenía más color que en el caso de las mieles.

5.2.2. Determinación del contenido en APs mediante UPLC/MS

Tal y como se muestra en el Esquema 21, la muestra se reconstituyó con 500µL de metanol grado HPLC, se agitó durante 5 min, y mediante una jeringuilla con un filtro de disco (tamaño de poro 0,2 µm) se tomaron 5 µL y se inyectaron en el equipo UPLC/MS. En todas las inyecciones se tomó una alícuota de 5 µL de muestra.



Esquema 21. Diagrama para el tratamiento de la muestra antes de ser inyectada en el UPLC/MS.

La separación de los alcaloides de pirrolizidina se llevó a cabo por cromatografía líquida de ultra-alta resolución (UPLC), una técnica que consiste en la separación de componentes de una mezcla que emplea altas presiones. Se utilizó para la separación de estos alcaloides una columna C₁₈ Aquity (100 mm x 2,1 mm x 1,7 µm). La columna se mantuvo a una temperatura de 30 °C, y se realizó una separación de gradiente binario utilizando un caudal de 0,2 mL·min⁻¹. La fase móvil consistió en ácido fórmico al 0,05% en agua (A) junto a acetonitrilo (B). El perfil del gradiente utilizado fue: de 0 a 2 minutos un 20% de B; de 2 a 15 minutos se incrementa linealmente hasta un 50 % de B; de 15 a 17 minutos se mantiene ese 50 % y de 18 a 30 minutos después de la adquisición de los datos se vuelve a poner el 20% de B para reequilibrar la columna.

Al equipo UPLC se acopló un detector de masas (Figura 195) tiempo de vuelo Bruker Maxis Impact (UPLC-TOF-MS). La técnica empleada en espectrometría de masas fue la de ionización por electroespray (ESI) positivo [M+H]⁺ (masa del compuesto más un protón). La muestra en disolución se hace pasar a través de un capilar al que se aplica un alto potencial eléctrico, a la salida del capilar la disolución se dispersa en forma de spray formado por pequeñas gotas cargadas, las cuales se evaporan rápidamente liberando las moléculas.

Una vez obtenidos los resultados, el análisis de datos se realizó con el programa Bruker DataAnalysis 4.1.

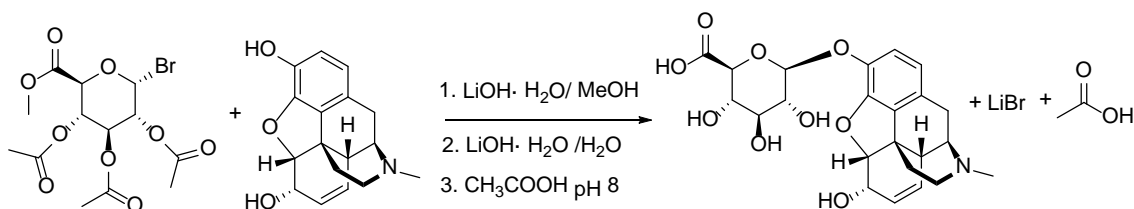


Figura 195. Equipo empleado para la espectrometría de masas.

5.2.3. Detección de opiáceos en orina y saliva

Síntesis de morfina 3-glucurónido¹⁴⁴:

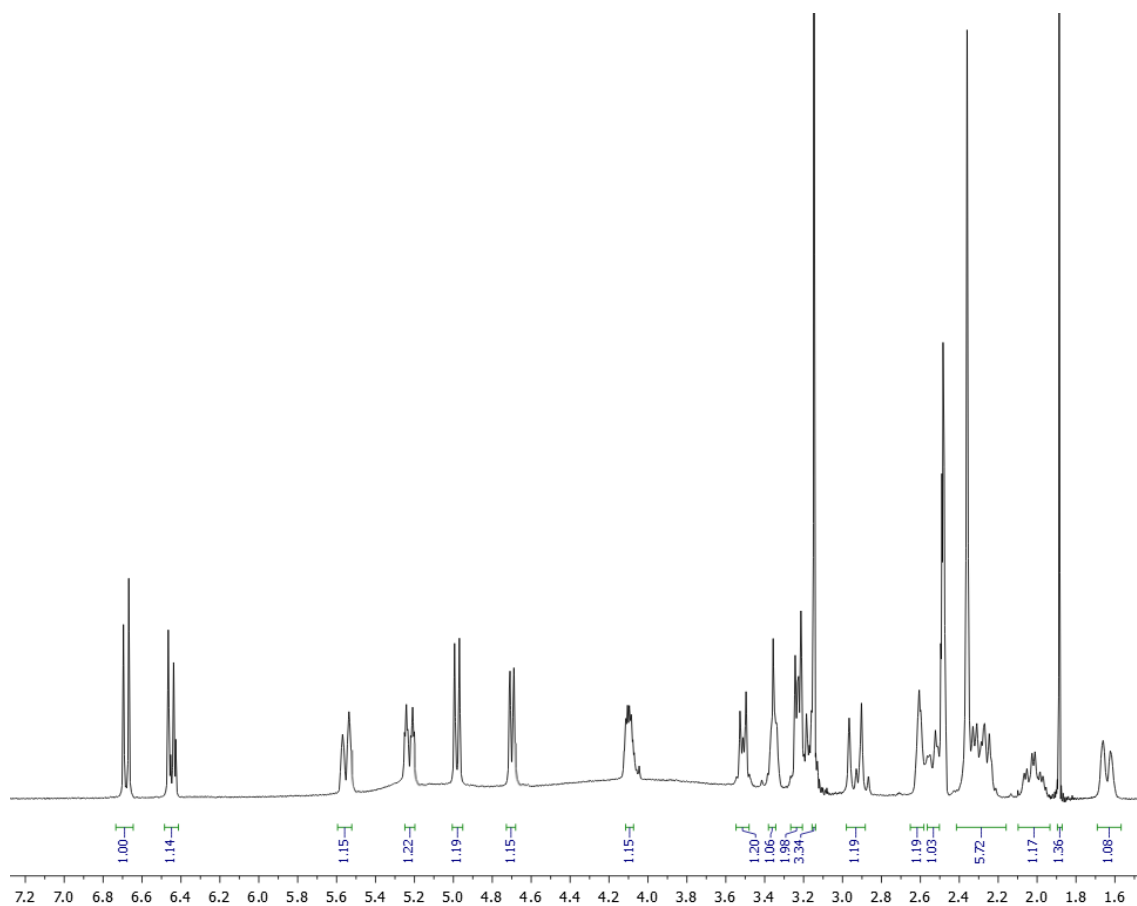
A una disolución de morfina (0,563 g – 1,75 mmol) y LiOH·H₂O (0,136g – 3,24 mmol) en 2,5 ml de metanol, se le añadió metil acetobromo- α -D-glucuronato (0,5 g – 1,26 mmol) y se dejó media hora bajo agitación. Tras este tiempo, se añadieron (0,175 g – 4,2 mmol) de LiOH·H₂O en 2,5 ml de agua y se agitó durante 30 minutos. La mezcla se concentró a un volumen menor y se llevó a pH 8 con ácido acético. La morfina que había reaccionado precipitó de color blanco y se recuperó por filtración (aproximadamente el 35%). La disolución quedó de color amarilla y se concentró hasta formar un líquido viscoso que se mezcló con 5 ml de metanol. El compuesto empezó a cristalizar a -20 °C durante una noche. Después se filtró y se secó el producto de color blanco. Se obtuvo un 53% de rendimiento.



Esquema 22. Síntesis del conjugado de morfina.

Se procedió a su caracterización mediante RMN ¹H y masas obteniendo los espectros que se muestran a continuación.

¹⁴⁴ Berrang, B.; Twine, C. E.; Hennessee, G. L.; Carroll, F. I. *Synth. Commun.* **1975**, 5 (3), 231–236.



$^1\text{H RMN}$ (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 6.68 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 6.44 (d, 1H), 5.54 (d, 1H), 5.23 (dt, $J = 9.8$, 2.8 Hz, 1H), 4.98 (d, $J = 7.4$ Hz, 1H), 4.70 (dd, $J = 6.0$, 1.2 Hz, 1H), 4.15 – 4.01 (m, 1H), 4.09 (s, 1H), 3.56 – 3.44 (m, 1H), 3.34 (d, $J = 3.7$ Hz, 1H), 3.26 – 3.08 (m, 2H), 3.15 (s, 3H), 2.93 (d, $J = 18.8$ Hz, 1H), 2.65 – 2.52 (m, 1H), 2.39 – 2.21 (m, 6H), 2.13 – 1.93 (m, 1H), 1.89 (s, 1H), 1.93 – 1.83 (m, 1H), 1.70 – 1.59 (m, 1H).

Resultado de la espectrometría de masas: **HRMS** (ESI⁺): m/z teórico para $\text{C}_{23}\text{H}_{28}\text{NO}_9$: 462,1759 (M^+); encontrado 462,1755.

5.2.4. Proceso de extracción en orina real

El procedimiento para la extracción fue similar al utilizado con las mieles y pólenes como se detalla a continuación.

Inicialmente se cogieron 4 ml de orina y se le añadió el volumen necesario de una disolución madre de conjugado de morfina (M3G) para que tuviera la concentración deseada como patrón interno. Posteriormente, se procedió a añadir carbón activo a la disolución de orina con conjugado y se agitó para que adsorbieran los compuestos coloreados que interfieren (urobilina). Después se filtra a través de un filtro de disco (Millex GP 0,22 μ m).

Se introdujeron 2,5 ml de la disolución filtrada directamente a través de los cartuchos de intercambio catiónico (Phenomenex Strata-X-C (60 mg / 3 mL)), quedando retenido el conjugado de morfina en su interior.

A continuación, se adicionaron 3 mL de agua destilada para eliminar las sales y demás componentes solubles de la orina que hubiera presentes en el cartucho. Posteriormente, se adicionaron otros 3 mL de metanol también para eliminar otros componentes interferentes de la orina para que, de esta forma, quedara solo el conjugado de morfina retenido en el polímero.

