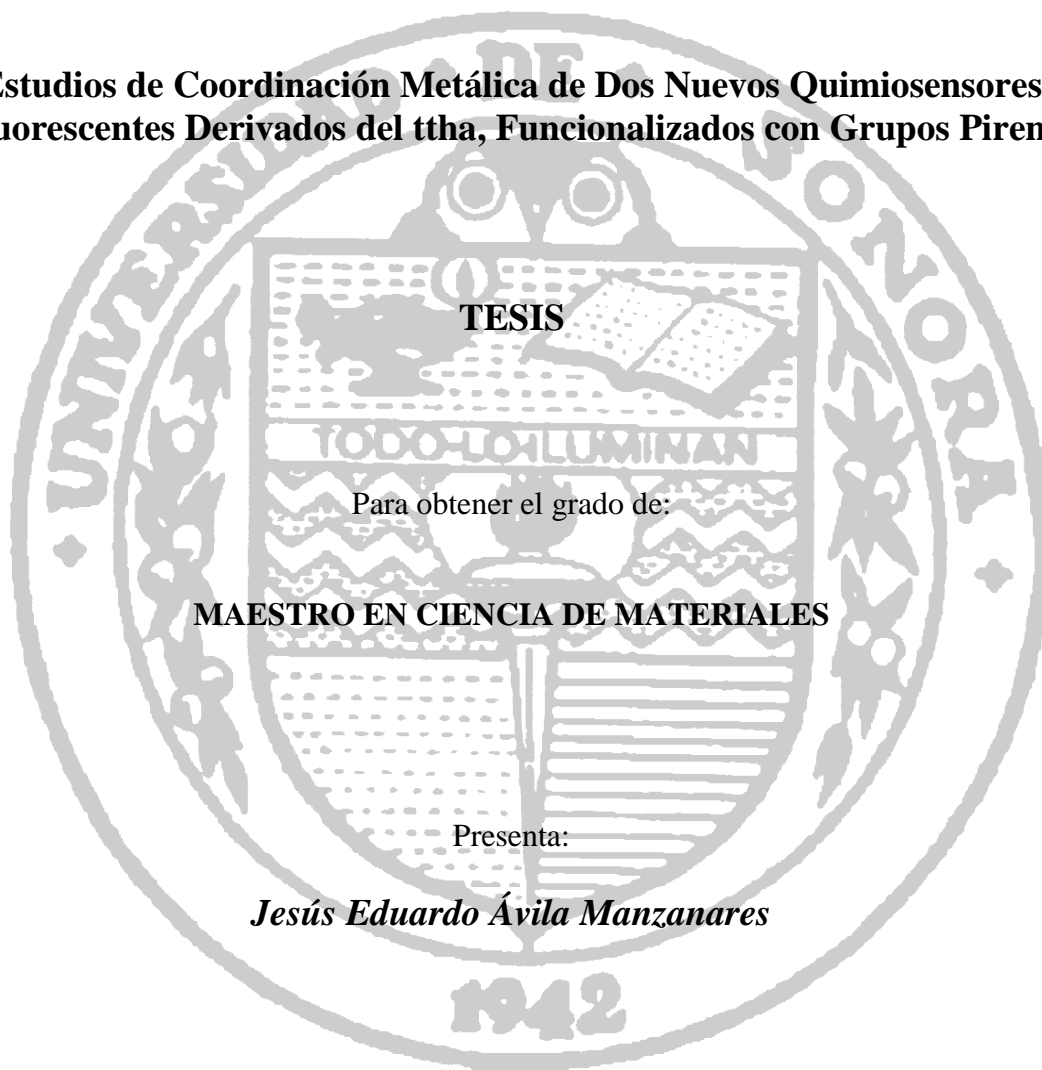


# UNIVERSIDAD DE SONORA

## DIVISIÓN DE INGENIERÍA

DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN EN POLÍMEROS Y MATERIALES

**Estudios de Coordinación Metálica de Dos Nuevos Quimiosensores  
Fluorescentes Derivados del ttha, Funcionalizados con Grupos Pireno**



**TESIS**

Para obtener el grado de:

**MAESTRO EN CIENCIA DE MATERIALES**

Presenta:

*Jesús Eduardo Ávila Manzanares*

Hermosillo, Sonora

Enero 2013

# Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos  
hará mi grandeza"**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

## ÍNDICE

<b>LISTA DE ABREVIATURAS .....</b>	<b>iii</b>
<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>iv</b>
<b>LISTA DE TABLAS .....</b>	<b>vii</b>
<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>viii</b>
Objetivo General.....	viii
Objetivos Particulares .....	viii
<b>RESUMEN .....</b>	<b>ix</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>ix</b>
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>JUSTIFICACIÓN .....</b>	<b>4</b>
<b>ANTECEDENTES .....</b>	<b>8</b>
Principios de Fluorescencia Molecular.....	8
Quimiosensores Fluorescentes.....	17
Mecanismos de Respuesta de Quimiosensores Fluorescentes.....	18
PET (transferencia electrónica fotoinducida) y EET (desactivación por transferencia de energía) .....	18
Formación de Excímeros .....	21
Aumento de la rigidez .....	25
Avances Recientes en el Desarrollo de Quimiosensores Fluorescentes de Iones Metálicos: Quimiosensores Acíclicos Tipo <i>Bis</i> -Pirenil .....	25
Quimiosensores biscromofóricos-bispirenil para Cu <sup>2+</sup> .....	26
Quimiosensores biscromofóricos-bispirenil para Hg <sup>2+</sup> .....	26
Quimiosensores biscromofóricos-bispirenil para Pb <sup>2+</sup> .....	27

Quimiosensores bismocromofóricos-bispirenil con Reconocimiento Dual.....	27
Contaminación por Metales Potencialmente Tóxicos .....	29
Estandarización de un Método Espectrofotométrico .....	31
<b>EXPERIMENTAL .....</b>	<b>32</b>
Reactivos.....	32
Metodologías .....	34
Estudio del Efecto de Coordinación Metálica en los Espectros Electrónicos de Emisión de los Ligantes (ttha1py)H <sub>4</sub> (1) y (ttha1mpy)H <sub>4</sub> (2).....	34
Estandarización del Método Analítico Para el Sistema Cu-(ttha1py)H <sub>4</sub> .....	35
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>36</b>
Estudios de Coordinación Metálica en Solución .....	36
Estudio del Efecto de Coordinación Metálica en los Espectros Electrónicos de Emisión del Ligante (ttha1py)H <sub>4</sub> (1).....	36
Espectros de Fluorescencia de los Complejos Paramagnéticos Cu- (ttha1py)H <sub>4</sub> , Ni-(ttha1py)H <sub>4</sub> y Mn-(ttha1py)H <sub>4</sub> .....	41
Espectros de Fluorescencia de los Complejos Diamagnéticos Zn- (ttha1py)H <sub>4</sub> , Pb-(ttha1py)H <sub>4</sub> , Cd-(ttha1py)H <sub>4</sub> y Hg-(ttha1py)H <sub>4</sub> .....	43
Respuesta del complejo Zn-(ttha1py)H <sub>4</sub> : Quimiosensor para Zn <sup>2+</sup> .....	44
Estudio del Efecto de Coordinación Metálica en los Espectros Electrónicos de Emisión del Ligante (ttha1mpy)H <sub>4</sub> (2).....	46
Espectros de Fluorescencia de los Complejos Paramagnéticos Cu- (ttha1mpy)H <sub>4</sub> , Ni-(ttha1mpy)H <sub>4</sub> y Mn-(ttha1mpy)H <sub>4</sub> .....	47
Espectros de Fluorescencia de los Complejos Diamagnéticos Zn- (ttha1mpy)H <sub>4</sub> , Pb-(ttha1mpy)H <sub>4</sub> , Cd-(ttha1mpy)H <sub>4</sub> y Hg-(ttha1mpy)H <sub>4</sub> .....	50
Respuesta del complejo Cd-(ttha1mpy)H <sub>4</sub> : Quimiosensor para Cd <sup>2+</sup> .....	50
Estandarización del Método Analítico Espectrofotométrico .....	51
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>53</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>55</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>64</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

dtpa	Ácido Dietilentriaminopentaacético
edta	Ácido Etilendiaminotetraacético
ttha	Ácido Trietilentetraaminohexaacético
(ttha1py) <sub>4</sub> H <sub>4</sub>	Ligante: 1,4,7,10-tetra(metilencarboxi)-1,10-bis(N-1-pirenilacetamida)-1,4,7,10-tetraazadecano
(ttha1mpy) <sub>4</sub> H <sub>4</sub>	Ligante: 1,4,7,10-tetra(metilencarboxi)-1,10-bis(N-1-pirenilmetilacetamida)- 1,4,7,10-tetraazadecano
I <sub>f</sub>	Intensidad de fluorescencia
I <sub>E</sub>	Intensidad de excímero
I <sub>M</sub>	Intensidad de monómero
[L]	Concentración de ligante
[M <sup>2+</sup> ]	Concentración de metal
I <sub>0</sub>	Intensidad de fluorescencia inicial
I	Intensidad de fluorescencia final
HOMO	Orbital molecular ocupado de más alta energía.
LUMO	Orbital molecular no ocupado de más baja energía.
PET	Transferencia electrónica fotoinducida
EET	Desactivación por transferencia de energía
λ <sub>emi</sub>	Longitud de onda de emisión
λ <sub>exc</sub>	Longitud de onda de excitación
Figura A <sub>1</sub>	Figura 1 encontrada en la parte de anexos

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura</b>		<b>Pag.</b>
1	Representación esquemática de: a) tipos de quimiosensores fluorescentes. b) de un quimiosensor bis-cromofórico.....	3
2	Representación esquemática de los distintos estados, donde la flechas representan la orientación del espín .....	9
3	Diagrama parcial de energía para un sistema fotoluminiscente.....	11
4	Espectros de excitación y emisión de quinina.....	12
5	Electrones enlazantes y no enlazantes del formaldehído y los niveles de energía moleculares electrónicos posibles.....	15
6	Esquema del reconocimiento molecular mediante transferencia electrónica fotoinducida (PET).....	20
7	Formación de excímero, con la representación de las bandas correspondientes del monómero y excímero.....	23
8	Dependencia de la fluorescencia del pireno en solución de ciclohexano como función de la concentración. Concentraciones (nM): A, 10; B, 7.75; C, 5.5; D, 3.25; E, 1.0; F, 0.1. Se observan las bandas características de la unidad monomérica del pireno (370 y 400 nm) y las bandas correspondientes al excímero de pireno (aprox. a los 488 nm).....	24
9	Quimiosensores de tipo biscromofóricos-bispirenil. Los cuales presentan una selectividad a iones metálicos.....	28
10	Cambios en la intensidad de fluorescencia de la banda de emisión de excímero de (tthalpy)H <sub>4</sub> ( <b>1</b> ) y (tthalmpy)H <sub>4</sub> ( <b>2</b> ) en presencia de 1 equivalente de varios iones metálicos a pH 7.9 (buffer MOP'S); [ <b>1</b> ]= 1.0 x10 <sup>-6</sup> M, λ <sub>em</sub> = 480 nm y [ <b>2</b> ]= 5.0 x10 <sup>-7</sup> M, λ <sub>em</sub> = 480 nm.....	37

11	Cambios en la intensidad de fluorescencia de la banda de emisión de monómero de (ttha1py)H <sub>4</sub> ( <b>1</b> ) y (ttha1mpy)H <sub>4</sub> ( <b>2</b> ) en presencia de 1 equivalente de varios iones metálicos a pH 7.9 (buffer MOP'S); [ <b>1</b> ]= 1.0 x10 <sup>-6</sup> M y [ <b>2</b> ]= 5.0 x10 <sup>-7</sup> M; λ <sub>em</sub> = 395 nm.....	38
12	Cambios en la intensidad de fluorescencia de la banda de emisión de excímero y de monómero del ligante (ttha1mpy)H <sub>4</sub> en presencia de 1 equivalente de varios iones metálicos a pH 7.9 (buffer MOP'S); [L]= 1.0 x10 <sup>-6</sup> M, λ <sub>em</sub> = 480 nm (excímero), 395 nm (monómero); λ <sub>ex</sub> = 342 nm.....	39
13	Cambios en la intensidad de fluorescencia, [(I-I <sub>0</sub> )/I <sub>0</sub> ] (I <sub>E</sub> = figuras llenas y I <sub>M</sub> =figuras vacías) del ligante (ttha1py)H <sub>4</sub> en función de la razón [M]/[L]. [L]= 1.0x10 <sup>-6</sup> M, pH 7.9 (buffer MOP'S), T=25°C. Las intensidades se muestran como I <sub>E</sub> y I <sub>M</sub> normalizadas.....	42
14	Cambios en la intensidad de fluorescencia, [(I-I <sub>0</sub> )/I <sub>0</sub> ] (I <sub>E</sub> = figuras llenas y I <sub>M</sub> =figuras vacías) del ligante (ttha1py)H <sub>4</sub> en función de la razón [M]/[L]. [L]= 1.0x10 <sup>-6</sup> M, pH 7.9 (buffer MOP'S), T=25°C. Las intensidades se muestran como I <sub>E</sub> y I <sub>M</sub> normalizadas.....	45
15	Cambios en la intensidad de fluorescencia de la banda de emisión de excímero y de monómero del ligante (ttha1mpy)H <sub>4</sub> en presencia de 1 equivalente de varios iones metálicos a pH 7.9 (buffer MOP'S); [L]= 5.0 x10 <sup>-7</sup> M, λ <sub>em</sub> = 475 nm (excímero), 395 nm (monómero); λ <sub>ex</sub> = 342 nm.....	48
16	Cambios en la intensidad de fluorescencia, [(I-I <sub>0</sub> )/I <sub>0</sub> ] (I <sub>E</sub> = figuras llenas y I <sub>M</sub> =figuras vacías) del ligante (ttha1mpy)H <sub>4</sub> en función de la razón [M <sup>2+</sup> ]/[L]. [L]= 5.0x10 <sup>-7</sup> M, pH 7.9 (buffer MOP'S), T=25°C. Las intensidades se muestran como I <sub>E</sub> y I <sub>M</sub> normalizadas.....	49
17	Cambios en la intensidad de fluorescencia, [(I-I <sub>0</sub> )/I <sub>0</sub> ] (I <sub>E</sub> = figuras llenas y I <sub>M</sub> = figuras vacías) del ligante (ttha1mpy)H <sub>4</sub> en función de la razón [M <sup>2+</sup> ]/[L]. [L]= 5.0x10 <sup>-7</sup> M, pH 7.9 (buffer MOP'S), T=25°C. Las intensidades se muestran como I <sub>E</sub> y I <sub>M</sub> normalizadas.....	52
A <sub>1</sub>	Espectros de emisión de los ligantes a) (ttha1py)H <sub>4</sub> y b) (ttha1mpy)H <sub>4</sub> (normalizada), en solución acuosa a diferentes valores de pH. En los recuadros se muestran las variaciones de las intensidades de excímero normalizadas en función del pH (■ experimental, — calculada).....	55