Finalmente, se adicionaron 9 mL de metanol amoniacal al 1% para eluir el conjugado retenido. Este volumen fue recogido en un vial de 10 mL y evaporado a 45 ± 1 °C hasta la eliminación total del disolvente, obteniéndose así el extracto de muestra donde está presente el conjugado.

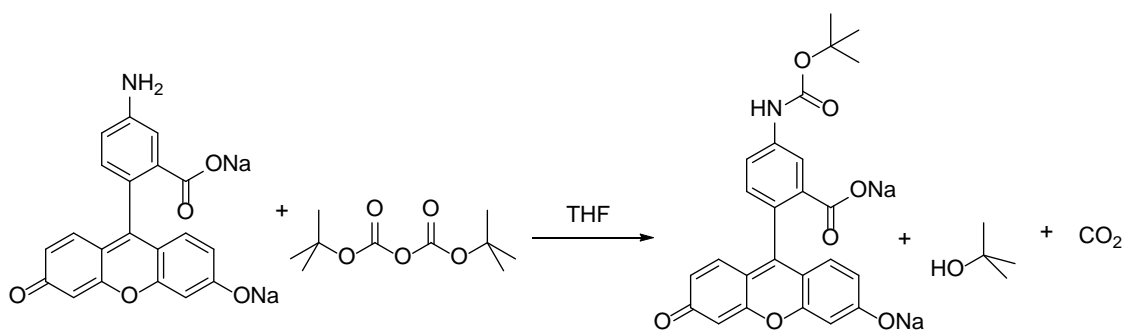
A este extracto se le añadieron 2,45 ml de agua, 25 μ l de disolución de eosina 0,1 mM y 25 μ l de disolución de NaOH 0,1M y se midió en el fluorímetro por el procedimiento habitual.

5.2.5. Síntesis del polímero con 2 % de entrecruzante con eosina Y

Se disuelven en un matraz 0,5 g (1,44 mmol) de 5-aminofluoresceína en 50 ml de THF y se le añade 1,1 equivalentes de di-tert-butil dicarbonato (0,35g – 1,6 mmol). Se deja agitando toda la noche. Se elimina el disolvente, el tert-butanol y el Boc₂O sobrantes a vacío. Se obtienen 0,56 g de producto protegido lo que equivale a un 89 % de rendimiento.

Compuesto	Equivalentes	Masa (mg)	n (mmol)	PM (g/mol)	V (ml)
5-aminofluoresceína	1	500	1,28	391,29	
Boc₂O	1,1	304	1,41	215,25	
THF					50

Tabla 49. Cantidades de los reactivos añadidas en la reacción.

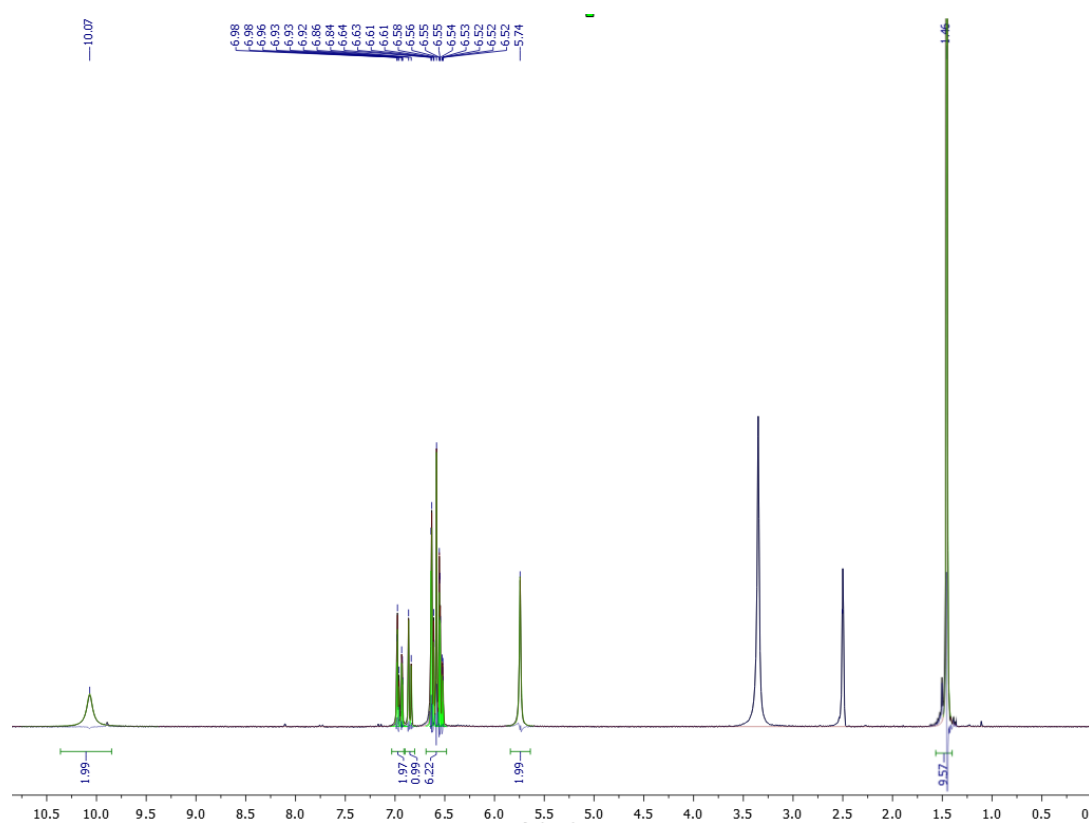


Esquema 23. Síntesis de 5-aminofluoresceína protegida con un grupo boc.

A continuación, se recogen los datos relativos a la caracterización del producto protegido, masas y RMN de protón.

Resultado de la espectrometría de masas: **HRMS (MALDI)**: m/z teórico calculado para $C_{25}H_{22}NO_7$: 448,1391 (M⁺); obtenido: 448,1389.

Caracterización por RMN de 1H :



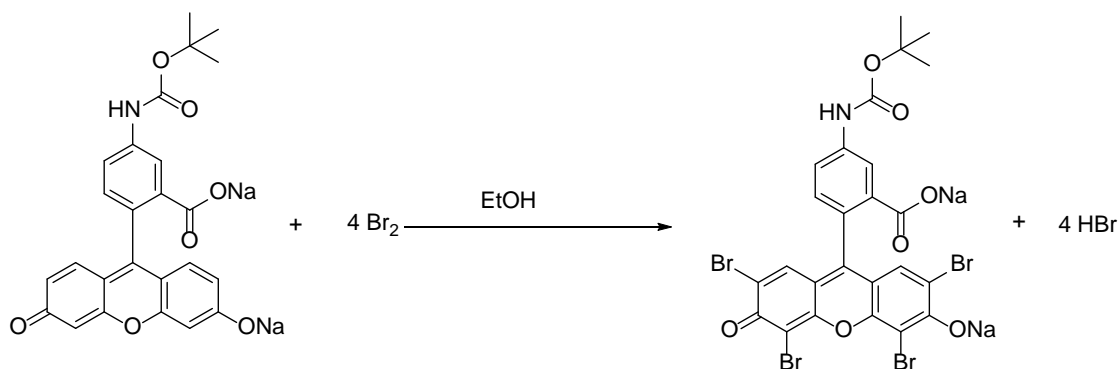
$^1\text{H RMN}$ (DMSO, 300 MHz) δ (ppm): 10,07 (s, 1H), 7.03 – 6.91 (m, 2H), 6.85 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 6.69 – 6.48 (m, 6H), 5.74 (s, 2H).

El siguiente paso es la bromación del producto (esquema 24) para lo cual 0,5 g del producto anterior se disuelven en 10 ml de etanol y se va añadiendo poco a poco 0,5 ml de Br_2 (9,76 mmol) disueltos en 5 ml de etanol, mientras se agita. Tras estar agitando durante 30 minutos, se extrae con acetato de etilo 50 ml y 50 ml de bisulfito de sodio en agua, en tres etapas. La disolución de acetato de etilo que contiene el producto se lleva al rotavapor y se elimina el disolvente. 0,721 g se obtienen lo que nos lleva al 85% de rendimiento.

Para purificar el producto se realiza una columna cromatográfica con sílica gel y acetato de etilo. El producto queda en línea base y se saca con metanol al final.

Compuesto	Equivalentes	Masa (mg)	n (mmol)	PM (g/mol)	V (ml)
5-aminofluoresceína(Boc)	1	500	1,02	491,41	
Bromo	9,76	1560	9,76	159,81	
Etanol					15

Tabla 50. Cantidades de los reactivos añadidas en la reacción.



Esquema 24. Síntesis de la 5-aminoeosina con el grupo protector boc.

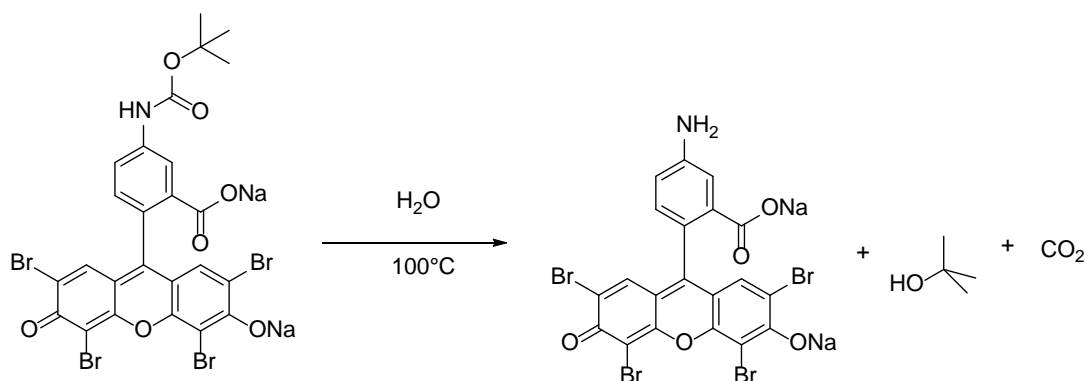
La caracterización del producto se realiza mediante espectrometría de masas y seguidamente se llevó a cabo la desprotección para obtener el producto de interés.