- A<sub>2</sub> Espectros de emisión obtenidos en las titulaciones espectroscópicas de (ttha1py)H<sub>4</sub> con: a) Cu<sup>2+</sup>; b) Ni<sup>2+</sup>; c) Mn<sup>2+</sup>. La relación molar  $[M^{2+}]/[L]$  varía desde 0 hasta 4.  $[L]=1.0 \times 10^{-6}$  M; pH 7.9, T=25°C;  $\lambda_{ex}=340$  nm. Recuadros: Variación de la intensidad de excímero ( $I_E$ ) en función de la razón molar  $[M^{2+}]/[ttha1py]$  de 0-4..... 56
- A<sub>3</sub> Espectros de emisión obtenidos en las titulaciones espectroscópicas de (ttha1py)H<sub>4</sub> con: a) Zn<sup>2+</sup>; b) Pb<sup>2+</sup>; c) Cd<sup>2+</sup>; d) Hg<sup>2+</sup>. La relación molar  $[M^{2+}]/[L]$  varía desde 0 hasta 4.  $[L]=1.0 \times 10^{-6}$  M; pH 7.9, T=25°C;  $\lambda_{ex}=340$  nm. Recuadros: en a) Variación de la razón  $I_E/I_M$  en función  $[Zn^{2+}]/[ttha1py]$  de 0-2. en b), c) y d) variación de la intensidad de excímero ( $I_E$ ) en función  $[M^{2+}]/[ttha1py]$  de 0-4..... 57
- A<sub>4</sub> Espectros de emisión obtenidos en las titulaciones espectroscópicas de (ttha1mpy)H<sub>4</sub> con: a) Cu<sup>2+</sup>; b) Ni<sup>2+</sup>; c) Mn<sup>2+</sup>. La relación molar  $[M^{2+}]/[L]$  varía desde 0 hasta 4.  $[L]=5.0 \times 10^{-7}$  M; pH 7.9, T=25°C;  $\lambda_{ex}=342$  nm. Recuadros: Variación de la intensidad de excímero ( $I_E$ ) en función de la razón molar  $[M^{2+}]/[ttha1mpy]$  de 0-4..... 58
- A<sub>5</sub> Espectros de emisión obtenidos en las titulaciones espectroscópicas de (ttha1mpy)H<sub>4</sub> con: a) Zn<sup>2+</sup>; b) Pb<sup>2+</sup>; c) Cd<sup>2+</sup>; d) Hg<sup>2+</sup>. Variando la relación molar  $[M^{2+}]/[L]$  varía desde 0 hasta 4.  $[L]=5.0 \times 10^{-7}$  M; pH 7.9, T=25°C;  $\lambda_{ex}=342$  nm. Recuadros: en a) y c) variación de la razón  $I_E/I_M$  en función  $[M^{2+}]/[ttha1mpy]$ ; en b) y d) variación de la intensidad de excímero ( $I_E$ ) en función  $[M^{2+}]/[ttha1mpy]$ ..... 59



**LISTA DE TABLAS**

<b>Tabla</b>		<b>Pag.</b>
1	Longitudes de onda de fluorescencia de hidrocarburos aromáticos en solución.....	16
2	Cambios en la Intensidad de las Bandas de Emisión de los ligantes (ttha1py)H <sub>4</sub> y (ttha1mpy)H <sub>4</sub> (%) por efecto de la Coordinación Metálica (adición de 1 eq. de metal).....	40

## OBJETIVOS

### Objetivo General

Evaluar las propiedades fluorescentes ante la coordinación metálica de dos ligantes acíclicos bis-cromofóricos derivados de ttha funcionalizados con grupos pireno: 1,4,7,10-tetra(metilencarboxi)-1,10-bis(N-1-pirenilacetamida)-1,4,7,10-tetraazadecano [(ttha1py)H<sub>4</sub>, **1**] y 1,4,7,10-tetra(metilencarboxi)-1,10-bis(N-1-pirenilmetilacetamida)-1,4,7,10-tetraazadecano [(ttha1mpy)H<sub>4</sub>, **2**].

### Objetivos Particulares

- Llevar a cabo estudios de coordinación con los ligantes **1** y **2** en solución acuosa dirigidos hacia los cationes metálicos divalentes Cu, Ni, Zn, Mn, Cd, Pb y Hg, mediante espectroscopia de fluorescencia.
- Evaluar la capacidad de los ligantes **1** y **2** de actuar como sensores fluorescentes de los metales estudiados y su posible utilización en la detección y/o cuantificación de dichos analitos.
- Estandarizar el método analítico para el sistema metal-ligante que presente mejor respuesta y un mayor coeficiente de correlación; con el propósito de establecer la capacidad de aplicación del material en la determinación cuantitativa del metal en medio acuoso.

## RESUMEN

En este trabajo se llevaron cabo estudios de coordinación metálica en solución acuosa de dos ligantes acíclicos bis-cromofóricos derivados del ácido trietilentetraaminohexaacético (ttha): (ttha1py)H<sub>4</sub> y (ttha1mpy)H<sub>4</sub> mediante espectroscopia de fluorescencia. Los cationes metálicos incluidos en este estudio fueron: Cu<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup>, Pb<sup>2+</sup> y Hg<sup>2+</sup>. Además, se realizó la estandarización del método analítico para el sistema Cu-(ttha1py)H<sub>4</sub>.

Ambos ligantes en su forma libre muestran bandas de emisión de pireno monomérico entre 375 y 395 nm, así como una banda ancha con máximo a 488 nm atribuida a excímeros de pireno. La coordinación con todos los metales estudiados provocó apagamiento de la emisión de excímero, tanto para el ligante (ttha1py)H<sub>4</sub> como para el ligante (ttha1mpy)H<sub>4</sub>. Se encontró que este efecto fue más significativo en el caso de (ttha1py)H<sub>4</sub> con respecto a su análogo (ttha1mpy)H<sub>4</sub>. En cuanto a la emisión de monómero, los ligantes presentaron diferentes respuestas: En el caso del ligante (ttha1py)H<sub>4</sub> el ion Zn<sup>2+</sup> fue el único que indujo un aumento de intensidad de dicha banda, observándose así una respuesta radiométrica ( $I_E/I_M$ ), lo que sugiere la posible aplicación del (ttha1py)H<sub>4</sub> para detección y cuantificación de Zn<sup>2+</sup> en medios acuosos. El ligante (ttha1mpy)H<sub>4</sub> no mostró selectividad dentro del grupo de metales estudiados. Sin embargo, dentro del grupo de metales pesados (Pb<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup> y Hg<sup>2+</sup>), el ligante muestra una respuesta radiométrica solo con el ion Cd<sup>2+</sup>, con el aumento de intensidad de la emisión de monómero. Este resultado es de gran importancia debido a que son pocos los quimiosensores que muestran una respuesta radiométrica a Cd<sup>2+</sup> en medio acuoso.

En la estandarización del método analítico del sistema Cu-(ttha1py)H<sub>4</sub>, se encontró que el límite de detección del instrumento fue de  $\leq 5 \times 10^{-9}$  M con una correlación de  $r = -0.9833$ . Dicho método analítico tuvo una exactitud=96.4% y precisión=  $4.82 \times 10^{-9}$  M  $\pm 5.29 \times 10^{-10}$  M. Los valores obtenidos cumplen con la norma NMX-AA-051-SCFI-2001 para la verificación de un método analítico para la detección de metales.

## ABSTRACT

In the present work was carried out studies of metallic coordination on aqueous solutions of two ligands acyclic bis-chromophoric derivatives of triethylenetetraminehexaacetic acid (ttha): (ttha1py)H<sub>4</sub> and (ttha1mpy)H<sub>4</sub> by fluorescence spectroscopy. The cationic metals included in this study were: Cu<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup>, Pb<sup>2+</sup> y Hg<sup>2+</sup>. We also performed the standardization of the analytical method for the system Cu-(ttha1py)H<sub>4</sub>.

Both ligands in their free form show the pyrene monomeric bands of emission between 375 and 395 nm, and a broad band with a maximum at 488 nm attributed to pyrene excimer. The coordination with all the metals studied caused the quenching of excimer emission band, both as the ligand (ttha1py)H<sub>4</sub> as for the ligand (ttha1mpy)H<sub>4</sub>. We found that this effect was more significant in the case of (ttha1py)H<sub>4</sub> in respect of this analogous (ttha1mpy)H<sub>4</sub>. Regarding the emission of monomer, the ligands showed different responses: In the case of the ligand (ttha1py)H<sub>4</sub> the Zn<sup>2+</sup> ion was the only that induces increased intensity of the band, thus we observed ratiometric response ( $I_E/I_M$ ), suggesting the possible application of (ttha1py)H<sub>4</sub> for detection and quantification of Zn<sup>2+</sup> in aqueous environments. The ligand (ttha1mpy)H<sub>4</sub> did not show selectivity among the group of metals studied. However, among the group of heavy metals (Pb<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup> y Hg<sup>2+</sup>), the ligand show a ratiometric response only with the Cd<sup>2+</sup> ion, with increasing intensity of the monomeric emission. This result is very important because there are few chemosensors that show ratiometric response to Cd<sup>2+</sup> in aqueous environments.

In the standardization of the analytic method of the system Cu-(ttha1py)H<sub>4</sub>, was found that the detection limit of the instrument was  $\leq 5 \times 10^{-9}$  M with a correlation of  $r = -0.9833$ . This analytical method have exactitude of 96.4% and a precision of  $4.2 \times 10^{-9} \text{ M} \pm 5.29 \times 10^{-10}$  M. The values obtained complied with the norm NMX-AA-051-SCFI-2001 for the verification for an analytical method for the detection of metals.

## INTRODUCCIÓN

Los metales tienen una gran importancia para nuestra sociedad, tanto en el ámbito industrial y de desarrollo tecnológico, como desde el punto de vista de la salud. A nivel biológico, los metales cumplen funciones de gran importancia. Por ejemplo, metales como el cinc, cobre, hierro y níquel juegan un papel importante como elementos traza en reacciones bioquímicas y en el metabolismo humano. Estos metales son inocuos en bajas concentraciones, pero son tóxicos en concentraciones mayores a las requeridas. Por otro lado, metales como plomo, mercurio, plata y cadmio son llamados venenos metabólicos por su alta toxicidad para los organismos.<sup>[1, 2]</sup>

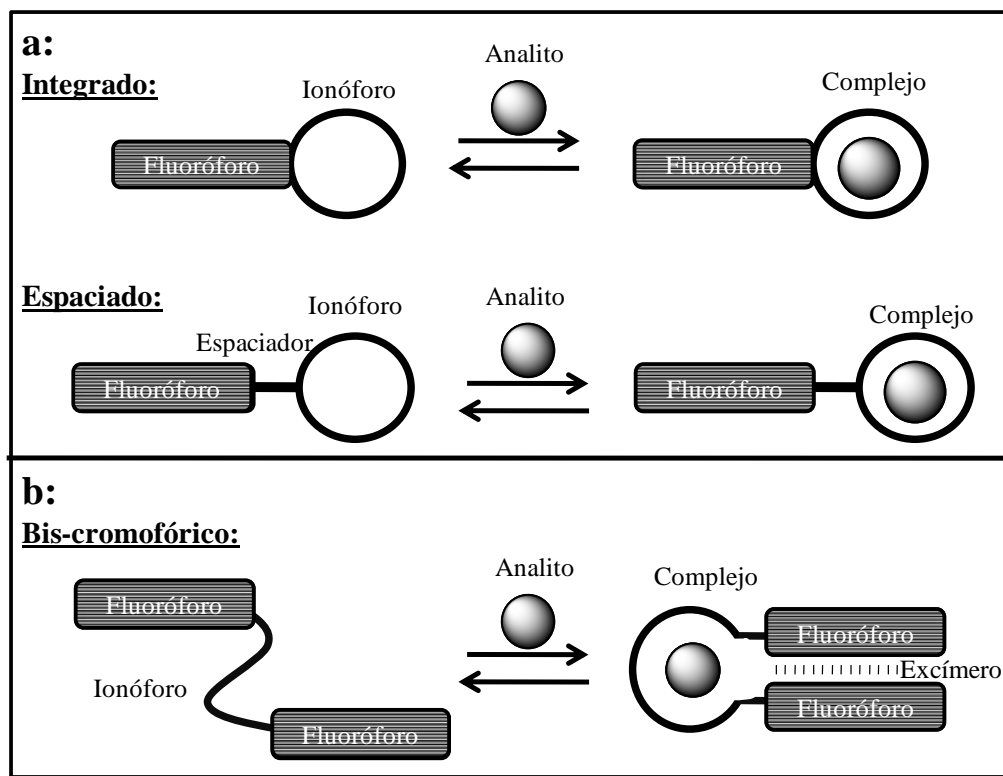
El contacto humano con los cationes metálicos se produce a través del agua y los alimentos, normalmente a dosis bajas, pero su toxicidad a lo largo de la historia se ha expresado sobre todo por una exposición profesional. Particularmente, los alrededores de los establecimientos mineros muestran niveles altos de contaminación por metales pesados. Por consiguiente, es importante detectar y cuantificar estos iones metálicos aun cuando se encuentren en concentraciones bajas para evaluar riesgos de salud y para el monitoreo ambiental.

Actualmente existen diversos métodos analíticos para la detección de cationes metálicos, como son la fotometría de flama, análisis de activación de neutrones y la espectroscopia de absorción atómica. Este último es uno de los métodos experimentales más utilizados. Estas técnicas presentan una gran selectividad y sensibilidad, sin embargo son técnicas caras y generalmente sofisticadas que dificultan la medición en tiempo real.<sup>[3]</sup>

Un enfoque atractivo y de actualidad en la detección y determinación de metales es el uso de métodos basados en la espectroscopia de fluorescencia, por las diversas ventajas que ésta ofrece en cuanto a selectividad, sensibilidad, bajo costo y mediciones en tiempo real. En este sentido, en las últimas décadas se ha tenido un auge importante el diseño de nuevas moléculas con la capacidad de detectar especies metálicas utilizando a la fluorescencia como técnica de medición. A este tipo de moléculas sintéticas se les denomina quimiosensores fluorescentes.

Comúnmente, los quimiosensores fluorescentes están constituidos de una unidad receptora (ionóforo) y una unidad activa (fluoróforo), las cuales pueden estar integradas en una sola unidad molecular o bien puede estar enlazadas entre sí a través de un espaciador (Figura 1a). Recientemente los estudios se han enfocado en el diseño de un tipo de quimiosensores fluorescentes, denominados *bis-cromofóricos*, constituidos por la unión de dos fluoróforos idénticos a través de una cadena de interconexión con propiedades quelantes (Figura 1b). En este tipo de compuestos la unión con el analito puede inducir cambios conformacionales que favorezcan el acercamiento de los grupos fluoróforos y la formación de excímeros (del inglés *excited dimers*).<sup>[2, 4]</sup>

Los excímeros presentan bandas de emisión a mayor longitud de onda y suelen ser más anchas, cuando se comparan con las bandas de emisión del propio fluoróforo (emisión del monómero), por lo que son fácilmente distinguibles en el espectro.<sup>[2]</sup> En un compuesto bis-cromofórico adecuadamente diseñado la unión con el analito provoca que la emisión de monómero disminuya de intensidad en la medida que la emisión de excímero aumenta, o viceversa. La respuesta radiométrica observada (variación en la razón  $I_E/I_M$ ) tiene un gran potencial analítico, ya que puede autocalibrarse reduciendo al mínimo los errores experimentales, en relación con el monitoreo de una señal simple de intensidad de fluorescencia, que puede verse afectada por otros factores externos.<sup>[5-7]</sup>



**Figura 1.** Representación esquemática de: a) tipos de quimiosensores fluorescentes. b) de un quimiosensor bis-cromofórico.

Fuente: [2, 11]

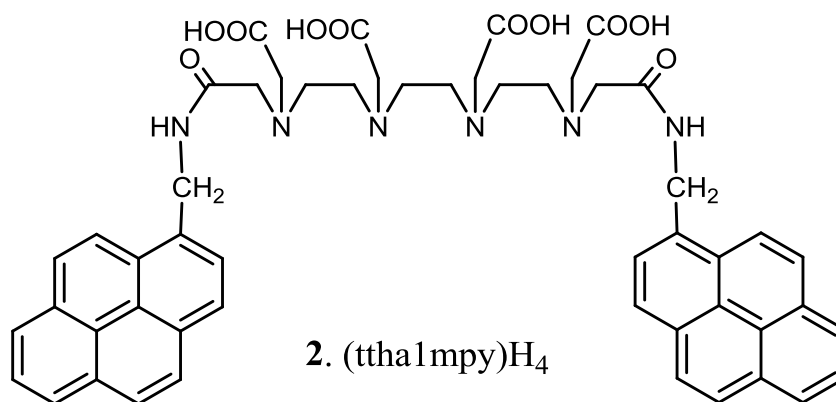
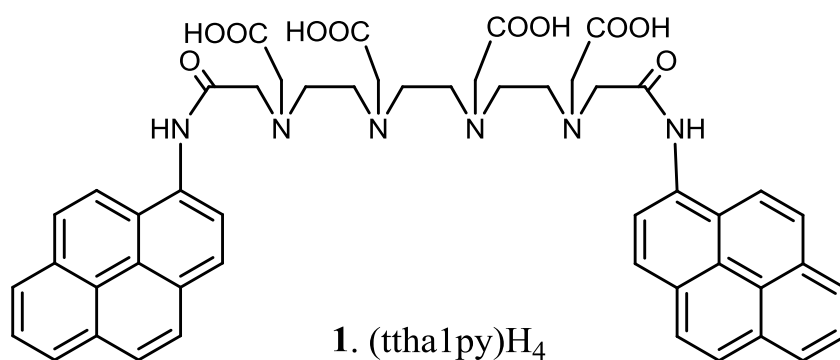
## JUSTIFICACIÓN

El grupo de Química Supramolecular (QS) del Departamento de Investigación en Polímeros y Materiales de la Universidad de Sonora (DIPM-UNISON) reportó recientemente la síntesis de seis nuevos ligantes acíclicos bis-cromofóricos solubles en agua derivados de edta, dtpa y ttha, funcionalizados con grupos pireno.<sup>[8,9]</sup> Estos compuestos forman excímeros intramoleculares de pireno en medio acuoso, cuya intensidad de emisión varía con el pH del medio. Debido a esta propiedad dichos ligantes han sido propuestos como sensores de pH.<sup>[10]</sup>

Dentro del grupo de compuestos derivados de pireno destacan los derivados de ttha, (ttha1py)<sub>4</sub> y (ttha1mpy)<sub>4</sub> (**1** y **2**, **Esquema I**). Los ligantes **1** y **2** son solubles en agua, con solubilidad del orden de ~0.2 mM (pH ≥ 8.0), debido principalmente a la presencia de los cuatro grupos aniónicos carboximetil de la cadena de ttha, lo que los coloca en ventaja sobre otros ligantes previamente reportados. Los espectros de emisión en agua de ambos ligantes a pH ≥ 8.0 presentan bandas típicas de pireno monomérico localizadas entre 375 y 395 nm y una intensa banda de excímero (dímero de estado excitado) con un máximo alrededor de 480 nm. La eficiente formación de excímero en estas moléculas es atribuible a la flexibilidad de las cadenas de interconexión y a la facilidad de los grupos pireno de formar dímeros, tanto en el estado basal como en el estado excitado.<sup>[10]</sup>

Estudios previos realizados por nuestro grupo de investigación<sup>[9-11]</sup> muestran que la fluorescencia de los ligantes **1** y **2** es sensible a las condiciones de pH del medio. Esta propiedad se correlacionó con cambios en el estado de protonación de las moléculas. A pH ≥ 11, ambos ligantes se encuentran totalmente desprotonados y presentan la máxima emisión de excímero. Al disminuir el pH, la formación de especies protonadas provoca una disminución de la intensidad de emisión a 480 nm. En el caso del ligante **2** la disminución es gradual en toda la ventana de pH, mientras que para ligante **1** se





**Esquema I**

observaron máximos en el perfil de Intensidad de fluorescencia ( $I_F$ ) vs pH que coinciden con la existencia de las diferentes especies protonadas determinadas por potenciometría.

Para ambos ligantes, la especie monoprotonada  $LH^{3-}$  predomina en el intervalo de pH:  $7.5 \leq \text{pH} \leq 9.5$ . En esta región de pH, la intensidad de fluorescencia presenta una zona amplia de máxima intensidad, lo cual permite elegir un pH apropiado para realizar estudios de coordinación metálica.

Estudios de coordinación preliminares,<sup>[11]</sup> realizados en solución a pH 7.9, demuestran que la fluorescencia del ligante **1** es sensible a la presencia de los iones metálicos  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  y  $\text{Zn}^{2+}$ . En las titulaciones espectroscópicas con los iones  $\text{Cu}^{2+}$  y  $\text{Ni}^{2+}$ , el ligante **1** mostró un apagamiento de la intensidad, tanto de la banda de emisión del monómero como de la banda de emisión de excímero. El apagamiento de ambas bandas de emisión se atribuyó a la naturaleza paramagnética que presentan dichos metales, los cuales tienen la capacidad de llevar a cabo mecanismos de transferencia de energía (ET, del inglés *energy transfer*) o transferencia de electrones (PET, del inglés *photoinduced electron transfer*).<sup>[2]</sup> En contraste, con el ion  $\text{Zn}^{2+}$ , el ligante mostró una respuesta radiométrica ( $I_E/I_M$ ), es decir, la intensidad de emisión del excímero disminuye y la intensidad de emisión del monómero aumenta con el incremento de la concentración del metal. Se considera que la respuesta radiométrica observada es debida a cambios conformacionales del ligante al ocurrir la coordinación los cuales favorecen el traslape de las unidades pireno, ya que este metal es un ion diamagnético y no tiene la capacidad de llevar a cabo procesos de transferencia electrónica PET ni de transferencia de energía que extingan la intensidad de fluorescencia.

Con base en lo anterior, en el presente trabajo de investigación se planteó llevar a cabo un estudio de coordinación más completo, que incluya a los dos ligantes *bis*-pirenil derivados de ttha: (ttha1py)H<sub>4</sub> y (ttha1mpy)H<sub>4</sub>, así como a un grupo amplio de cationes metálicos de transición y post-transición, tanto paramagnéticos como diamagnéticos. Los cationes metálicos seleccionados para este estudio fueron: Mn<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup>, Hg<sup>2+</sup> y Pb<sup>2+</sup>.

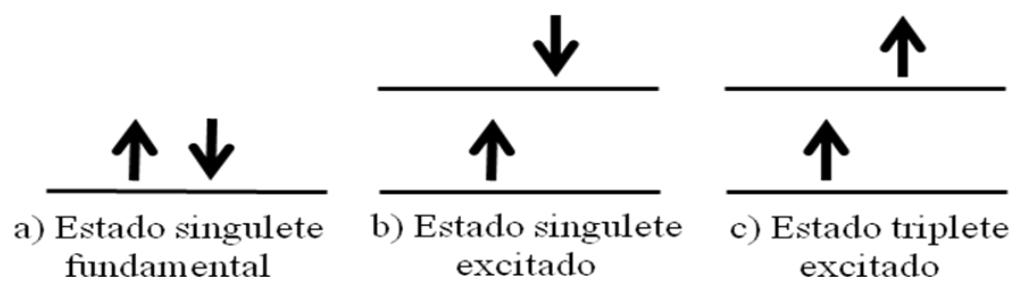
Se evaluó la capacidad de los ligantes **1** y **2** de actuar como sensores fluorescentes de los iones Mn, Ni, Cu y Zn, los cuales son de gran importancia biológica, ya que juegan papeles fundamentales en los seres vivos, tales como participación en procesos metabólicos, composición de proteínas, expresión de genes, etc. Así mismo, se evaluó la respuesta de **1** y **2** hacia los iones Cd, Hg y Pb, por su alta toxicidad y daño que ocasionan en organismos como animales y plantas. Con base en los resultados obtenidos en los diferentes sistemas ligante-metal, se seleccionó el que presentó mejor respuesta, con el objetivo de estandarizar el método analítico para la determinación cuantitativa del metal por el ligante.

## ANTECEDENTES

### Principios de Fluorescencia Molecular

La fotoluminiscencia comprende básicamente dos tipos de fenómenos: la fluorescencia y la fosforescencia. En ambos casos, las moléculas de analito son fotoexcitadas para dar especies cuyo espectro de emisión suministra información para el análisis cualitativo y cuantitativo.<sup>[12]</sup>

La absorción de un fotón del rango ultravioleta o visible promueve un electrón desde un estado fundamental a un estado excitado con la conservación de la orientación del espín. Por ejemplo, cuando un par de electrones ocupan el mínimo estado basal electrónico, los cuales tienen espines opuestos (apareados) (Figura 2a), se dice que están en un *estado singulete fundamental*. La absorción de un fotón promueve uno de los electrones a un *estado singulete excitado* (Figura 2b). La emisión de un fotón desde un estado singulete excitado al estado singulete fundamental se le conoce como fluorescencia. El tiempo de vida del electrón en el estado singulete excitado es de  $10^{-5}$ - $10^{-8}$  s por consiguiente, la fluorescencia decrece rápidamente después de que la fuente de la excitación es retirada. En algunos casos un estado singulete excitado es transformado a un *estado triplete excitado* (Figura 2c) en donde el espín del electrón invierte su orientación y queda desapareado con el electrón del estado fundamental. La emisión entre un estado triplete excitado y un estado singulete fundamental se le llama fosforescencia. El tiempo de vida de la fosforescencia es de  $10^{-4}$ - $10^4$  s, por lo que la fosforescencia puede continuar durante algún tiempo después de que se retira la fuente de la excitación.



**Figura 2.** Representación esquemática de los distintos estados, donde la flechas representan la orientación del espín.

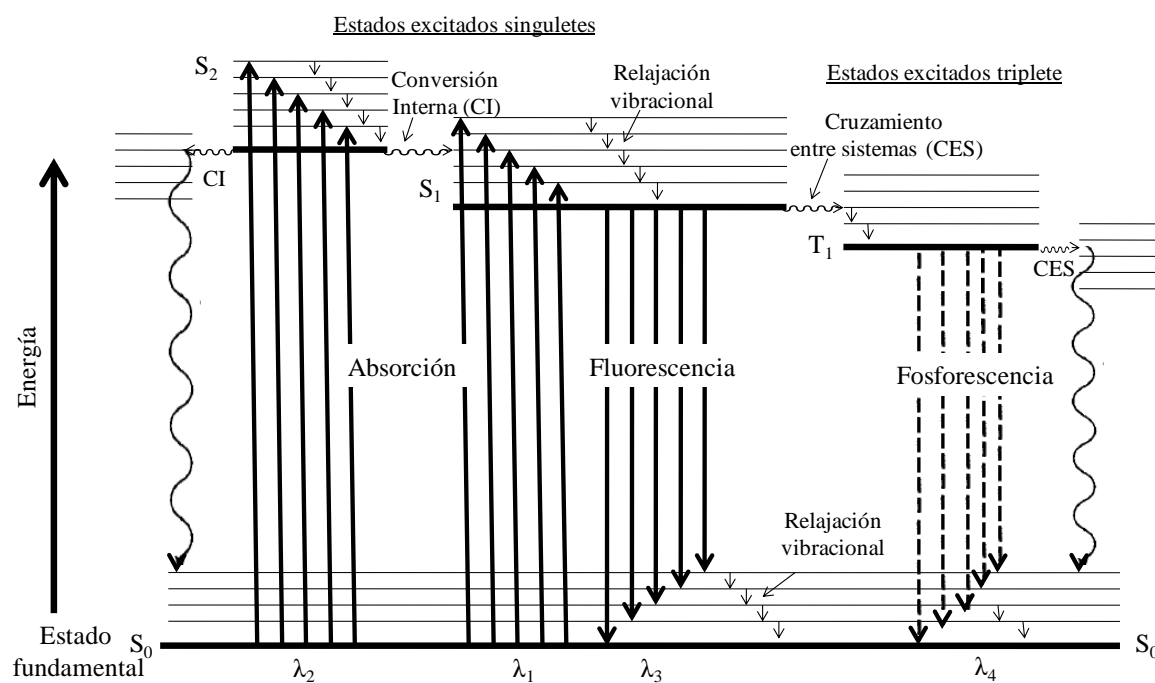
Fuente: [12]

En la Figura 3 se muestra el diagrama parcial de niveles de energía para una molécula fotoluminiscente. La línea horizontal gruesa que se encuentra en la parte inferior de la figura representa la energía del estado fundamental de la molécula, que normalmente es un estado *singulete* y se designa  $S_0$ . Las líneas gruesas superiores son los niveles de energía de los estados vibracionales fundamentales de los tres estados electrónicos excitados: *singuletes* primero ( $S_1$ ) y segundo ( $S_2$ ) y *triplete* primero ( $T_1$ ). A cada uno de los cuatro estados electrónicos están asociados numerosos niveles de energía vibracionales, los cuales se representan por las líneas delgadas.<sup>[12]</sup>

La absorción de un fotón de energía correcta excita la molécula a uno de los estados electrónicos excitados y ésta puede volver a su estado fundamental mediante una combinación de varios procesos, entre los que se encuentran la fluorescencia y la fosforescencia (líneas rectas verticales sólidas y segmentadas de la Figura 3), que conllevan la emisión de un fotón de radiación.

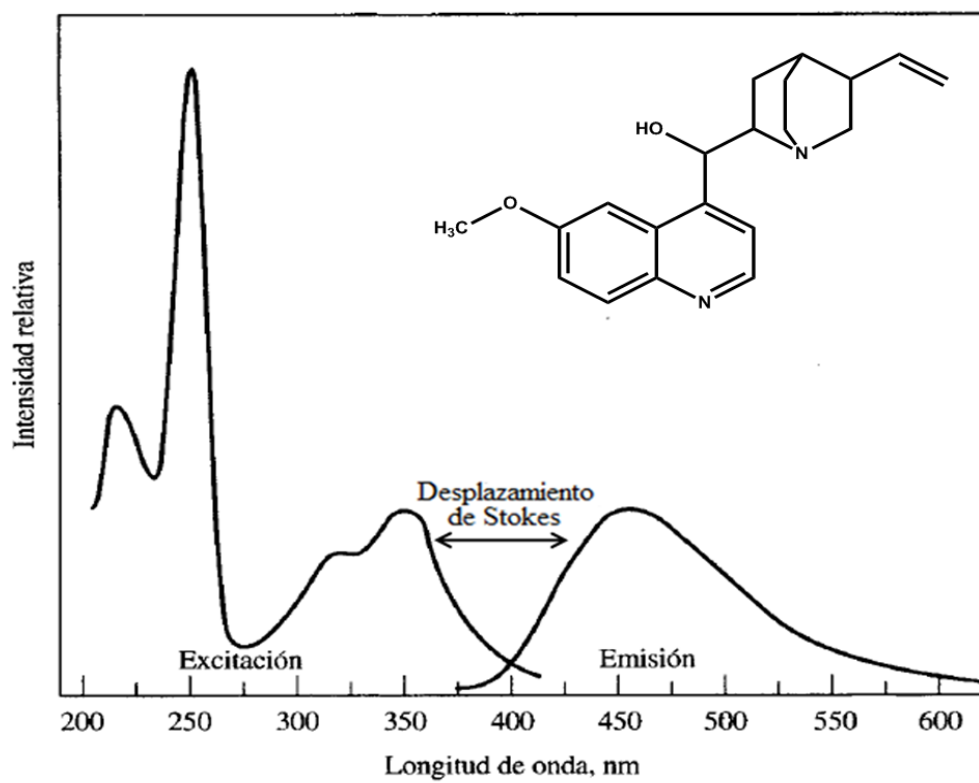
Otros procesos de desactivación son los no-radiativos. Entre los que se encuentran la *relajación vibracional*, *conversión interna* y el *cruzamiento entre sistemas*. Mediante la *relajación vibracional* una molécula puede caer a cualquiera de los diversos niveles vibracionales como consecuencia de colisiones entre las moléculas de especies excitadas. Esta forma de relajación es muy eficiente, prueba de ello es que la mayoría de las moléculas no son fluorescentes; además, que las bandas de emisión siempre se observan desplazadas hacia longitudes de ondas más largas respecto a las bandas de absorción. Este fenómeno es conocido como desplazamiento de Stokes (Figura 4).<sup>[12]</sup>

El termino *conversión interna* describe los procesos intermoleculares por los cuales la molécula pasa a un estado electrónico de igual multiplicidad pero de más baja energía sin emisión de radiación. Este proceso es particularmente eficaz cuando dos niveles de energía electrónicos están lo suficientemente próximos como para que haya un solapamiento de los niveles de energía vibracional. Esta situación es la que presentan los



**Figura 3.** Diagrama parcial de energía para un sistema fotoluminiscente.

Fuente: [12]



**Figura 4.** Espectros de excitación y emisión de quinina.

Fuente: [12]



dos estados singulete excitados en la Figura 3. Como lo muestran los solapamientos, las energías potenciales de los dos estados excitados son idénticas; esta igualdad permite, aparentemente, una transición eficaz.