Resultado de la espectrometría de masas: **HRMS** (MALDI): m/z teórico calculado para $\text{C}_{25}\text{H}_{17}\text{Br}_4\text{N}_1\text{O}_7$: 761,7628 (M^+); obtenido: 761,7696.

Se lleva a cabo a continuación la desprotección de la amina (esquema 25) siguiendo el procedimiento encontrado en bibliografía.¹⁴⁵ para lo cual se añade el producto obtenido por bromación a 20 ml de agua agitando. Se pone la mezcla a reflujo durante 15 minutos. Después se elimina el disolvente en el rotavapor. Se obtienen 0,576 g de 5-aminoeosina que implica un 92% de rendimiento.

Compuesto	Equivalentes	Masa (mg)	n (mmol)	PM (g/mol)	V (ml)
5-aminoeosina(Boc)	1	26,5	0,025	806,99	
Agua					20

Tabla 51. Cantidades de los reactivos añadidas en la reacción.

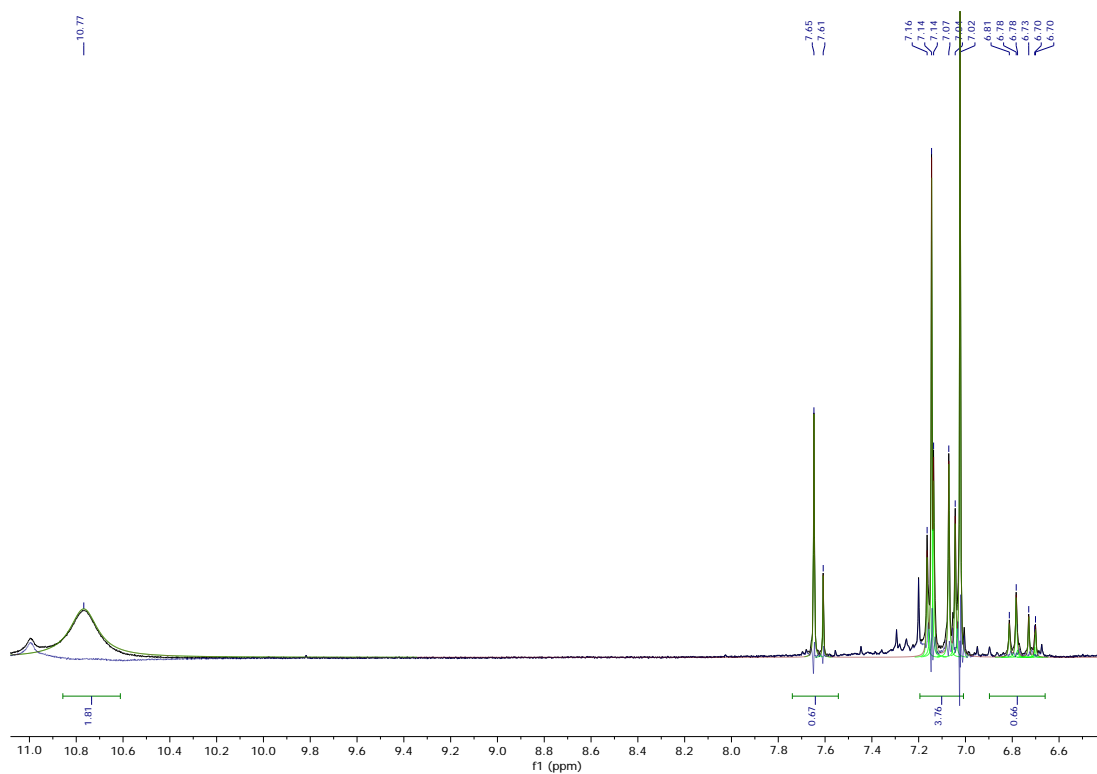


Esquema 25. Desprotección de la 5-aminoeosina.

La caracterización de la 5-aminoeosina se realiza mediante masas y RMN ¹H obteniéndose los espectros que se muestran a continuación.

Resultado de la espectrometría de masas: **HRMS** (MALDI): m/z teórico calculado para C₂₀H₉Br₄N₁O₅: 663,7248 (M⁺); obtenido: 663,7239.

¹⁴⁵ Zinelaabidine, C.; Souad, O.; Zoubir, J.; Malika, B.; Nour-Eddine, A. *Int. J. Chem.* **2012**, 4 (3), 73–79.

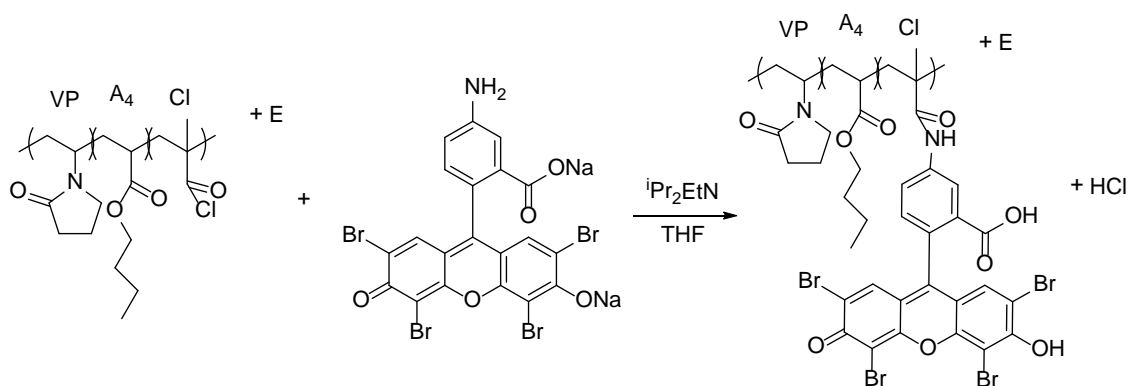


^1H RMN (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 10.77 (s, 2H), 7.63 (d, $J = 11.9$ Hz, 1H), 7.20 – 6.98 (m, 3H), 6.90 – 6.66 (m, 1H).

Una vez que se obtuvo la 5-aminoeosina se procedió a unirla a los polímeros mediante el procedimiento que se ilustra en el esquema 26.

Compuesto	Equivalentes	Masa (mg)	n (mmol)	PM (g/mol)	V (ml)
5-aminoeosina	1,2	7,0	0,01	706,87	
Polímero	1	100	0,008	12112	
Diisopropiletil amina	3	3,2	0,025	129,25	0,004
THF					90

Tabla 52. Cantidades de los reactivos añadidas en la reacción.



Esquema 26. Unión de la 5-aminoeosina al polímero.

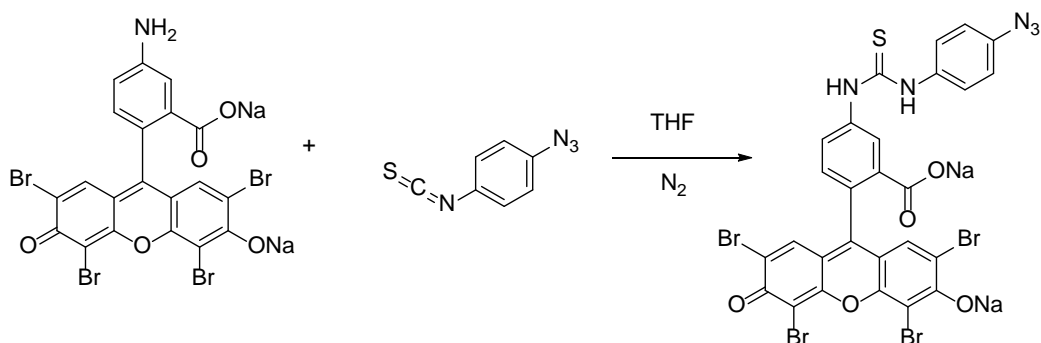
El polímero se compone de un 57,5% de vinilpirrolidona (VP), un 35,5% de acrilato de butilo (A4), 5% del cloruro de ácido del metacrilato (Cl) y un 2% de entrecruzante. Se presenta en forma de película incolora y transparente, el entrecruzante es EGDMA (dimetilacrilato de etilenglicol) y se unirá al colorante a través del cloruro de ácido. Se recorta un trozo de 0,1 g y se coloca en un kitasato de 500 ml. Bajo nitrógeno se añaden unos 80 ml de THF anhidro hasta cubrirlo. Después se añaden 7 mg de 5-aminoeosina disueltos en 10 ml de THF y por último se añade diisopropiletilamina para retirar el HCl producido en la reacción. Se deja la mezcla agitando durante un día a temperatura ambiente. Para finalizar se elimina el disolvente y se deja secar el polímero.

5.2.6. Síntesis del polímero con 5 % de entrecruzante con eosina Y

Partiendo de 100 mg (0,151 mmol) de 5-aminoeosina se añaden 30 mg (0,17 mmol) de 1-azida-4-isotiocianatobenceno en 30 ml de THF destilado. Se deja agitar toda la noche bajo nitrógeno. Obtenemos 0,117 g. Se obtuvo un rendimiento del 92%.

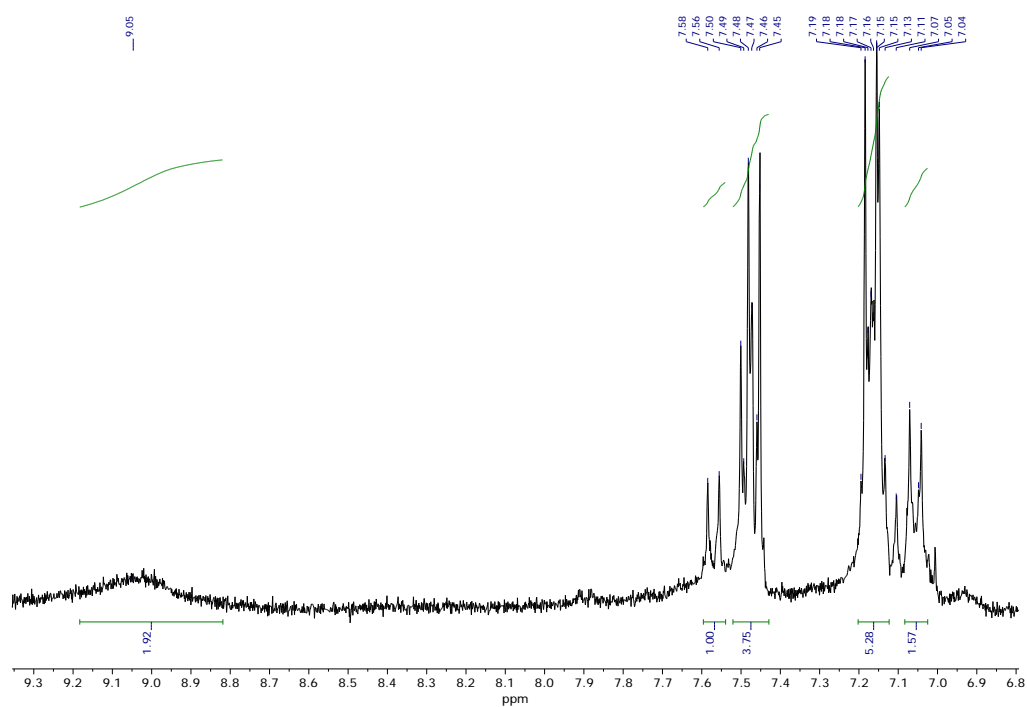
Compuesto	Equivalentes	Masa (mg)	n (mmol)	PM (g/mol)	V (ml)
5-aminoeosina	1	100	0,141	706,87	
Azida	1,2	30	0,170	176,20	
THF					30

Tabla 53. Cantidades de los reactivos añadidas en la reacción.



Esquema 27. Síntesis del producto de eosina con el grupo azida.

La caracterización por masas y RMN ^1H se encuentra a continuación:



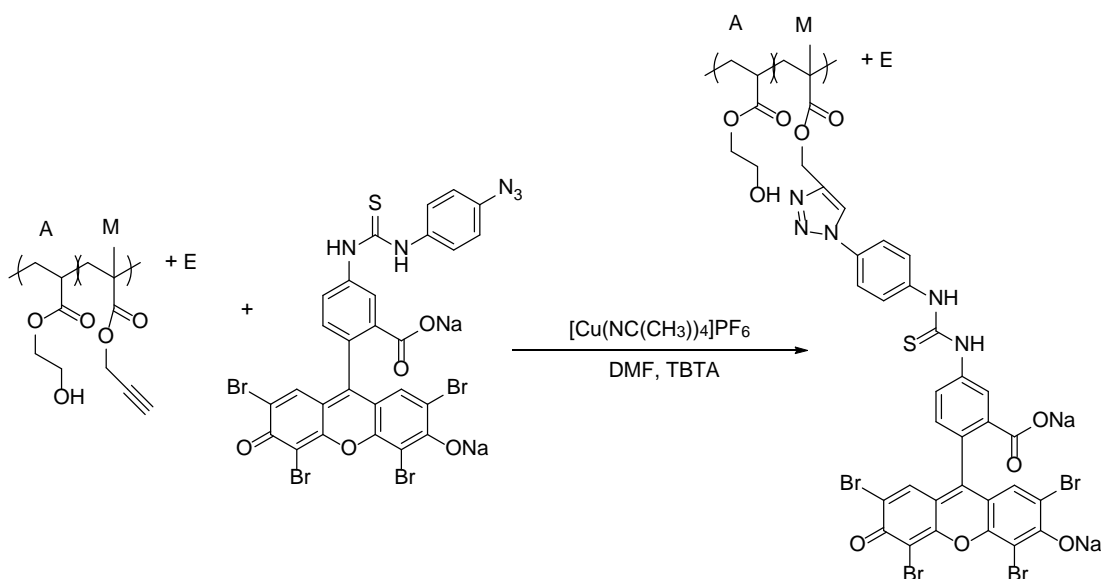
^1H RMN (300 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 9,05 (s, 2H), 7,57 (d, $J = 8,7$ Hz, 1H), 7,52 – 7,43 (m, 3H), 7,21 – 7,12 (m, 4H), 7,06 (d, $J = 8,8$ Hz, 1H).

Resultado de la espectrometría de masas: **HRMS** (MALDI): m/z teórico calculado para $\text{C}_{27}\text{H}_{13}\text{Br}_4\text{N}_5\text{O}_5\text{S}$: 838,7327 (M^+); obtenido: 838,7337.

El siguiente paso fue la unión de este producto con el polímero:

Compuesto	Equivalentes	Masa (mg)	n (mmol)	PM (g/mol)	V (ml)
5-azidaeosina	1,2	8	0,009	883,07	
Polímero	1	100	0,008	12633	
$\text{Cu}[\text{NC}(\text{CH}_3)_4]\text{PF}_6$				372,72	
TBTA				530,63	
DMF					90

Tabla 54. Cantidades de los reactivos añadidas en la reacción.



Esquema 28. Síntesis del polímero con el 5% de entrecruzante con eosina.

El polímero está formado por un 95% de acrilato de 2-hidroxietilo (A), 5% de metacrilato de propargilo (M) y un 5% de entrecruzante (E). Se encuentra en forma de filme incoloro y transparente, el entrecruzante que como en el caso anterior es EGDMA (dimetilacrilato de etilenglicol) y se unirá al colorante a través del triple enlace mediante la conocida reacción de cicloadición [3+2] de azidas a alquinos catalizada por cobre(I). Se recorta un trozo de 0,1 g como en el caso anterior y se coloca en un kitasato de 500 ml. Bajo nitrógeno se añaden unos 80 ml de DMF anhidro hasta cubrirlo. Después se añaden 8 mg de 5-aminoeosina disueltos en 10 ml de DMF y por último se añade una punta de espátula del catalizador de cobre $[\text{Cu}(\text{NC}(\text{CH}_3)_4)_4]\text{PF}_6$ y la TBTA en la reacción. Se deja la mezcla agitando durante un día a temperatura ambiente. Para finalizar se elimina el disolvente y se deja secar el polímero.

5.3. Parte experimental del capítulo 3.

5.3.1. Diseño y construcción del dispositivo de policarbonato

Al extraer las dos piezas de policarbonato, que había que unir, de la máquina de fresado la cual ha creado el canal, lo primero que se hizo es lavar y limpiar las dos piezas. Para empezar, se cubrieron con jabón, se aclararon con agua del grifo y después con agua destilada; se secó con aire a presión y después se puso en una bolsa de plástico con cierre hermético llena de isopropanol, la cual se introdujo en un baño de ultrasonidos durante veinte minutos. Después se sacó de la bolsa y se secó nuevamente con el aire a presión.

Una vez limpio se procedió al pegado de las piezas con calor y presión. Durante cuarenta minutos se tuvieron las dos piezas sometidas a 28 bares y 130 grados en la prensa de la figura 196. Esta presión, temperatura y tiempo se basaron en la experiencia de fabricación de estos dispositivos que necesitan 0,566 bares por cada cm^2 que tengan las piezas a unir. Estas piezas concretamente son cuadradas con un lado de 7 cm de longitud.



Figura 196. Fotografía de la prensa y el control de temperatura usados en la unión de las dos piezas del dispositivo. Para detalles de la fabricación ver la parte experimental.

En este proceso de unión hubo que estar controlando la presión con una palanca ya que continuamente bajaba. Se esperó durante una hora y media aproximadamente a que se enfriara lentamente y bajara la presión. La presión descendió en pocos minutos, pero la temperatura tardó casi dos horas en llegar por debajo de los 60 grados. El resultado de la unión se puede observar en la siguiente figura.

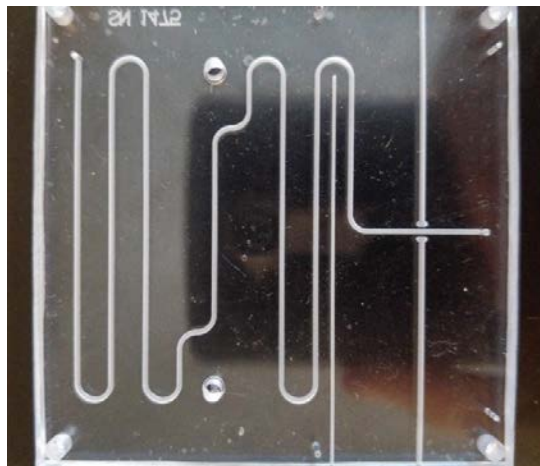


Figura 197. Nuevo dispositivo ya unido y se pueden observar pequeñas burbujas.

5.4. Parte experimental del capítulo 4.

5.4.1. Síntesis de la sonda PDI(Cor)₄ para el fullereno C₆₀

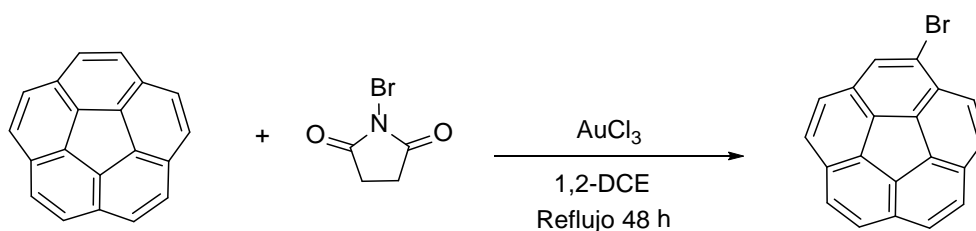
La síntesis de esta molécula consta de dos partes, la primera es la bromación del coranuleno y la segunda la síntesis del perileno con los cuatro grupos con boro. Una vez se tienen estos dos compuestos se procede al paso final que es la reacción entre ellos para formar el sensor de PDI(Cor)₄.