La desactivación de un estado electrónico excitado puede incluir la interacción y la transferencia de energía entre la molécula excitada y el disolvente u otros solutos. Estos procesos se llaman conversión externa o amortiguación colisional. La evidencia más fuerte de la conversión externa es el marcado efecto que ejerce el disolvente sobre la intensidad de la fluorescencia, así como condiciones experimentales que tienden a reducir el número de colisiones entre partículas (bajas temperaturas) que generalmente aumentan la fluorescencia.<sup>[12]</sup>

El *cruzamiento entre sistemas* es un proceso en el cual se invierte el espín de un electrón excitado y por tanto ocurre la transformación de un estado singulete a triplete o viceversa. Al igual que en la conversión interna, la probabilidad de esta transición aumenta si los niveles vibracionales de los dos estados se solapan. La transición singulete/triplete que se muestra en la Figura 3 es un ejemplo; el estado vibracional singulete más bajo se solapa con uno de los niveles vibracionales triplete más elevados y así es más probable un cambio de espín.

El camino más propicio hacia el estado fundamental es aquel que minimiza el tiempo de vida del estado excitado. Por ello, si la desactivación por fluorescencia es más rápida que los procesos no radiantes, se observa tal emisión.<sup>[12]</sup>

La fotoluminiscencia está limitada a un número relativamente pequeño de sistemas que incorporan características estructurales adecuadas, o bien que se encuentran en un medio propicio, que hacen que la velocidad de los procesos de relajación o desactivación no radiantes se reduzcan hasta el punto en el que la emisión puede competir cinéticamente con ellos.<sup>[13]</sup>

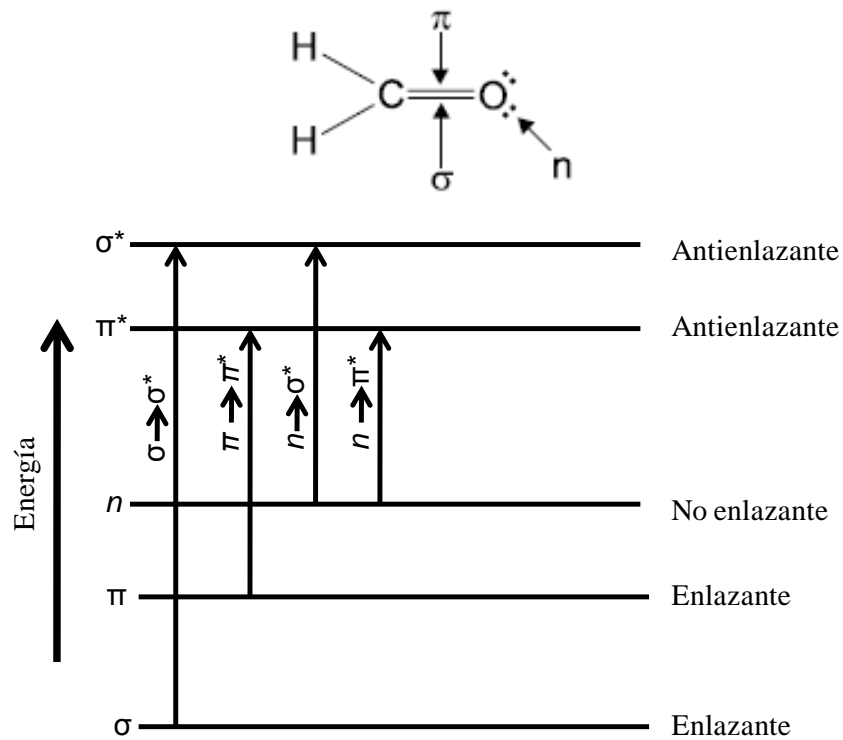
La fluorescencia rara vez es consecuencia de la absorción de radiación ultravioleta de longitud de onda menor de 250 nm, ya que tal radiación es suficientemente energética como para producir el rompimiento de enlaces en algunas moléculas. Por consecuencia la fluorescencia no es debida a transiciones  $\sigma \rightarrow \sigma^*$ , ya que requieren de más energía, por lo tanto la fluorescencia se restringe a transiciones  $n \rightarrow \pi^*$  o  $\pi \rightarrow \pi^*$ , que están asociadas a los procesos menos energéticos (Figura 5). Sin embargo, las transiciones  $\pi \rightarrow \pi^*$  son las más frecuentes asociadas a la fluorescencia debido a que el tiempo de vida es más corto ( $10^{-9}$  a  $10^{-7}$  s, comparado con el de una transición  $n \rightarrow \pi^*$  que es  $10^{-7}$  a  $10^{-5}$  s) y es menos probable que tengan lugar los procesos de desactivación que compiten con la fluorescencia.

Los espectros fotoluminiscentes son de dos tipos: espectros de *excitación* y *emisión*.

**Espectros de excitación.** Se obtiene midiendo la intensidad luminiscente a una longitud de onda fija mientras se varía la longitud de onda de excitación.

**Espectros de emisión.** Se obtienen irradiando a una longitud de onda fija mientras se registra la intensidad de la emisión como función de la longitud de onda.

Las principales compuestos que presentan fluorescencia son los que contienen grupos funcionales aromáticos que pueden presentar transiciones  $\pi \rightarrow \pi^*$  de baja energía. Conforme aumenta el número de anillos bencénicos conjugados en la molécula, los espectros de absorción y fluorescencia tienden a desplazarse a mayores longitudes de onda, además que se observa un incremento en las intensidades de las bandas tanto absorción, como de fluorescencia (Tabla 1).<sup>[12]</sup>



**Figura 5.** Electrones enlazantes y no enlazantes del formaldehído y los niveles de energía moleculares electrónicos posibles.

Fuente: [12]

**Tabla 1.** Longitudes de onda de fluorescencia de hidrocarburos aromáticos en solución.

<b>Hidrocarburo</b>	<b>Longitudes de onda fluorescente (<math>\lambda_{nm}</math>)</b>
Benceno	270 – 310
Naftaleno	300 – 365
Antraceno	372 – 460
Fenantreno	348 – 407 (348, 366, 385, 407)
Pireno	370 – 400
Fluoreno	302 – 370 (máxima 302, 325)

Fuente: [12]

## Quimiosensores Fluorescentes

Un quimiosensor es una molécula sintética capaz de unir selectiva y reversiblemente al analito de estudio con un consecuente cambio en una o más de las propiedades del sistema. En el caso de los quimiosensores fluorescentes, la propiedad que cambia es la fluorescencia.<sup>[14]</sup>

El diseño de quimiosensores fluorescentes con propiedades novedosas ha tomado mayor importancia por la alta demanda de estos compuestos en la química analítica, bioquímica clínica, medicina, monitoreo ambiental, etc. Esto debido a que numerosos analitos químicos y bioquímicos pueden ser detectados por métodos fluorescentes. Entre los analitos de interés se encuentran: cationes metálicos ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ , etc.), aniones orgánicos e inorgánicos (citratos, carboxilatos, fosfatos, ATP, etc.), moléculas neutras (glucosa, urea, etc.) y gases ( $\text{O}_2$ ,  $\text{CO}_2$ ,  $\text{NO}$ , etc.).<sup>[2]</sup>

La mayoría de los quimiosensores fluorescentes reportados en la literatura están constituidos de una unidad receptora (ionóforo) y una unidad activa (fluoróforo), las cuales pueden estar integradas en una sola unidad molecular o bien pueden estar enlazadas entre sí a través de un espaciador (Figura 1a). El mecanismo de respuesta más común de estos compuestos es la transferencia electrónica fotoinducida (*PET*, de *Photoinduced Electron Transfer*). La fluorescencia puede encenderse por efecto de la complejación o bien puede extinguirse. La unidad activa (fluoróforo) juega un rol central en el desarrollo de quimiosensores. Los hidrocarburos aromáticos han sido extensamente utilizados, debido a que muestran buena emisión de fluorescencia.<sup>[2, 4]</sup>

Un diseño novedoso de quimiosensores fluorescentes de metales es la unión de dos fluoróforos idénticos a través de una cadena de interconexión con propiedades quelantes (Figura 1b). En este tipo de compuestos, denominados *bis-cromofóricos*, la unión con el analito puede inducir cambios conformacionales que favorezcan el acercamiento de los

grupos fluoróforos y la formación de excímeros (de *excited dimers*, dímeros de estado excitado). Estas especies originan bandas de emisión desplazadas hacia el rojo, fácilmente distinguibles de la emisión normal de monómero, la cual típicamente disminuye de intensidad en la medida que la emisión de excímero aumenta. La respuesta radiométrica observada (variación en la razón  $I_E/I_M$ ) tiene un gran potencial analítico ya que puede autocalibrarse reduciendo al mínimo los errores experimentales.<sup>[5-7]</sup>

### **Mecanismos de Respuesta de Quimiosensores Fluorescentes**

Existen diferentes procesos que permiten utilizar como señal de respuesta la variación de la intensidad de la fluorescencia tras el proceso de coordinación:<sup>[13]</sup>

- PET (transferencia electrónica fotoinducida)
- EET (desactivación por transferencia de energía).
- Formación de Excímeros.
- Aumento de la rigidez.

PET (transferencia electrónica fotoinducida) y EET (desactivación por transferencia de energía)

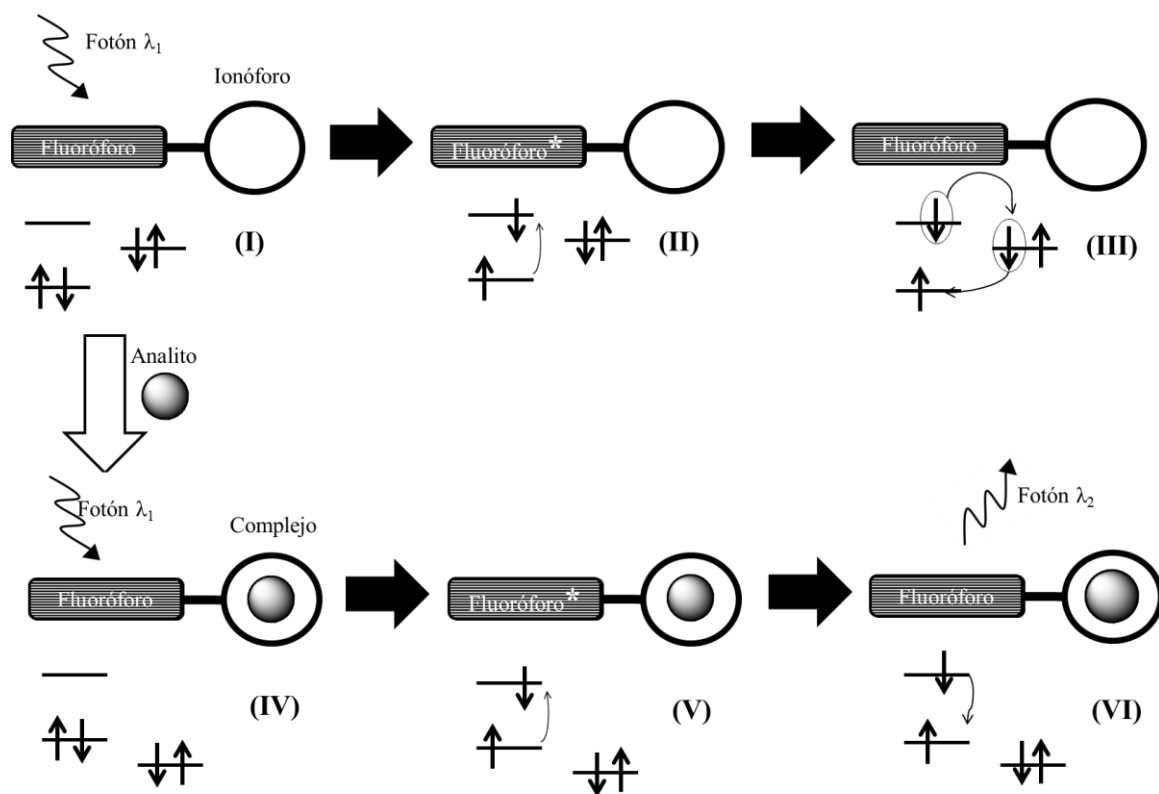
En la Figura 6 se encuentra esquematizado el proceso PET, en donde la molécula en estado fundamental (I) es excitada con luz, lo que consigue promover un electrón desde el orbital molecular ocupado de más alta energía (HOMO) al orbital molecular no ocupado de más baja energía (LUMO) para dar el estado excitado (II). Sobre este esquema básico de orbitales moleculares puede suceder que un orbital de otra parte de la molécula, por ejemplo del centro coordinante, o de otra entidad molecular tenga una energía intermedia entre la del HOMO y la del LUMO del fluoróforo. Una nueva

transferencia electrónica desde el LUMO del fluoróforo al orbital externo restaura el estado fundamental (III). Siguiendo esta secuencia (I→III) se produce una desactivación del estado excitado de forma no radiante. Lo que se observa a nivel macroscópico es una baja intensidad de emisión o ausencia total de fluorescencia.<sup>[13]</sup>

Cuando se produce la coordinación con un determinado analito (IV) se reordenan los niveles energéticos de los orbitales del receptor. Si el sistema está diseñado adecuadamente, la coordinación hará que el orbital externo que se situaba entre el HOMO y el LUMO del fluoróforo disminuya su energía. En presencia del analito, el complejo (IV) al absorber luz pasa al estado excitado (V), ahora no es posible un mecanismo de desactivación por transferencia de electrones, por lo que el complejo excitado (V) es capaz de pasar al estado fundamental (VI) emitiendo radiación fluorescente. Siguiendo esta secuencia (IV→VI), lo que se observa a nivel macroscópico es un cambio de la intensidad de emisión, indicativa de la presencia del analito y proporcional a la concentración de este.<sup>[13]</sup>

En un sensor basado en PET, tras la coordinación de un ion pueden ocurrir dos situaciones: a) que el PET mantenga apagada la fluorescencia en el sensor libre y cuando ocurre la coordinación con el ion el sensor emita; este proceso es conocido como Aumento de la Fluorescencia debido a la Quelación, CHEF (por sus siglas del inglés, Chelation Enhancement of Fluorescence), o bien, b) que el sensor libre emita luz y al presentarse la coordinación apague la fluorescencia, proceso conocido como Apagamiento de la Fluorescencia debido a la Quelación, CHEQ (por sus siglas del inglés, Chelation Enhancement of Quenching).<sup>[15]</sup>

Entre los iones metálicos que presentan habitualmente un proceso tipo CHEF son  $Zn^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$  y  $Al^{3+}$ , en el caso de un proceso tipo CHEQ son  $Cu^{2+}$ ,  $Hg^{2+}$  y  $Ni^{2+}$ .<sup>[15]</sup>



**Figura 6.** Esquema del reconocimiento molecular mediante transferencia electrónica fotoinducida (PET).

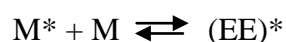
Fuente: [13]



Los sistemas que se basan en el mecanismo de *transferencia de energía electrónica* (EET) están compuestos por dos o más moléculas de fluoróforos diferentes enlazadas mediante grupos espaciadores saturados. La mayoría de ellos se basan en los cambios conformacionales que ocurren con la coordinación de un analito. Como la energía de un sistema siempre tiende a disminuir, un estado excitado de mayor energía le donará su excitación a un estado excitado de menor energía. Así, el mecanismo de EET consiste en el proceso fotofísico por el que un estado excitado de una entidad molecular (donador) se desactiva a un estado electrónico de menor energía mediante la transferencia de su energía a una segunda entidad molecular (aceptor) la cual pasa a un estado de mayor energía.<sup>[15]</sup>

#### Formación de Excímeros

Los excímeros se forman por colisión entre una molécula excitada y una molécula idéntica no excitada:



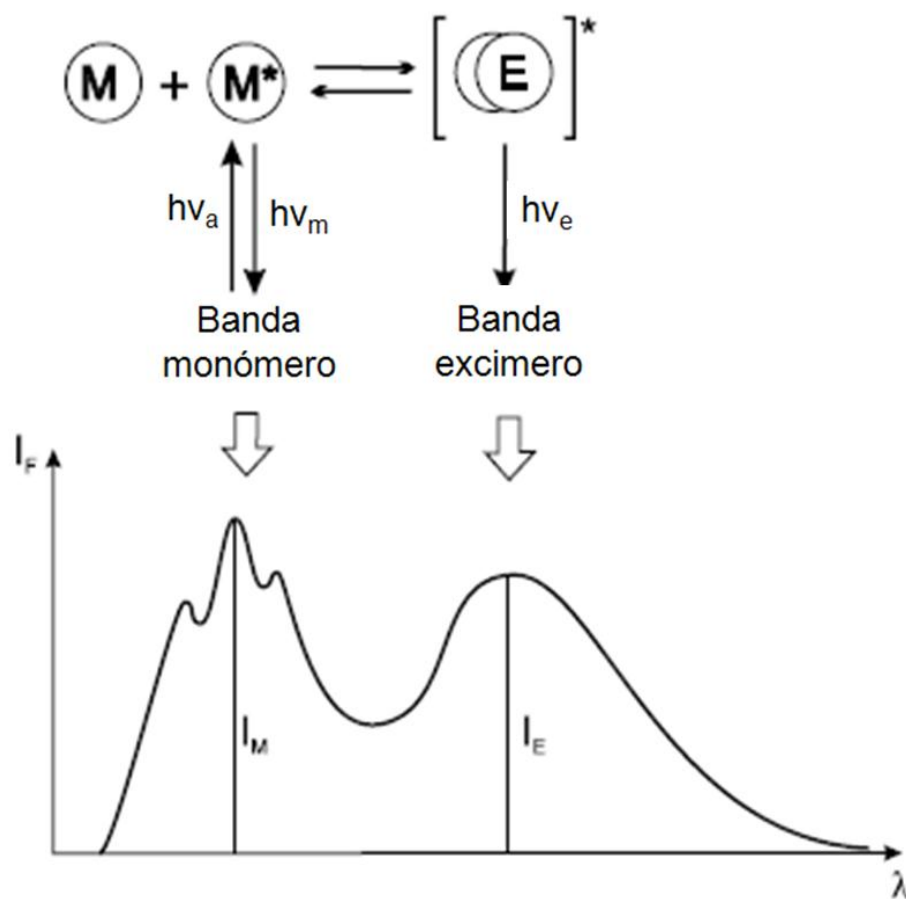
La representación simbólica (EE)\* muestra que la energía de excitación está deslocalizada sobre las dos unidades (Figura 7). La formación de excímeros es un proceso controlado por difusión y es una interacción de corto alcance. De esta manera los efectos fotofísicos son detectados a concentraciones relativamente altas de tal forma que pueda ocurrir un número de colisiones suficiente durante el tiempo de vida del estado excitado.<sup>[2]</sup>

Los excímeros se forman de manera habitual cuando se emplean fluoróforos aromáticos y planos, como por ejemplo hidrocarburos aromáticos policíclicos tales como el pireno y el antraceno. La formación de excímeros intermoleculares de pireno en solución depende de la concentración y se observan generalmente en concentraciones

altas (>1 mM) (Figura 8). En cambio, la formación de excímeros intramoleculares es independiente de la concentración y puede observarse en compuestos que contienen dos subunidades pireno separadas por un puente alquilo. Con este tipo de excímeros se pueden presentar dificultades por la posible dependencia de la temperatura. En contraste a la formación de excímeros intermoleculares, este proceso es no translacional pero requiere acercamiento de las dos unidades a través de rotaciones internas durante el tiempo de vida del estado excitado.<sup>[2]</sup>

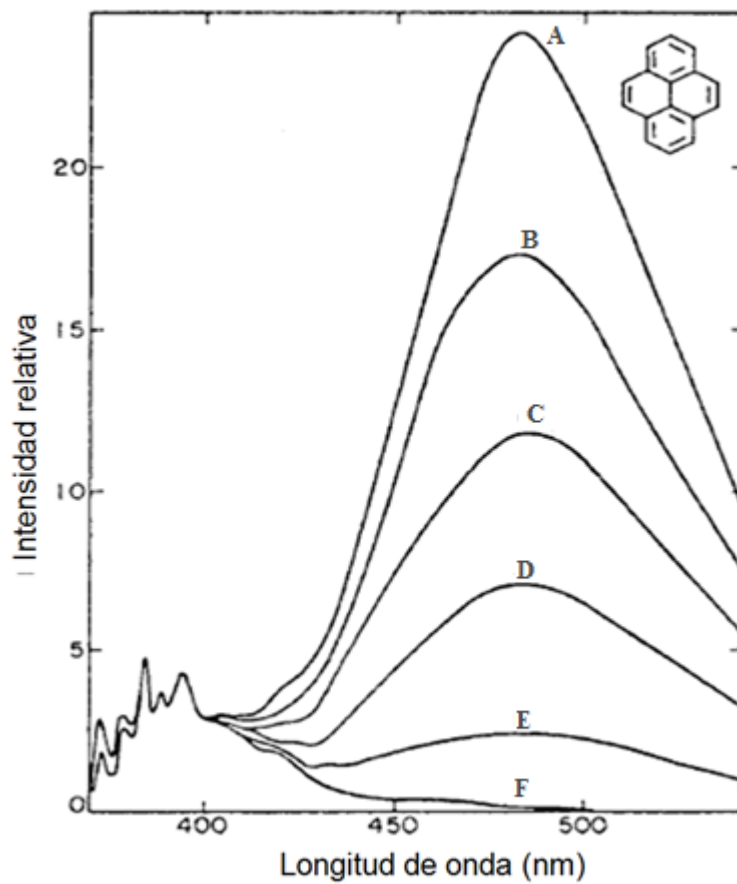
Existen reportes de compuestos en los cuales las unidades pireno se encuentran preasociadas en el estado basal. Este tipo de asociación conduce a lo que se conoce como *excímeros estáticos*, a diferencia de los *excímeros dinámicos* los cuales son dímeros que están asociados en el estado electrónico excitado y que se disocian en el estado basal. Los excímeros estáticos son formados por vía directa de una fotoexcitación del dímero intramolecular en el estado basal, GSD (por sus siglas en inglés Ground State Dimer).<sup>[16-18]</sup>

Una manera de distinguir entre estos dos tipos de excímeros es mediante el análisis de los espectros de excitación y los espectros de ultravioleta. En el caso de preasociación, los espectros de excitación a longitud de onda de excímero son ensanchados y desplazados hacia el rojo, en relación con los espectros de excitación obtenidos a longitud de onda de monómero. Adicionalmente, las bandas de pireno en la región del Ultravioleta se muestran perturbadas por la cercanía de los dos sistemas aromáticos, mientras que las bandas de pireno en un excímero dinámico se aprecian con estructura vibracional.<sup>[13]</sup>



**Figura 7.** Formación de excímero, con la representación de las bandas correspondientes del monómero y excímero.

Fuente: [2]



**Figura 8.** Dependencia de la fluorescencia del pireno en solución de ciclohexano como función de la concentración. Concentraciones (nM): A, 10; B, 7.75; C, 5.5; D, 3.25; E, 1.0; F, 0.1. Se observan las bandas características de la unidad monomérica del pireno (370 y 400 nm) y las bandas correspondientes al excímero de pireno (aprox. a los 488 nm).

Fuente: [2]

### Aumento de la rigidez

Como consecuencia de la coordinación del anión puede tener lugar un aumento de la rigidez del complejo formado, lo que hace menos probable la desactivación no radiante del estado excitado dando lugar a aumentos en la intensidad de emisión. En estos sistemas se observa generalmente un aumento de la fluorescencia tras el proceso de coordinación.<sup>[13]</sup>

## **Avances Recientes en el Desarrollo de Quimiosensores Fluorescentes de Iones Metálicos: Quimiosensores Acíclicos Tipo *Bis*-Pirenil**

Se han desarrollado una variedad de quimiosensores para la detección de iones metálicos, los cuales utilizan como unidad de señalización unidades de naftaleno, antraceno y/o pireno. El pireno es uno de los fluoróforos más estudiados y utilizados debido a: Excelente luminiscencia, con rendimientos cuánticos altos,  $\Phi_{\text{etanol}} = 0.65$ , Tiempos de vida largos,  $t_{s \text{ etanol}} = 410 \text{ ns}$  y Facilidad de formación de excímeros.<sup>[2]</sup>

En la literatura se encuentran reportados varios quimiosensores del tipo *bis-cromofóricos*, los cuales utilizan al pireno como unidad de señalización. Algunos de estos compuestos son capaces de mostrar un aumento o una disminución de la intensidad de emisión de excímero al ocurrir la coordinación del metal con la unidad quelante.<sup>[16, 19-24]</sup> Sin embargo, una desventaja que presentan es que la gran mayoría de ellos son insolubles en agua y solo operan en solventes orgánicos<sup>[24]</sup> o mezclas de solvente orgánico/agua.<sup>[22]</sup> Este último punto es crítico porque la solubilidad en agua es requisito indispensable para la aplicación de estos compuestos en sistemas biológicos y en áreas tan importantes como la química analítica y la química clínica.<sup>[2,25]</sup>

### Quimiosensores biscromofóricos-bispirenil para Cu<sup>2+</sup>

Jin Jun E. et al. (2006) <sup>[22]</sup> reportaron la síntesis de un nuevo receptor tipo binaftil-eter (Figura 9-Q<sub>1</sub>) el cual presentó un aumento de la intensidad, acompañado de un desplazamiento hacia el azul de la emisión de excímero, después de la adición del ion Cu<sup>2+</sup> en CH<sub>3</sub>CN. Yang J-S. et al. (2001) <sup>[19]</sup> reportaron la síntesis de un derivado de pentaceno (Figura9-Q<sub>2</sub>), el cual presentó un aumento y desplazamiento hacia el azul de la emisión de excímero con la coordinación con Cu<sup>2+</sup> en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Ambos autores mencionan que el desplazamiento hacia el azul de la banda de excímero, es atribuido a la conversión de un excímero dinámico a un apilamiento de excímero estático.

### Quimiosensores biscromofóricos-bispirenil para Hg<sup>2+</sup>

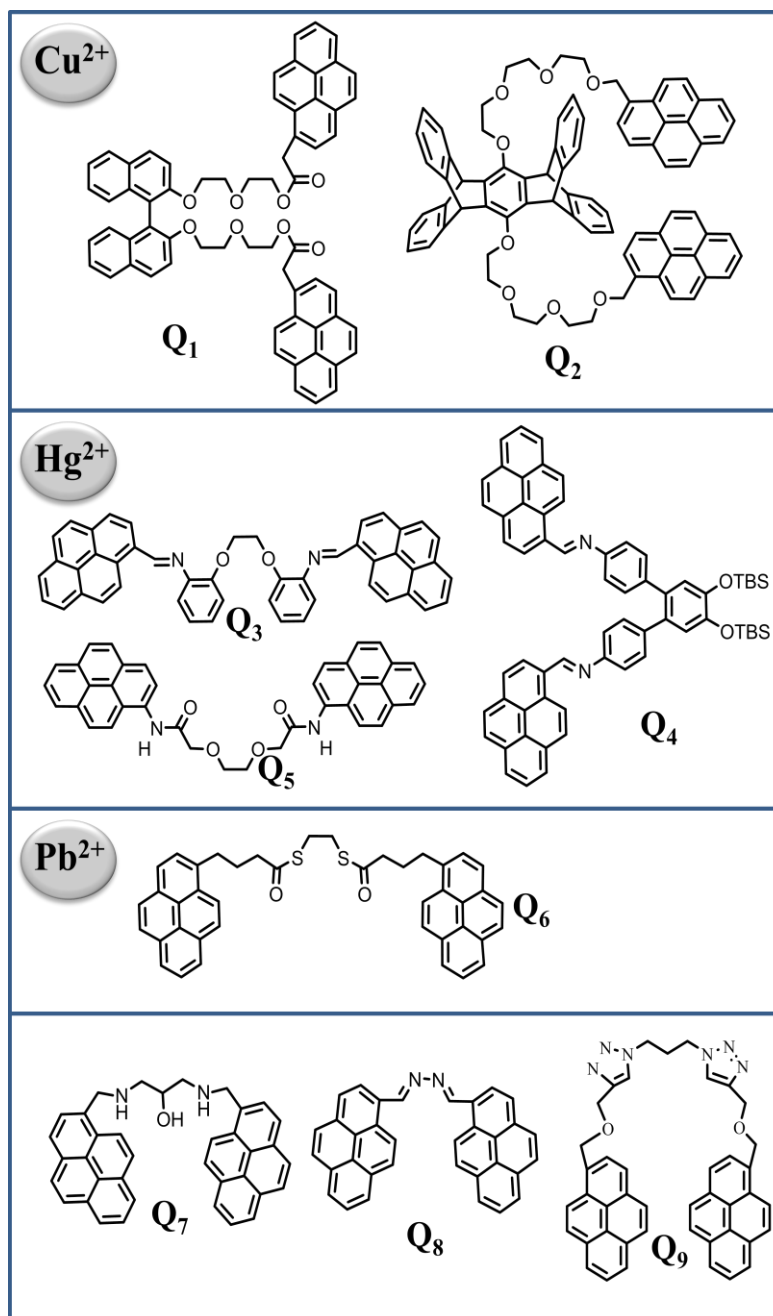
Recientemente se han reportado sensores selectivos a iones Hg<sup>2+</sup>, tal como el sensor fluorescente derivado de un azadieno (Figura9-Q<sub>3</sub>), sintetizado por Zhou Y. et al. (2010) <sup>[26]</sup>, en el cual se observó un aumento en la fluorescencia de la banda de excímero en presencia del ion Hg<sup>2+</sup> en HEPES-CH<sub>3</sub>CN (80:20, v/v). Por otro lado se reporta un sensor fluorescente derivado de terfenil (Figura9-Q<sub>4</sub>) por Bhalla V. et al. (2009) <sup>[27]</sup> el cual no se observó la formación de excímero en la adición del ion Hg<sup>2+</sup>, sin embargo se observó un único aumento en la intensidad de la banda de monómero de pireno en THF-H<sub>2</sub>O (9.5:0.5, v/v). El grupo de investigación de Kim J. S. et al. (2007) <sup>[28]</sup> reportaron la síntesis de un sensor fluorescente selectivo a Hg<sup>2+</sup>, derivado de dioxaoctanodiamina (Figura9-Q<sub>5</sub>), el cual apagó la fluorescencia por completo de ambas bandas de emisión, tanto monómero como excímero de pireno en MeOH-H<sub>2</sub>O (1:1, v/v).

### Quimiosensores biscromofóricos-bispirenil para Pb<sup>2+</sup>

Hou C. et al. (2011) <sup>[29]</sup> diseñaron un sensor fluorescente selectivo al ion metálico Pb<sup>2+</sup>, uniendo a dos grupos pireno por un puente de tio-ester (Figura9-Q<sub>6</sub>), el cual solo en presencia del ion Pb<sup>2+</sup> provocó el apagamiento de la intensidad de la banda de monómero y la aparición de la banda de emisión de excímero, observándose así una respuesta radiométrica. Este es un caso muy especial, debido a que se llevaron a cabo estudios en un sistema biológico-plasma humano (buffer HEPES conteniendo 10% DMSO a pH 7.4) en donde se observó la misma respuesta radiométrica que en solución.