La síntesis del sensor entonces, se inició partiendo de la molécula de coranuleno. La primera etapa consistió en la bromación de este compuesto para obtener bromocoranuleno mediante el uso de N-bromo succinimida y AuCl₃ como catalizador¹⁴⁶ como se muestra en el esquema 29.

Compuesto	Equivalentes	Masa (mg)	n (mmol)	PM (g/mol)	V (ml)
Coranuleno	1	150	0,6	250,30	
N-Bromo succinimida	1	107	0,6	177,99	
AuCl₃	0,05	9,1	0,03	303,325	
1,2 DCE					15

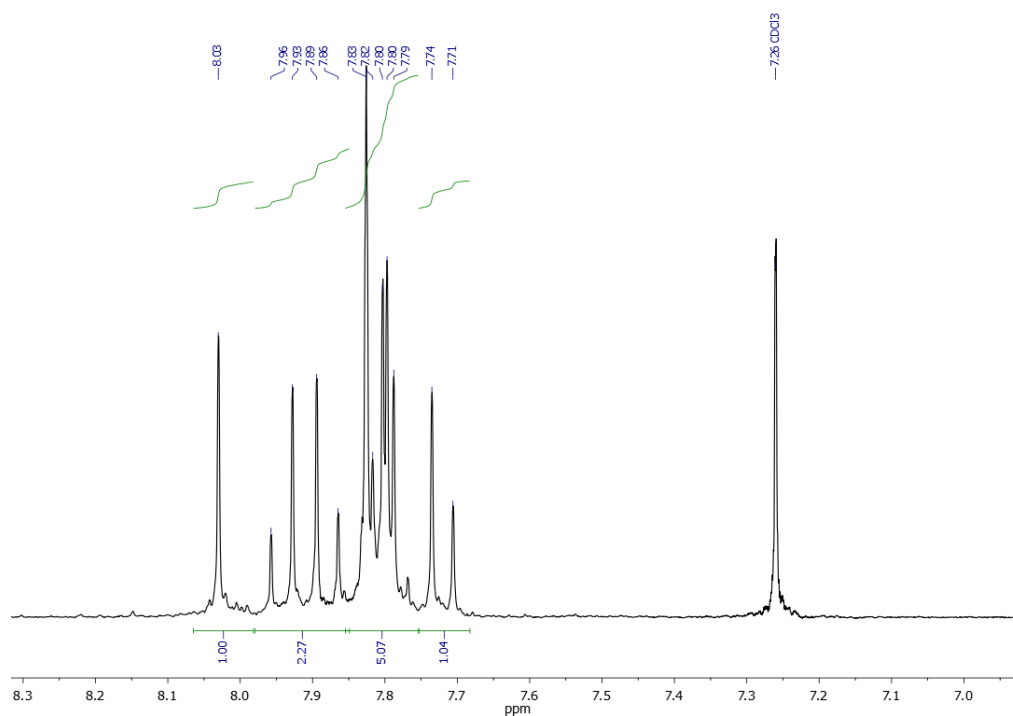
¹⁴⁶ Mo, F.; Yan, J. M.; Qiu, D.; Li, F.; Zhang, Y.; Wang, J. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2010**, 49 (11), 2028–2032.

Tabla 55. Cantidades de los reactivos añadidas en la reacción.



Esquema 29. Síntesis del bromo coranuleno.

Se disolvió el coranuleno (150mg) en 1,2-dicloroetano (15 ml) y se añadió la N-bromo succinimida (107 mg). Después se añadió el catalizador de AuCl_3 (9,1 mg) y se mantuvo a reflujo durante 2 días. La disolución se fue volviendo de color marrón. Se realizó una separación por cromatografía de capa fina para comprobar qué tal había ido la reacción. Esta se realizó en pentano y se observaron 3 manchas diferenciadas. El producto que más avanzaba en la placa fue el coranuleno multibromado el cual no interesaba, el siguiente fue el producto deseado el bromo coranuleno y por último apareció la mancha perteneciente al coranuleno sin reaccionar que sirve para una posterior bromación. Por lo tanto, se procedió a realizar una separación por columna cromatográfica en sílica gel y como eluyente pentano. El producto es un sólido de color blanco. Rendimiento: 130mg 66%.



¹H RMN (CDCl₃, 300 MHz) δ 8,03 (s, 1H), 7,98 – 7,85 (m, 2H), 7,85 – 7,75 (m, 5H), 7,72 (d, J = 8,7 Hz, 1H).

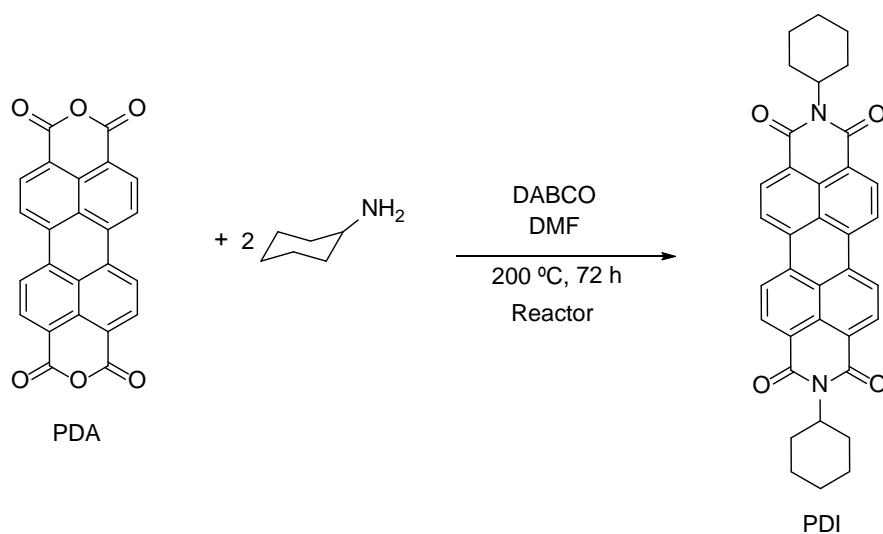
¹³C RMN (100 MHz, CDCl₃) δ 135,7, 135,5, 135,3, 134,8, 134,5, 131,8, 130,88, 130,87, 130,6, 130,0, 129,4, 128,0, 127,66, 127,65, 127,20, 127,17, 126,9, 126,4, 125,9, 121,3.

Resultado de la espectrometría de masas: HRMS (MALDI): m/z calculado para C₂₀H₉Br: 327,9888 (M⁺); encontrado: 327,9890.

El otro fragmento de la molécula final que se desea obtener es el perileno diimida. En primer lugar, se hizo reaccionar perileno con dos aminas primarias para conseguir el perileno diimida (PDI) como se puede ver en el esquema 30.

Compuesto	Equivalentes	Masa (g)	n (mmol)	PM (g/mol)	V (ml)
PDA	1	3	7,65	392,03	
Ciclohexilamina	3	2,276	22,95	99,17	2,625
DABCO	4	3,432	30,6	112,17	
DMF				73,1	120

Tabla 56. Cantidades de los reactivos añadidas en la reacción.

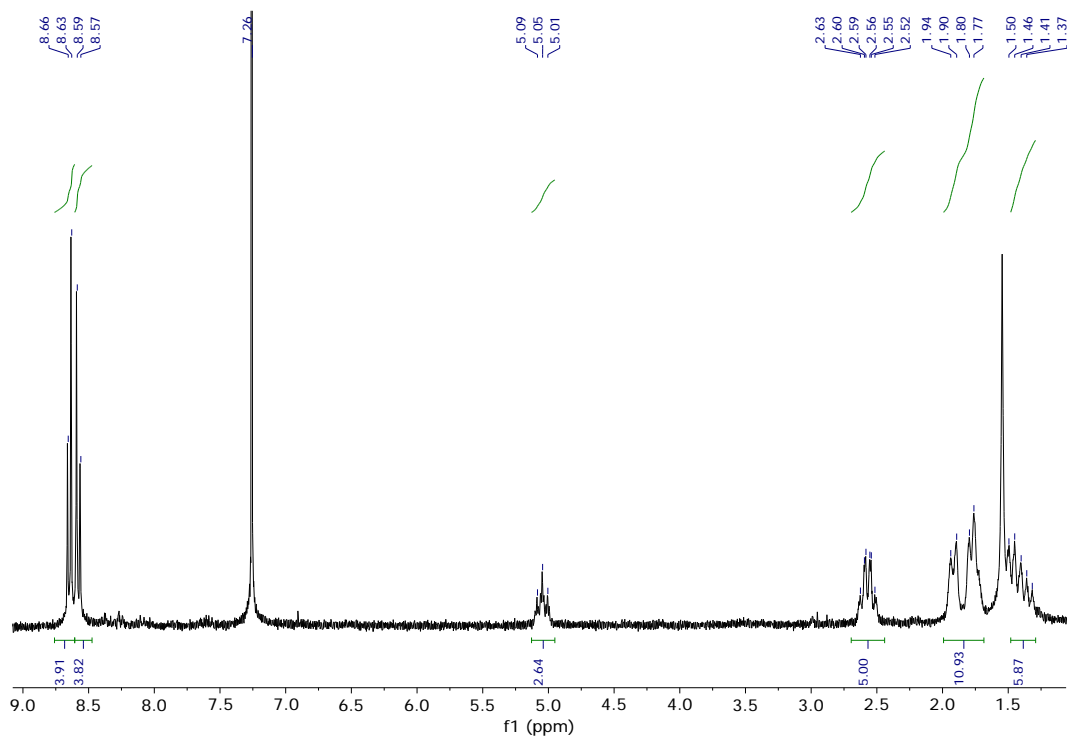


Esquema 30. Síntesis del PDI.