### Quimiosensores biscromofóricos-bispirenil con Reconocimiento Dual

Algunos reportes muestran un modo dual de reconocimiento de iones metálicos. Ejemplo de ellos es el reportado por Chandrasekhar V. et al. (2011) <sup>[30]</sup> un derivado de hidrox-di-aminopropano (Figura9-Q<sub>7</sub>), el cual mostró una respuesta radiométrica, es decir un aumento de intensidad de la banda de monómero y una disminución de la banda de excímero de pireno, en H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN (1/1, v/v). En contraste, Martinez R. et al. (2005) <sup>[31]</sup>, reportaron un sensor fluorescente derivado de azina (Figura9-Q<sub>8</sub>), el cual fue selectivo a los iones Cu<sup>2+</sup> y Hg<sup>2+</sup>, con un aumento en las intensidades de las bandas de emisión de monómero-excímero de pireno, además de un desplazamiento hacia el rojo de la banda de emisión de excímero en CH<sub>3</sub>CN. Hung H.-C. et al. (2009) <sup>[32]</sup> sintetizaron un sensor fluorescente selectivo a iones Pb<sup>2+</sup> y Cd<sup>2+</sup>, derivado de bis-triazoles (Figura9-Q<sub>9</sub>), el cual mostró un apagamiento de las bandas de emisión de monómero y excímero en el caso del ion Pb<sup>2+</sup> y una respuesta radiométrica con el ion Cd<sup>2+</sup>, es decir, una disminución de la banda de emisión de excímero con una aumento en la banda de monómero de pireno, estos resultados fueron obtenidos en CH<sub>3</sub>CN.



**Figura 9.** Quimiosensores de tipo bischromofóricos-bisfenil. Los cuales presentan una selectividad a iones metálicos.

Fuente: [19, 22, 26-32]



### **Contaminación por Metales Potencialmente Tóxicos**

Los metales se encuentran en forma natural en la corteza terrestre. Estos se pueden convertir en contaminantes si su distribución en el ambiente se altera mediante actividades humanas. En general, esto puede ocurrir durante la extracción minera, el refinamiento de productos mineros o por la liberación al ambiente de efluentes industriales y emisiones vehiculares. Además, la inadecuada disposición de residuos metálicos también ha ocasionado la contaminación del suelo, agua superficial y subterránea y de ambientes acuáticos.

La contaminación proveniente de la minería existe en todo el mundo; por ejemplo, la severa contaminación de agua para uso doméstico y uso agrícola por metales pesados en Tasmania causada por las minas de estaño y tungsteno,<sup>[33]</sup> las minas abandonadas en Keno Hill Mining en Canadá <sup>[34]</sup> y los yacimientos de carbón en la Región de Santa Catarina, al sur del Brasil.<sup>[35]</sup> En México, la minería ha sido una actividad económica de gran importancia. Sin embargo, el procesamiento de mineral ha generado una gran cantidad de residuos, los cuales generalmente se depositan en suelos y aguas adyacentes.

En el estado de Sonora, México, la industria minera es una de las actividades económicas fundamentales y por ello existe un gran riesgo de que se presente este tipo de contaminación ambiental. Estudios recientes demuestran que existe una contaminación considerable del Río San Pedro, que se encuentra dentro del área de la explotación minera de cobre en Cananea, Sonora. Se han detectado altas concentraciones de metales (Cd, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb y Zn) en las aguas superficiales. Además se han detectado metales (Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb y Zn) en aguas residuales procedentes de la ciudad de Cananea, pero en concentración es más bajas a las detectadas en el Río San Pedro.<sup>[36]</sup> Otro caso de contaminación por la actividad minera se presenta en la ciudad de Nacozari de García, Sonora, en la cual se detectaron concentraciones bajas de

metales como Cr, Mn, Ni, Zn, As, Se, Mo, Ba y Pb, así como concentraciones altas de Ag, Cu y Hg.<sup>[37]</sup>

Por otra parte, al sur del estado de Sonora se realizó un estudio donde se demuestra que las empresas dedicadas en la producción de fertilizantes son las responsables de la contaminación de agua por metales, encontrándose concentraciones bajas de: Cd, Cr, Cu, Hg, Ni, Pb, Zn y As. Estos metales, al ser bioacumulables, pueden ser los causantes de la extinción de la fauna marina en el municipio de Huatabampo.<sup>[38]</sup>

Por todo lo anteriormente expuesto, es clara la importancia de detectar estos metales, aún en concentraciones bajas, para evaluar riesgos a la salud y para el monitoreo ambiental. Actualmente existen una gran cantidad de métodos analíticos con los cuales se puede llevar a cabo la detección de cationes metálicos, entre ellos se encuentran: fotometría de flama, espectroscopia de absorción atómica, análisis de activación de neutrones, etc. Las desventajas de estos métodos son que requieren de técnicas sofisticadas y utilizan instrumentos muy caros. Es por lo tanto de gran importancia el desarrollo de nuevas técnicas con alta especificidad y sensibilidad, además de que sean rápidas y de bajo costo.<sup>[3]</sup>

En este contexto, la química supramolecular ha contribuido con el diseño y síntesis de sensores moleculares para el reconocimiento de iones metálicos, que en última instancia permitirán la puesta a punto de nuevas tecnologías para la detección de sustancias contaminantes de forma rápida y económica.

## Estandarización de un Método Espectrofotométrico

La estandarización de un método analítico es un proceso experimental que requiere de pruebas adecuadas, que permite evaluar o determinar si el esquema analítico cumple con los atributos de calidad, demostrando si el método es apropiado para la aplicación analítica. Entre los parámetros que se siguen para dicho proceso son la linealidad, límite de detección, exactitud y precisión.<sup>[39]</sup>

Límite de detección del instrumento: Se puede describir como aquella concentración que proporciona una señal en el instrumento significativamente diferente de la señal de una muestra en “blanco” o “señal de fondo”. El límite de detección de un método se calcula con la ayuda de la zona de la representación cercana al origen, y utiliza tanto la pendiente como la ordenada al origen. En el presente trabajo se utilizó el criterio del límite de detección, como la cantidad de concentración de analito que proporciona una señal igual a la señal del blanco ( $y_B$ ), más tres veces la desviación estándar del blanco ( $S_B$ ).<sup>[39]</sup>

Exactitud: Mide la concordancia entre el valor medido y el valor verdadero. El valor verdadero nunca se alcanza, y por lo tanto se usa como valor verdadero el valor generado por un material de referencia. La exactitud se reporta como porcentaje de recuperación del metal añadido, la cual debe ser entre 85 % y 115 %.<sup>[40]</sup>

Precisión: Es el grado de concordancia entre resultados analíticos individuales cuando el procedimiento analítico se aplica repetidamente a diferentes alícuotas o porciones de una muestra homogénea. Usualmente se expresa en términos del intervalo de confianza o incertidumbre<sup>[40]</sup>

## EXPERIMENTAL

En este trabajo se llevaron a cabo titulaciones fluorimétricas de los ligantes (tthalpy) $H_4$  (**1**) y (tthalmpy) $H_4$  (**2**) a pH y temperatura constantes, con diferentes iones metálicos de naturaleza diamagnética o paramagnética de interés biológico-ambiental, con el objetivo de evaluar la posible aplicación de los compuestos como sensores fluorescentes de metales. Así mismo, se llevó a cabo la estandarización del método para el sistema Ligante-Metal que mostró la mejor respuesta y un mayor coeficiente de correlación, con la obtención de los siguientes parámetros: límite de detección del instrumento, precisión y exactitud.

Los espectros de emisión se obtuvieron en un espectrofotómetro de Luminiscencia marca Perkin-Elmer, modelo LS50B. Todas las mediciones se llevaron a cabo a 25 °C y pH 7.9 (buffer MOP'S). La selección del pH para estos estudios se hizo con base en los perfiles ya reportados<sup>[9-11]</sup> de  $I_F$  vs pH de los ligantes **1** y **2** (Figura A<sub>1</sub>, Anexo 1). A pH 7.9 las curvas muestran una meseta (*plateau*), región de poca variación de intensidad al variar el pH, lo que asegura que los cambios observados durante las titulaciones sean debidos a la coordinación y no a pequeñas fluctuaciones del pH del medio. Además, estudios potenciométricos realizados a **1** y **2**<sup>[9-11]</sup> indican que a pH 7.9 predomina una sola especie en solución, lo cual es también adecuado para los estudios de coordinación.

### Reactivos

Para la realización del trabajo de tesis se sintetizó el ligante **2** de acuerdo a la metodología reportada por Pérez-González, R. et al. (2011)<sup>[9]</sup> La pureza del compuesto fue verificada por <sup>1</sup>H RMN. El ligante **1** fue proporcionado por la Dra. Lorena Machi.

Los reactivos que se utilizaron en los estudios espectroscópicos están disponibles comercialmente y se enlistan a continuación. Todos fueron utilizados tal como se recibieron del proveedor.

- Sales metálicas:
  - $\text{CdCl}_2$ , marca Aldrich 99.99%
  - $\text{CuCl}_2$ , marca Aldrich 99.99%
  - $\text{MnCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , marca Spectrum.
  - $\text{NiCl}_2$ , marca Aldrich 99.99%
  - $\text{PbCl}_2$ , marca Aldrich 99.99%
  - $\text{ZnCl}_2$ , marca Aldrich 99.99%
  - $\text{HgCl}_2$ , marca Baker Analyzed, Grado Analítico.
- Buffer MOP'S (ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico), pH 7.9, marca Aldrich.
- Hidróxido de sodio ( $\text{NaOH}$ ), marca JT Baker.
- Cloruro de sodio ( $\text{NaCl}$ ), marca Merck.
- Carbonato de sodio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ), marca Merck.
- Murexida/ $\text{NaCl}$  (10 mg / 5 g).
- Ácido etilendiaminotetraacético sal disódica ( $\text{EDTA-Na}_2$ ), marca Aldrich.

## Metodologías

### Estudio del Efecto de Coordinación Metálica en los Espectros Electrónicos de Emisión de los Ligantes (ttha1py)H<sub>4</sub> (1) y (ttha1mpy)H<sub>4</sub> (2)

Para estudiar los cambios espectrales provocados por la complejación de los ligantes con los diferentes cationes metálicos, se procedió a obtener los espectros de emisión de las soluciones variando la razón  $[M^{2+}]/[L]$  a temperatura y pH constantes (25°C, pH 7.9, buffer MOP'S).

Las titulaciones espectroscópicas se realizaron directamente en la celda del espectrofotómetro. En cada experimento se colocaron 3 mL de solución del ligante con concentración apropiada ( $1.0 \times 10^{-6}$  M para el ligante **1** y  $5.0 \times 10^{-7}$  M para el ligante **2**) a un pH 7.9 (buffer MOP'S) y se le fueron adicionando alícuotas de 10  $\mu$ L de solución de cloruro metálico a estudiar (el volumen total añadido fue de 400  $\mu$ L). Después de la adición de cada alícuota, la solución se agitó por 3 min con la ayuda de un agitador magnético y posteriormente se obtuvieron los espectros de fluorescencia.

Cada experimento se llevó a cabo utilizando soluciones de sales metálicas de Cd<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Hg<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, Pb<sup>2+</sup> y Zn<sup>2+</sup> a concentraciones de  $3.0 \times 10^{-5}$  M (en el caso del ligante **1**) y  $1.5 \times 10^{-5}$  M (en el caso del ligante **2**). Cada solución metálica fue valorada previamente con EDTA-Na<sub>2</sub> utilizando como indicador murexida.

### Estandarización del Método Analítico Para el Sistema Cu-(ttha1py)H<sub>4</sub>

Para la calibración del método se obtuvieron los espectros de emisión de una serie de soluciones estándar de concentración constante de ligante **1** ( $1.0 \times 10^{-6}$  M), con diferentes concentraciones de  $\text{Cu}^{2+}$ ; dichas concentraciones fueron:  $5.0 \times 10^{-9}$  M,  $1.0 \times 10^{-8}$  M,  $3.0 \times 10^{-8}$  M,  $5.0 \times 10^{-8}$  M y  $7.0 \times 10^{-8}$  M.

Para la obtención de los parámetros estadísticos de precisión y exactitud se llevó a cabo la preparación de cinco soluciones estándar de una misma concentración del complejo Cu-**1**. Para estas determinaciones, las concentraciones de metal y ligante fueron  $5.0 \times 10^{-9}$  M y  $1.0 \times 10^{-6}$  M, respectivamente. En seguida fueron obtenidos los espectros de emisión de cada solución estándar preparada.

Para la obtención de la exactitud del método analítico se expresó en términos del porcentaje de recuperación, y se obtuvo mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Recuperacion (\%)} = \frac{\text{Cantidad encontrada}}{\text{Cantidad real}} \times 100$$

En caso de la precisión se obtuvo a partir de la siguiente fórmula:

$$x = \bar{x} \pm t_{\alpha/2} \frac{s}{\sqrt{n}}$$

Donde:

$\bar{x}$  = es la media calculada a partir de cinco mediciones independientes

$t_{\alpha/2}$  = es el valor de la t de Student para un nivel de significancia del 95%

$s$  = es la desviación estándar de la muestra

$n$  = es el número de muestra analizadas

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Estudios de Coordinación Metálica en Solución

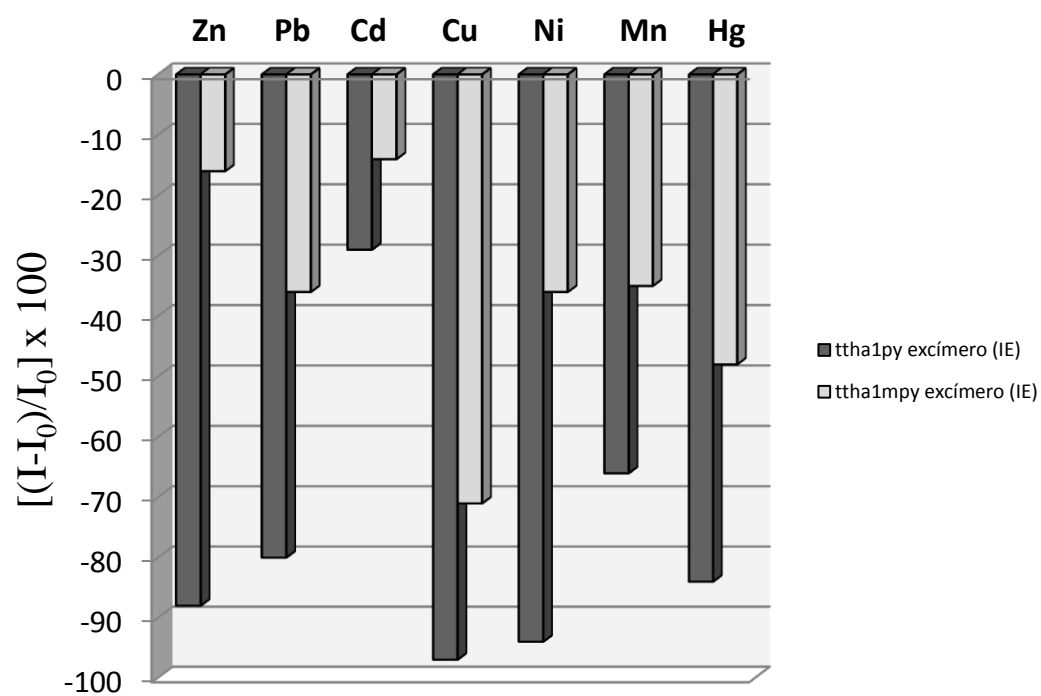
Con el fin de evaluar la respuesta de los ligantes (ttha1py)H<sub>4</sub> (1) y (ttha1mpy)H<sub>4</sub> (2) como sensores fluorescentes de iones metálicos, se realizaron titulaciones fluorimétricas con los diferentes iones metálicos (Figuras 10 y 11). Las titulaciones se llevaron a cabo a 25°C y a un pH de 7.9 (buffer MOP'S). A continuación se describen los resultados obtenidos:

#### Estudio del Efecto de Coordinación Metálica en los Espectros Electrónicos de Emisión del Ligante (ttha1py)H<sub>4</sub> (1)