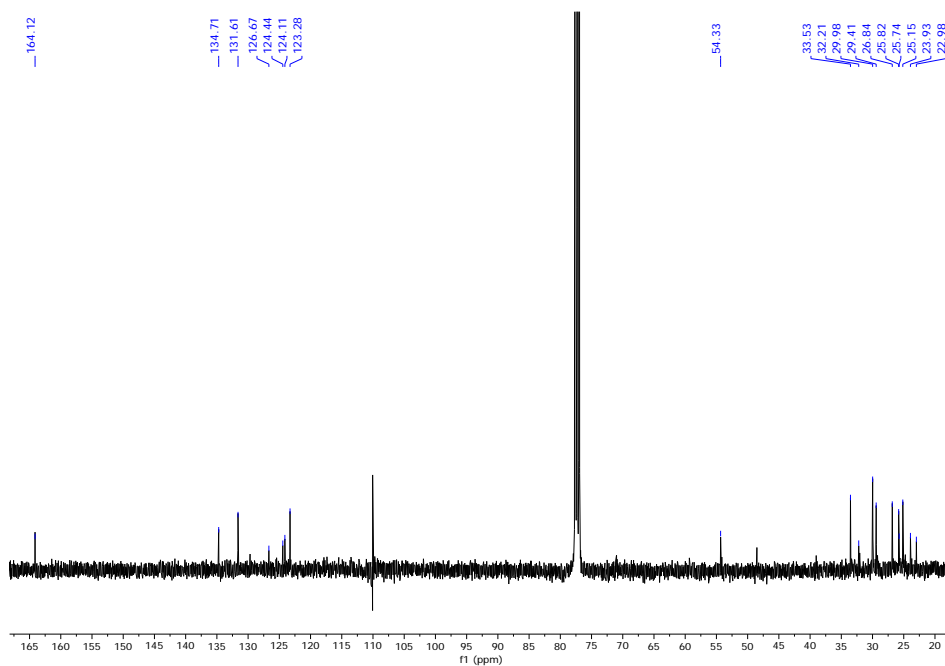
Se añadió el perileno dianhidrido (PDA, 3 g), 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octano (DABCO, 3,432) en 120 ml de dimetilformamida (DMF). Después se le añadió la ciclohexilamina (2,625 ml) y se introdujo todo en un reactor como el que se ve en la figura 198, poniéndolo a agitar. Se

subió la temperatura hasta los 200 °C y se dejó durante 3 días. Cuando habían pasado los 3 días se abrió el reactor y se trasvasó todo el contenido del vaso de reacción a un Erlenmeyer que contenía 250 ml de HCl 5 M en agua y se agitó durante 1 hora para neutralizar las aminas. Apareció un sólido rojo que es el producto. Este producto se filtró con un embudo buchner. Al realizar una prueba por cromatografía de capa fina se observó que el producto estaba casi puro y solamente había un poco de perileno monoimida (PMI) como producto secundario el cual eluía más rápido en la placa.

Rendimiento: 59% (2,5 g obtenidos).



$^1\text{H RMN}$ (CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm): 8,65 (d, $J = 8,0$ Hz, 4H), 8,58 (d, 4H, $J = 8,0$ Hz), 5,09-5,01 (m, 2H), 2,63-2,52 (m, 5H), 1,94-1,77 (m, 10H), 1,46-1,37 (m, 5H).



^{13}C RMN (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 164,1 (C=O), 134,7 (C_{Ar}), 131,6 (C_{Ar}), 126,7 (C_{Ar}), 124,4 (C_{Ar}), 124,1 (C_{Ar}), 123,3 (C_{Ar}), 54,3 (N-CH), 33,5 (CH_2), 32,2 (CH_2), 29,9 (CH_2), 29,4 (CH_2), 26,8 (CH_2), 25,8 (CH_2), 25,7 (CH_2), 25,2 (CH_2), 23,9 (CH_2), 22,9 (CH_2).

Resultado de la espectrometría de masas: HRMS (MALDI) Calculado para $\text{C}_{36}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}_4$: 554,2206 (M^+); encontrado: 554,2217.

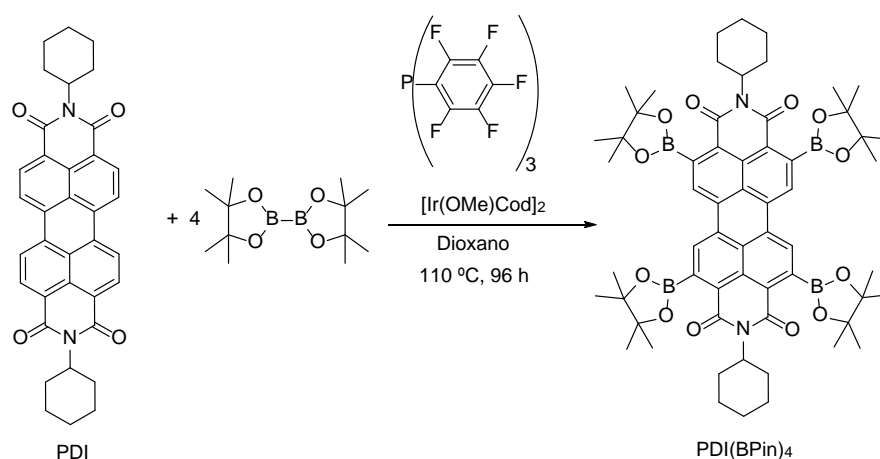


Figura 198. Reactor usado para la síntesis de PDI.

La siguiente síntesis para formar el tetra pinacolato de boro del PDI.

Compuesto	Equivalentes	Masa (mg)	n (mmol)	PM (g/mol)	V (ml)
PDI	1	200	0,36	554,65	
Bis(pinacolato) de boro	8	731	2,88	253,94	
Tris(pentafluorofenil)fosfina	0,12	23	0,04	532,15	
$[\text{Ir}(\text{OMe})\text{Cod}]_2$	0,03	7,2	0,01	662,83	
Dioxano					8

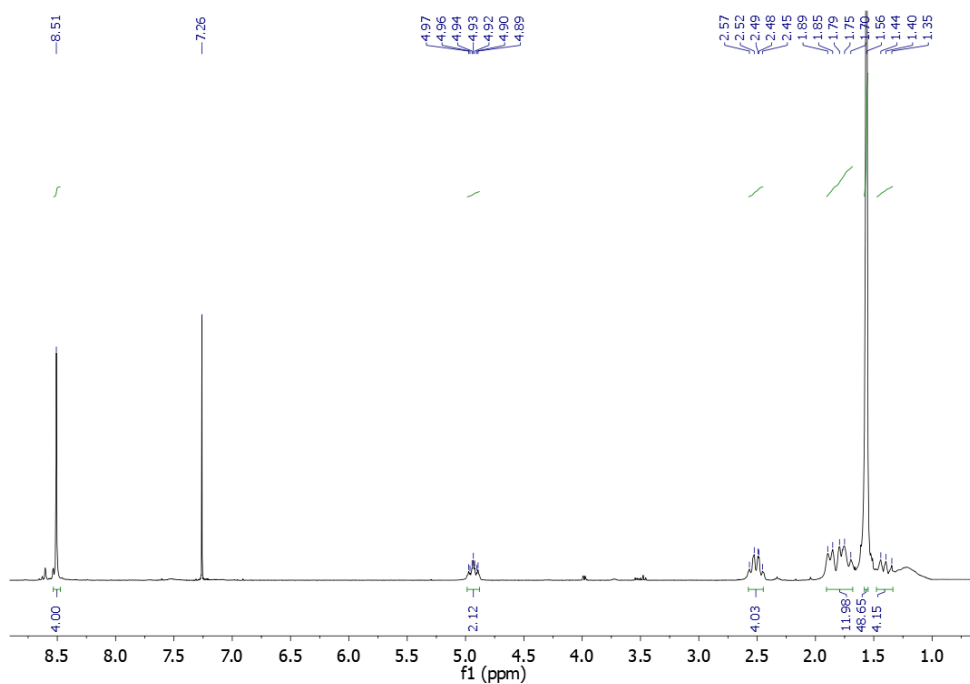
Tabla 57. Cantidades de los reactivos añadidas en la reacción.



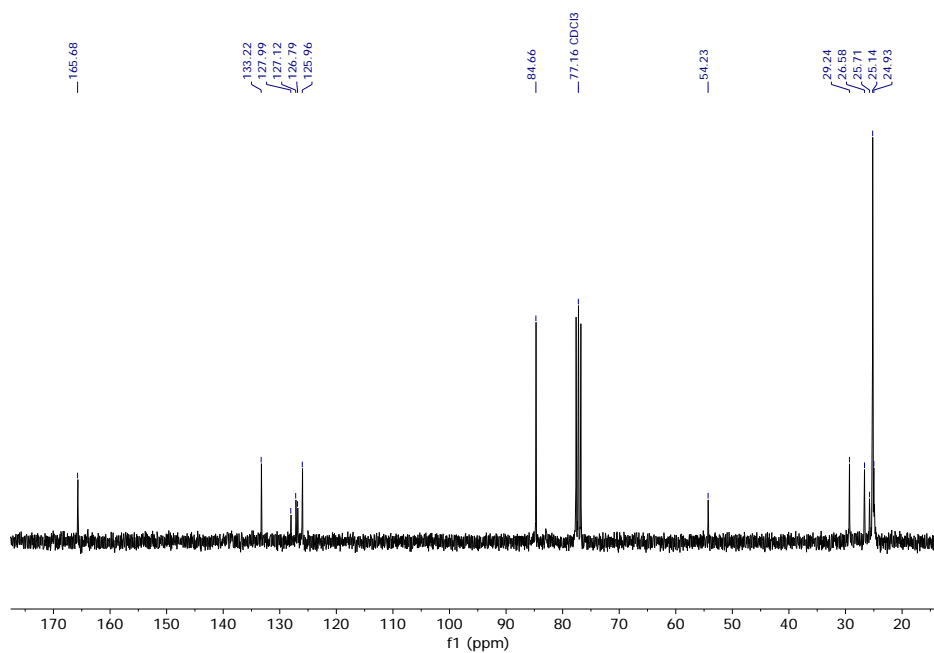
Esquema 31. Síntesis del PDI borilado.