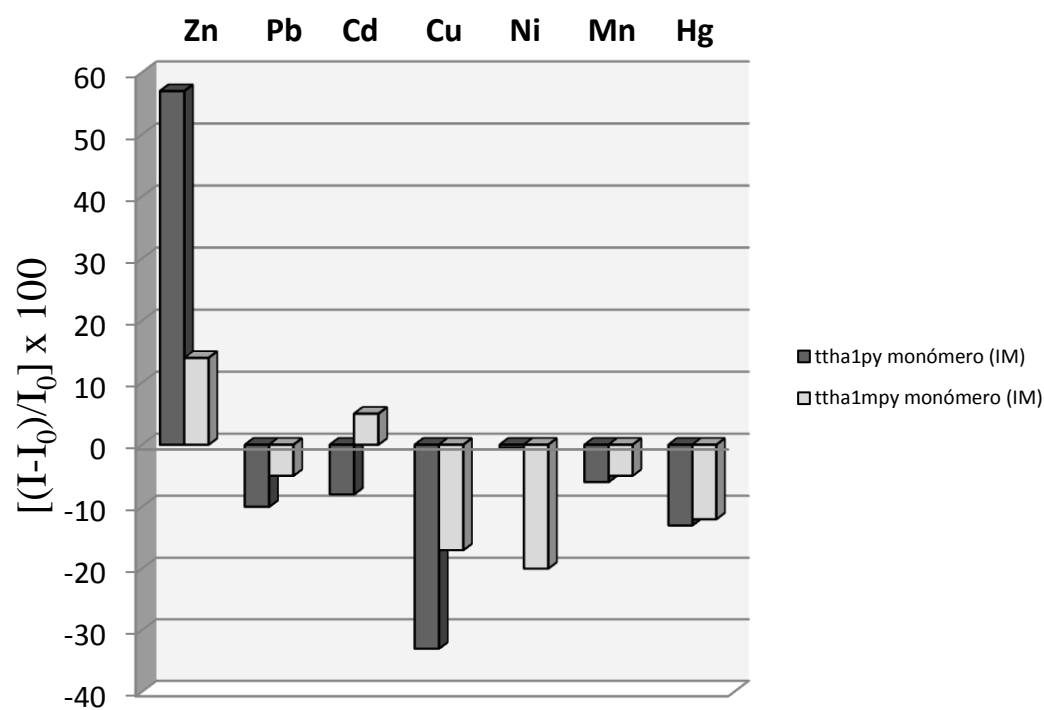
En los espectros de emisión del ligante 1 a pH 7.9, se pueden apreciar las bandas típicas de la unidad monómerica de pireno, localizadas entre 375 y 395 nm, así como una banda ancha con máximo en alrededor de 488 nm, la cual corresponde al excímero del pireno (ver Figura A<sub>2</sub> y A<sub>3</sub>, Anexo 1). Dicha banda de emisión de excímero resultó ser muy sensible a la presencia de iones metálicos (disminución de intensidad de entre 29-97 %, con la adición de 1 equivalente de los diferentes metales), en comparación con la banda de emisión de monómero (disminución de intensidad de entre 0.5-33 % para todos los metales excepto Zn<sup>2+</sup>, con el cual se incrementó en un 57%) (ver Figuras 10 y 11 y Tabla 2).

En la Figura 12 se muestra un gráfico de barras en donde se pueden apreciar conjuntamente los cambios en las intensidades de emisión tanto de excímero como de monómero del ligante 1 ante la adición de 1 eq (equivalente) de cada uno de los iones metálicos estudiados. Todos los metales, con excepción del ion Zn<sup>2+</sup> que causa un efecto radiométrico, provocaron pérdida de intensidad de emisión tanto de excímero como de monómero.

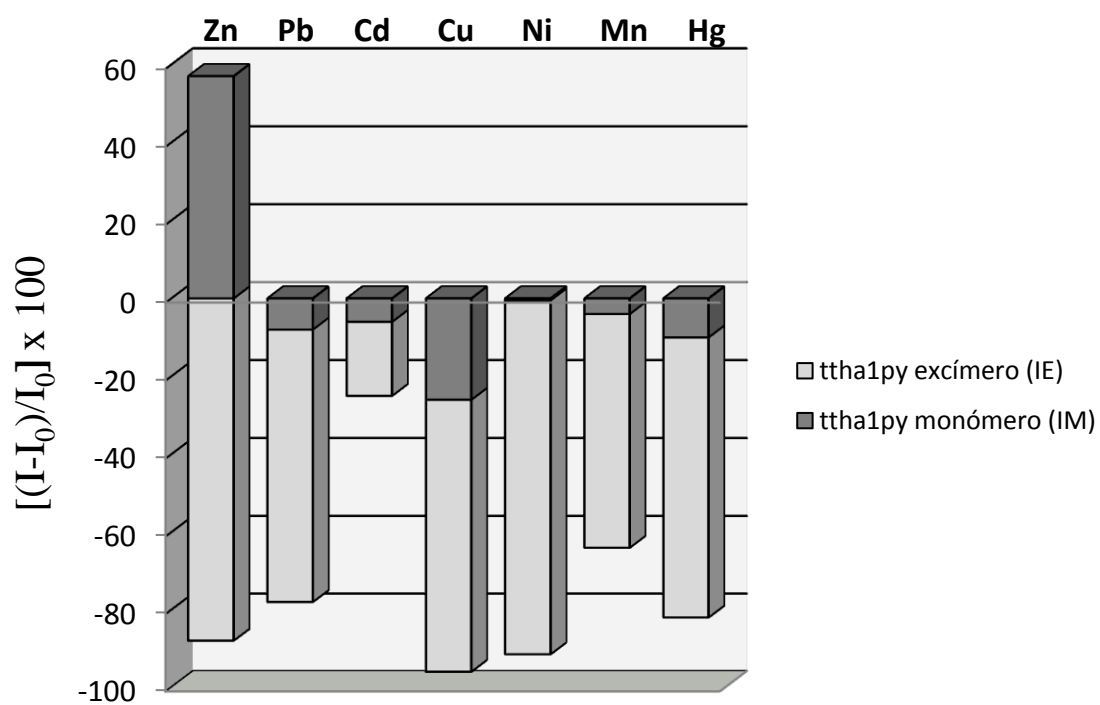




**Figura 10.** Cambios en la intensidad de fluorescencia de la banda de emisión de excímero de (ttha1py)H<sub>4</sub> (**1**) y (ttha1mpy)H<sub>4</sub> (**2**) en presencia de 1 equivalente de varios iones metálicos a pH 7.9 (buffer MOP'S); [**1**]= 1.0 x 10<sup>-6</sup> M, λ<sub>em</sub>= 480 nm y [**2**]= 5.0 x 10<sup>-7</sup> M, λ<sub>em</sub>= 480 nm.



**Figura 11.** Cambios en la intensidad de fluorescencia de la banda de emisión de monómero de (ttha1py)H<sub>4</sub> (**1**) y (ttha1mpy)H<sub>4</sub> (**2**) en presencia de 1 equivalente de varios iones metálicos a pH 7.9 (buffer MOP'S); [**1**]= 1.0 x 10<sup>-6</sup> M y [**2**]= 5.0 x 10<sup>-7</sup> M; λ<sub>em</sub>= 395 nm.



**Figura 12.** Cambios en la intensidad de fluorescencia de la banda de emisión de excímero y de monómero del ligante (ttha1py)H<sub>4</sub> en presencia de 1 equivalente de varios iones metálicos a pH 7.9 (buffer MOP'S); [L]= 1.0 x10<sup>-6</sup> M,  $\lambda_{em}$ = 480 nm (excímero), 395 nm (monómero);  $\lambda_{ex}$ = 342 nm.

**Tabla 2.** Cambios en la Intensidad de las Bandas de Emisión de los ligantes (ttha1py)H<sub>4</sub> y (ttha1mpy)H<sub>4</sub> (%) por efecto de la Coordinación Metálica (adición de 1 eq. de metal).

Ion Metálico	Cambios en la Intensidad de la Fluorescencia*			
	Monómero		Excímero	
	(ttha1py)H <sub>4</sub>	(ttha1mpy)H <sub>4</sub>	(ttha1py)H <sub>4</sub>	(ttha1mpy)H <sub>4</sub>
<b>Zn<sup>2+</sup></b>	+ 57 %	+ 14 %	- 88 %	- 16 %
<b>Pb<sup>2+</sup></b>	- 10 %	- 5 %	- 80 %	- 36 %
<b>Cd<sup>2+</sup></b>	- 8 %	+ 5 %	- 29 %	- 14 %
<b>Cu<sup>2+</sup></b>	- 33 %	- 17 %	- 97 %	- 71 %
<b>Ni<sup>2+</sup></b>	- 0.5 %	- 20 %	- 94 %	- 36 %
<b>Mn<sup>2+</sup></b>	- 6 %	- 5 %	- 66 %	- 35 %
<b>Hg<sup>2+</sup></b>	- 13 %	- 12 %	- 84 %	- 48 %

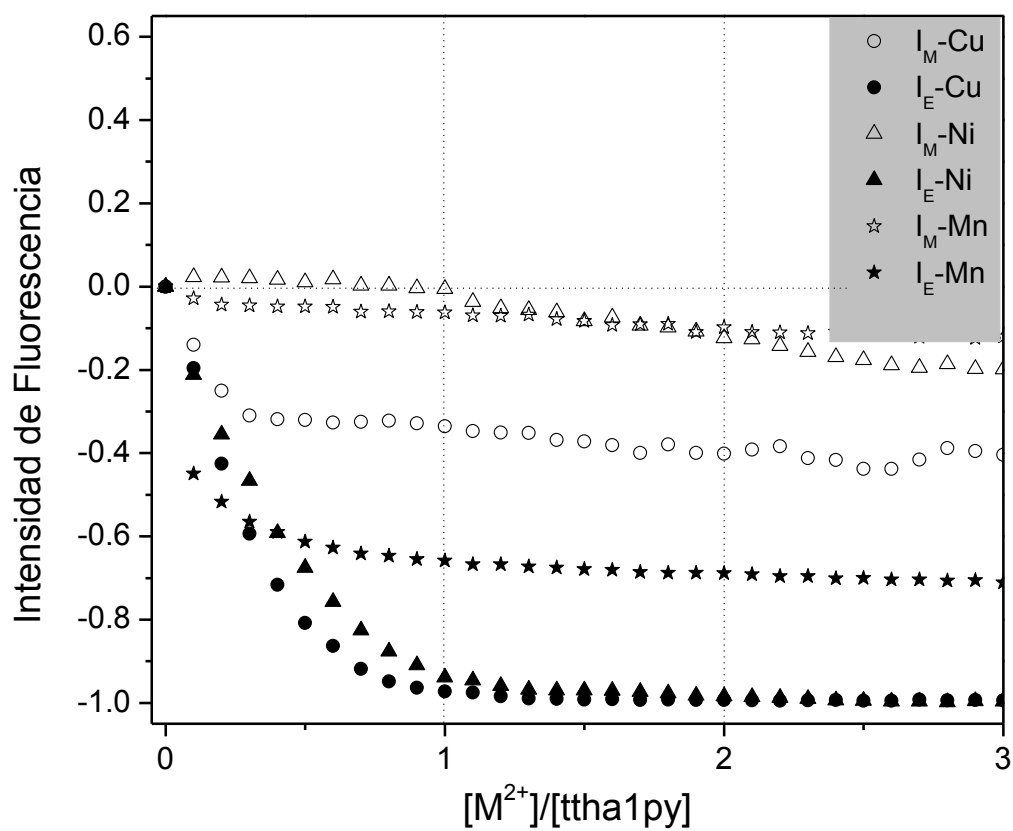
\* El signo negativo (-) significa una disminución de la fluorescencia y el signo positivo (+) un aumento en la fluorescencia.

A continuación se discuten los resultados de este estudio de manera separada, primero para los complejos paramagnéticos M-1 (M= Cu, Ni y Mn) y enseguida para los complejos diamagnéticos M-1 (M= Zn, Cd, Pb y Hg).

#### Espectros de Fluorescencia de los Complejos Paramagnéticos Cu-(tthalpy)H<sub>4</sub>, Ni-(tthalpy)H<sub>4</sub> y Mn-(tthalpy)H<sub>4</sub>

En la Figura A<sub>2</sub> que se encuentra en Anexo 1, se muestran los espectros de fluorescencia obtenidos en las titulaciones de **1** con los iones Cu<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup> y Mn<sup>2+</sup>. En todos los casos a medida que incrementa la concentración del metal, la intensidad de la banda de emisión de excímero disminuye casi en su totalidad (~97% en el caso de Cu<sup>2+</sup>, ~94% en el caso de Ni<sup>2+</sup> y ~66% para el caso de Mn<sup>2+</sup>, a 1 eq. de cada uno de los metales) mientras que la intensidad de la banda de emisión del monómero disminuye solo parcialmente. En la Tabla 2 se resumen los porcentajes de incremento y disminución de intensidades para cada titulación realizada. El apagamiento observado de la emisión tanto de monómero como de excímero, puede atribuirse a que los iones son de naturaleza paramagnética, los cuales tienen la capacidad de apagar la fluorescencia por mecanismo de transferencia de energía o transferencia de electrones.

Un análisis de las gráficas de intensidad de excímero I<sub>E</sub> vs relación molar (Figura 13), permite estimar las estequiometrías de los complejos formados. Para los casos de los iones Cu<sup>2+</sup> y Ni<sup>2+</sup> se puede apreciar como el perfil de I<sub>E</sub> disminuye gradualmente hasta llegar a la proporción [M]/[L] de aproximadamente 1, lo que sugiere una estequiometría 1:1 para estos complejos. Para el caso del ion Mn<sup>2+</sup> aparentemente se observa una estequiometría de 2:1 L:M (ver Figura A<sub>2</sub> en Anexo 1).



**Figura 13.** Cambios en la intensidad de fluorescencia,  $[(I-I_0)/I_0]$  ( $I_E$ = figuras llenas y  $I_M$ =figuras vacías) del ligante (ttha1py) $H_4$  en función de la razón  $[M]/[L]$ .  $[L]= 1.0 \times 10^{-6}$  M, pH 7.9 (buffer MOP'S),  $T=25^\circ C$ . Las intensidades se muestran como  $I_E$  y  $I_M$  normalizadas.

Espectros de Fluorescencia de los Complejos Diamagnéticos Zn-(ttha1py)H<sub>4</sub>, Pb-(ttha1py)H<sub>4</sub>, Cd-(ttha1py)H<sub>4</sub> y Hg-(ttha1py)H<sub>4</sub>

La coordinación del ion Zn<sup>2+</sup> al ligante **1** provocó una respuesta radiométrica ( $I_E/I_M$ ), es decir, la intensidad de emisión del excímero disminuye (~88%) y la intensidad de emisión del monómero aumenta (~57%). En los casos de los iones Pb<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup> y Hg<sup>2+</sup> se observó un apagamiento tanto de la banda de emisión de excímero como de la de monómero (ver Figura A<sub>3</sub> en Anexo 1 y Figura 12). Los porcentajes respectivos de apagamiento con la adición de 1 eq de cada uno de los metales se muestran en la Tabla 2.

Se considera que en el caso del ion Zn<sup>2+</sup>, la respuesta radiométrica observada es debida a cambios conformacionales del ligante al ocurrir la coordinación. Dado que el cinc es un ion diamagnético y no tiene capacidad de llevar a cabo procesos de transferencia electrónica ni de transferencia de energía, se asume que la disminución de la intensidad de emisión de excímero es debida a que la formación del complejo desfavorece o dificulta el traslape de las unidades pireno, tanto en el estado basal como en el estado excitado.