Se colocaron los reactivos, PDI (200 mg), bis(pinacolato) de boro (B_2Pin_2 , 731 mg), tris(pentafluorofenil)fosfina (23 mg) en un matraz schlenk pequeño. Se realizó vacío/ N_2 tres veces para tenerlo todo bajo una atmósfera inerte. Después se añadió el dioxano (8 ml) al que previamente se le había burbujeado nitrógeno y el catalizador $[\text{Ir}(\text{OMe})\text{Cod}]_2$ (7,2 mg) y se dejó a reflujo a 110 °C durante 4 días. Al final la disolución adquirió un color rojo oscuro. Se eliminó el disolvente en el rotavapor y se realizó una separación por columna cromatográfica desde diclorometano puro hasta una mezcla diclorometano: acetato de etilo (50:2).

Rendimiento: 99 mg 26%.



¹H RMN (CDCl₃, 300 MHz): δ (ppm): 8,51 (s, 4H), 4,97-4,89 (m, 2H), 2,57-2,45 (m, 4H), 1,89-1,70 (m, 12H), 1,56 (s, 48H), 1,44-1,35 (m, 4H).



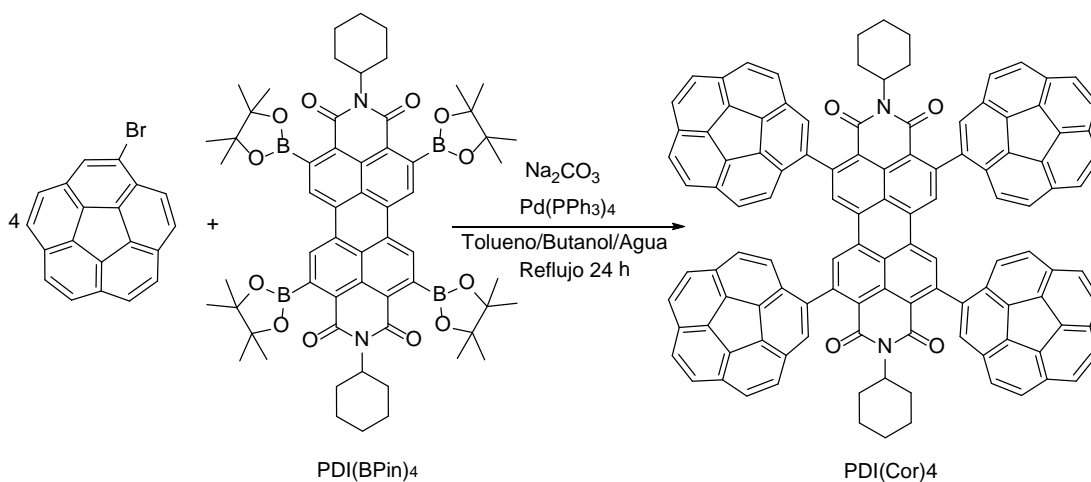
^{13}C RMN (75 MHz, CDCl_3) $\delta(\text{ppm}) = 165,68, 133,22, 127,99, 127,12, 126,79, 125,96, 84,66, 77,16, 54,23, 29,24, 26,58, 25,71, 25,14, 24,93$.

Resultado de la espectrometría de masas: **HRMS** (MALDI): calculado para $\text{C}_{60}\text{H}_{74}\text{B}_4\text{N}_2\text{O}_{12}$: 1058,5614 (M^+); encontrado: 1058,5632.

La última parte de la reacción consistió en unir el bromocoranuleno sintetizado con el derivado del perileno borilado. Esto se llevó a cabo mediante una reacción de acoplamiento de Suzuki con catalizador de paladio como se puede observar en el esquema 32.

Compuesto	Equivalentes	Masa (mg)	n (mmol)	PM (g/mol)	V (ml)
PDI(BPin)₄	1	26,5	0,025	1058,56	
Bromocoranuleno	5	41,2	0,125	329,19	
Carbonato de sodio	8	21,2	0,2	106	
Pd(PPh₃)₄	0,05	1,5	0,00125	1155,56	
Tolueno/Butanol/Agua					12/3/1,2

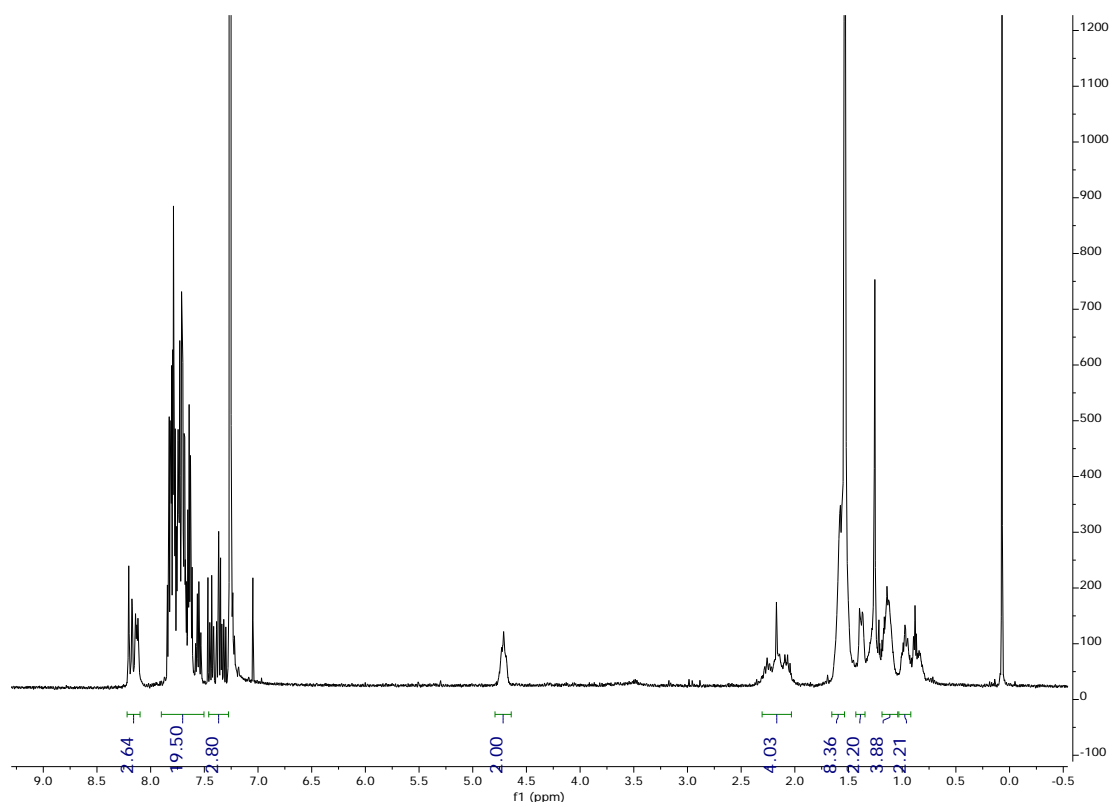
Tabla 58. Cantidades de los reactivos añadidas en la reacción.



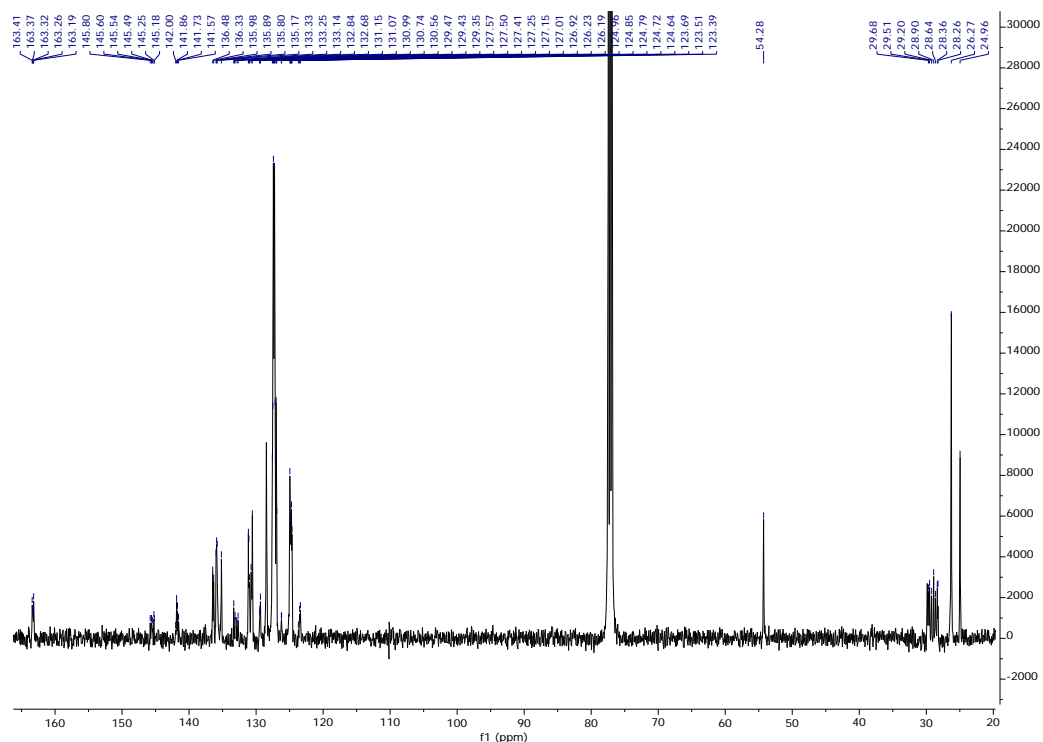
Esquema 32. Síntesis del PDI tetracoranuleno.

Se añadieron los reactivos PDI(BPin)₄ (26,5 mg), bromo coranuleno (41,2 mg) y Na₂CO₃ (21,2 mg) en un matraz schlenk bajo atmósfera de nitrógeno. Después se añadieron los disolventes tolueno/butanol/agua (12/3/1,2 ml) purgados con nitrógeno y por último el catalizador Pd(PPh₃)₄ (1,5 mg). Se puso todo bajo agitación y a reflujo durante 24 horas. Al finalizar se procedió a realizar una extracción con diclorometano. Después se hizo una purificación por columna cromatográfica comenzando con hexano para eliminar el bromo coranuleno que no había reaccionado y aumentando la polaridad añadiendo diclorometano hasta acabar con diclorometano únicamente. Se obtuvo un sólido rojo.

Rendimiento: 15%, 5,8 mg.



¹H RMN (500 MHz, Cloroformo-d) δ 8,16 (dd, J = 29,8, 13,3 Hz, 4H), 7,90 – 7,50 (m, 20H), 7,46 – 7,27 (m, 3H), 4,72 (d, J = 12,1 Hz, 2H), 2,30 – 2,03 (m, 4H), 1,58 (s, 8H), 1,38 (d, J = 14,2 Hz, 2H), 1,19 – 1,04 (m, 4H), 1,03 – 0,92 (m, 2H).



^{13}C RMN (126 MHz, CDCl_3) $\delta(\text{ppm})= 163,41, 163,37, 163,32, 163,26, 163,19, 145,80, 145,60, 145,54, 145,49, 145,25, 145,18, 142,00, 141,86, 141,73, 141,57, 136,48, 136,33, 135,98, 135,89, 135,80, 135,17, 133,33, 133,25, 133,14, 132,84, 132,68, 131,15, 131,07, 130,99, 130,74, 130,56, 129,47, 129,43, 129,35, 127,57, 127,50, 127,41, 127,25, 127,15, 127,01, 126,92, 126,23, 126,19, 124,96, 124,85, 124,79, 124,72, 124,64, 123,69, 123,51, 123,39, 54,28, 29,68, 29,51, 29,20, 28,90, 28,64, 28,36, 28,26, 26,27, 24,96.$

Resultado de la espectrometría de masas: **HRMS** (MALDI): calculado para $\text{C}_{116}\text{H}_{62}\text{N}_2\text{O}_4$: 1546,4710 (M^+); encontrado: 1546,4737.

5.5. Metodología experimental en la detección de aminas terciarias

5.5.1. Preparación de las disoluciones

Se preparan disoluciones madre de los colorantes y las aminas de concentración 10^{-4} M y de hidróxido sódico 0,1M, Se comprobó que transcurridos tres meses en el frigorífico y en ausencia de luz, las disoluciones mantenían plenamente su eficacia.

Eosina Y (sal disódica): PM= 691,85 g/mol, Se preparó una disolución madre de 10^{-4} M.

Eritrosina (sal disódica): PM = 879,86 g/mol, Se preparó una disolución madre de 10^{-4} M.

Rosa Bengal (sal disódica): PM = 1017,64 g/mol, Se preparó una disolución madre de 10^{-4} M.

Floxina (sal disódica): PM = 829,63 g/mol, Se preparó una disolución madre de 10^{-4} M.

Para suministrar medio básico se preparó una disolución madre 0,1 M de NaOH.

Las aminas estudiadas son sólidas excepto la trietanolamina, dietanolamina y la nicotina que son líquidos a temperatura ambiente.

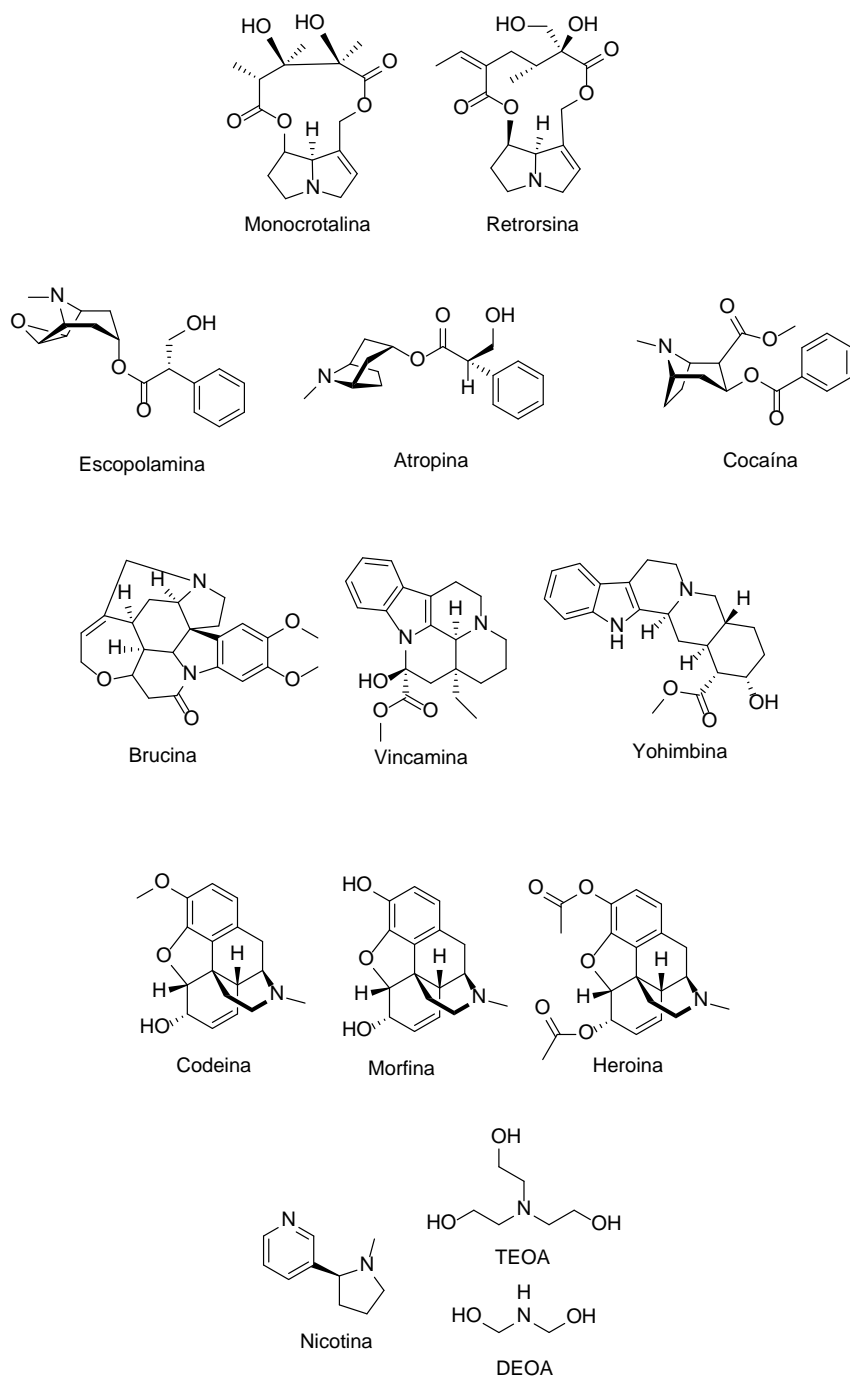


Figura 199. Fórmulas estructurales de las 14 aminas estudiadas

5.5.2. Medidas en el fluorímetro: Procedimiento habitual de medida de determinación de aminas terciarias.

-Parámetros: La longitud de onda de excitación utilizada en todos los experimentos fue $\lambda_{exc} = 495$ nm. Las ventanas del fluorímetro también se optimizan para que la intensidad de la señal esté en el mejor rango posible, ventanas = (5-5 mm), la longitud de onda de emisión cambia para cada colorante, por esta razón se escogió la longitud de onda común, $\lambda = 518$ nm para poder compararlas ya que el máximo de intensidad final estaba entre 515 y 520 nm. El rango de medida está entre 450 nm y 650 nm.

-Procedimiento general de medida:

En una cubeta de cuarzo de 1 cm de lado se añaden 25 μ L de la disolución madre de colorante, 25 μ L de NaOH y 125 μ L de la de amina, además de 2,325 ml de agua destilada, Con esto obtenemos una disolución 1 μ M de colorante, 5 μ M de amina y 1 mM de NaOH.

La cubeta está equipada con un tapón con septum por el que se pasa una aguja y se burbujea nitrógeno durante 10 minutos para desoxigenar la disolución.

Se toma una medida en el fluorímetro y se ilumina con una lámpara halógena (GE M280/FNV/CG 50W 12V | 50W GU5,3 2900K | General Electric), La cubeta se coloca a 10 cm de la fuente de luz lo que equivale a una irradiancia de unos 1300 $W \cdot m^2$ que fueron medidos con un piranómetro. Después de la iluminación se toma la segunda medida, y se vuelve a poner a iluminar tantas veces como requiera el experimento, midiendo después de cada tiempo de iluminación.

Las medidas de fluorescencia son llevadas a cabo con un fluorímetro Hitachi F-7000.

A continuación, se exponen dos figuras que muestran el proceso de iluminación y cambio de color y fluorescencia en la detección de las aminas terciarias.



Figura 200. Izquierda: Eritrosina (vial de la izquierda) y eritrosina + TEOA (vial de la derecha): (a) antes de iluminar; (b) después de iluminar; (c) bajo luz UV.



Figura 201. Izquierda: Eosina Y (vial izquierdo) y eosina Y + TEOA (vial derecho): (a) antes de iluminar; (b) después de iluminar; (c) bajo la luz UV.