Los iones Pb<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup> y Hg<sup>2+</sup> también son de naturaleza diamagnética al igual que el Zn<sup>2+</sup>, sin embargo, no ocurre una respuesta radiométrica debido que hay un apagamiento de las bandas de emisión de excímero y monómero. En estos casos, los cambios observados pueden atribuirse a efecto del ion pesado en la emisión de fluorescencia.<sup>[41]</sup>

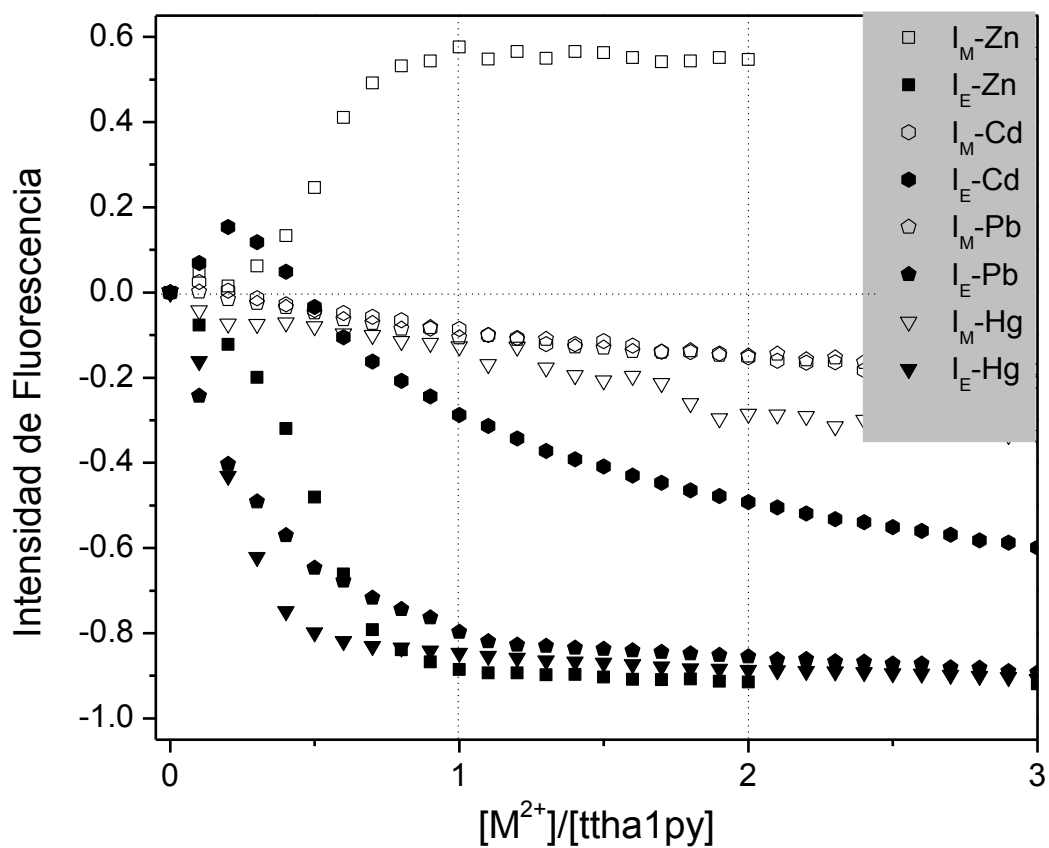
En la Figura 14 se muestran las curvas de intensidad de las bandas de excímero ( $I_E$ ) y de monómero ( $I_M$ ) de **1** en función de la razón [M]/[L]. Las estequiometrías M:L pueden estimarse como 1:1 para el complejo de plomo y 2:1 para los complejos de mercurio y de cinc.

En el caso del ion  $\text{Cd}^{2+}$  se observa un cambio peculiar en la intensidad de emisión del ligante: A bajas concentraciones de metal ocurre un aumento en la intensidad de la banda de excímero ( $I_E$ ) hasta llegar a un máximo; posteriormente, con el incremento en la concentración de metal, la intensidad empieza a disminuir. Con la adición de hasta cuatro equivalentes de  $\text{Cd}^{2+}$  no se observó saturación de la curva de titulación, lo cual dificultó estimar la estequiometría del complejo. Es posible que el incremento inicial de intensidad se deba a la formación de un primer tipo de complejo; de tal manera que con la adición de más cantidad de metal, ocurre la formación de un segundo tipo de complejo que ocasiona el cambio observado en la banda de excímero  $I_E$ . Este efecto fue reportado por Kakizawa et al. (1993) <sup>[16-18]</sup> en la formación de un complejo de calcio con un ligante acíclico. Las primeras adiciones de metal provocan que la banda de fluorescencia del excímero (490 nm) disminuya de intensidad, para posteriormente aumentar dicha banda con el incremento de la concentración de iones  $\text{Ca}^{2+}$ . Los autores atribuyen este fenómeno a que al inicio, el ion  $\text{Ca}^{2+}$  formó un complejo 1:2 (M:L) debido a que el ligante está en exceso y al adicionarle un exceso de  $\text{Ca}^{2+}$  el complejo 1:2 cambia a un complejo 1:1.

#### Respuesta del complejo $\text{Zn}-(\text{ttha1py})\text{H}_4$ : Quimiosensor para $\text{Zn}^{2+}$

De todos los iones metálicos estudiados con el ligante **1**, el ion  $\text{Zn}^{2+}$  fue el único que mostró una respuesta radiométrica ( $I_E/I_M$ ) con el incremento de la concentración del metal, en donde la banda de emisión de excímero ( $I_E$ ) disminuye, mientras que la banda de emisión de monómero ( $I_M$ ) aumenta. En términos de la respuesta, se puede decir que el ligante **1** es selectivo al ion  $\text{Zn}^{2+}$  debido a que es el único metal que muestra un aumento de la banda de emisión de monómero, como se observa en la Figura 14.





**Figura 14.** Cambios en la intensidad de fluorescencia,  $[(I-I_0)/I_0]$  ( $I_E$ = figuras llenas y  $I_M$ =figuras vacías) del ligante (ttha1py) $H_4$  en función de la razón  $[M]/[L]$ .  $[L]= 1.0 \times 10^{-6}$  M, pH 7.9 (buffer MOP'S),  $T=25^\circ\text{C}$ . Las intensidades se muestran como  $I_E$  y  $I_M$  normalizadas.

## **Estudio del Efecto de Coordinación Metálica en los Espectros Electrónicos de Emisión del Ligante (ttha1mpy)H<sub>4</sub> (2)**

En los espectros de emisión del ligante **2** a pH 7.9 (ver Figuras A<sub>4</sub> y A<sub>5</sub>, Anexo 1), se pueden apreciar una intensa banda de emisión estructurada perteneciente al monómero de pireno (con máximos de 376 y 395 nm) y una banda ancha de baja intensidad con un máximo a 480 nm, perteneciente a la banda de emisión de excímero. La razón de intensidades  $I_E/I_M$  en el espectro de emisión del ligante **2** libre es más baja que la observada para el ligante **1**. Esto puede deberse a la presencia del grupo metileno entre el grupo amida y el fluoróforo (ver Esquema I), el cual incrementa la flexibilidad de la molécula y desfavorece el acercamiento de los grupos pireno.

La sensibilidad de la fluorescencia del ligante **2** a la coordinación metálica fué, en términos generales, menor a la que presentó el ligante **1** (ver Figuras 10 y 11 y Tabla 2). La presencia de 1 equivalente de los diferentes iones metálicos provocó disminuciones de la intensidad de emisión de excímero que oscilan entre 14 y 71% , en comparación con los valores de entre 29 y 97% observados para el ligante **1**. Este mismo efecto se observó en la emisión de monómero, aunque solo para los metales Pb<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup> y Hg<sup>2+</sup> (disminución de intensidad de entre 5 y 17%, en comparación con los valores de entre 6 y 33% observados para el ligante **1**). En el caso del ion Ni<sup>2+</sup>, la caída en la intensidad de emisión de monómero fue de 20% (en comparación al 0.5% que presentó el ligante **1**), mientras que los iones Cd<sup>2+</sup> y Zn<sup>2+</sup> provocaron incremento en la intensidad de dicha banda (5 y 14%, respectivamente).

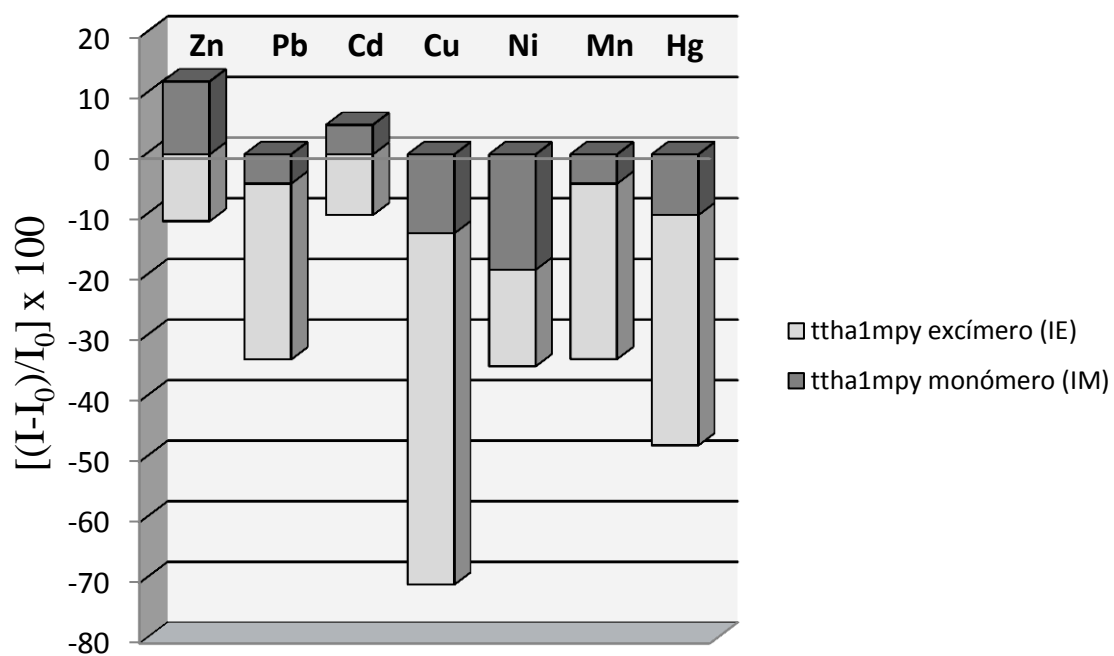
En la Figura 15 se muestra un gráfico de barras en el cual se pueden apreciar de manera conjunta los cambios en la fluorescencia del ligante **2** por efecto de la adición de 1 equivalente de los distintos iones metálicos estudiados. Como se puede apreciar, el ion Cu<sup>2+</sup> produce el apagamiento más fuerte de la intensidad de emisión y los iones Zn<sup>2+</sup> y Cd<sup>2+</sup> provocan una respuesta radiométrica ( $\Delta I_E/I_M$ ). A continuación se discutirán

primero los resultados de la complejación con los iones paramagnéticos  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  y  $\text{Mn}^{2+}$  y enseguida lo correspondiente a los iones diamagnéticos  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$  y  $\text{Hg}^{2+}$ .

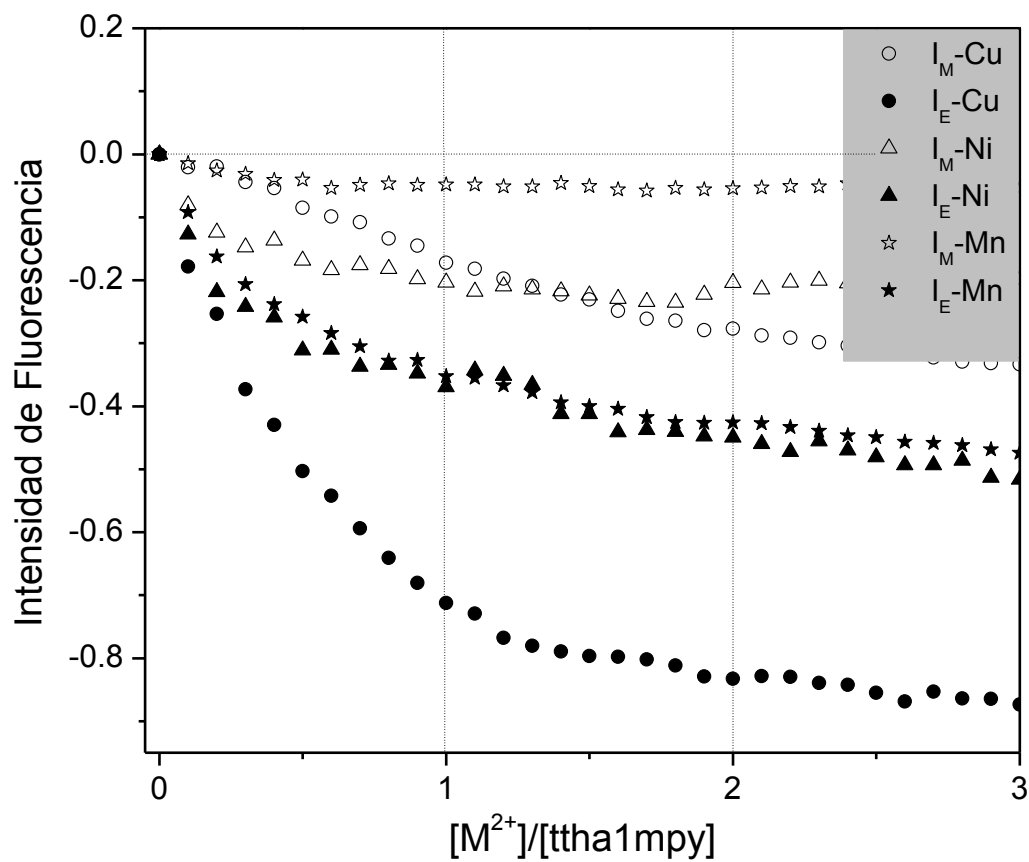
#### Espectros de Fluorescencia de los Complejos Paramagnéticos $\text{Cu}-(\text{ttha1mpy})\text{H}_4$ , $\text{Ni}-(\text{ttha1mpy})\text{H}_4$ y $\text{Mn}-(\text{ttha1mpy})\text{H}_4$

La complejación del ligante **2** con cada uno de los iones metálicos paramagnéticos  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  y  $\text{Mn}^{2+}$  provocó una disminución de la intensidad de emisión tanto de monómero como de excímero (ver Figura 15 y Figura A<sub>4</sub> en Anexo 1). El ion cobre provocó el mayor cambio de la intensidad de fluorescencia de excímero con una disminución de ~71%, mientras que los iones  $\text{Ni}^{2+}$  y  $\text{Mn}^{2+}$  solo provocan una disminución de 36 y 35%, respectivamente (ver Tabla 2).

En la Figura 16 se muestra las gráficas de intensidad de emisión tanto de excímero ( $I_E$ ) como de monómero ( $I_M$ ) en función de la relación molar  $[\text{M}^{2+}]/[\text{L}]$  con los tres iones paramagnéticos estudiados. En el caso del ion  $\text{Cu}^{2+}$ , el perfil de  $I_E$  disminuye gradualmente hasta llegar a la proporción  $[\text{M}^{2+}]/[\text{L}]$  de aproximadamente 1, lo que sugiere una estequiometría de complejación de 1:1. En el caso de  $\text{Mn}^{2+}$  y  $\text{Ni}^{2+}$ , los perfiles de intensidad no muestran una saturación, lo que dificultó estimar las estequiometrías de los complejos.



**Figura 15.** Cambios en la intensidad de fluorescencia de la banda de emisión de excímero y de monómero del ligante (ttha1mpy)H<sub>4</sub> en presencia de 1 equivalente de varios iones metálicos a pH 7.9 (buffer MOP'S); [L]= 5.0 x10<sup>-7</sup> M,  $\lambda_{em}$ = 475 nm (excímero), 395 nm (monómero);  $\lambda_{ex}$ = 342 nm.



**Figura 16.** Cambios en la intensidad de fluorescencia,  $[(I-I_0)/I_0]$  ( $I_E$ = figuras llenas y  $I_M$ =figuras vacías) del ligante (ttha1mpy) $H_4$  en función de la razón  $[M^{2+}]/[L]$ .  $[L]= 5.0 \times 10^{-7}$  M, pH 7.9 (buffer MOP'S),  $T=25^\circ\text{C}$ . Las intensidades se muestran como  $I_E$  y  $I_M$  normalizadas.

Espectros de Fluorescencia de los Complejos Diamagnéticos Zn-(ttha1mpy)H<sub>4</sub>, Pb-(ttha1mpy)H<sub>4</sub>, Cd-(ttha1mpy)H<sub>4</sub> y Hg-(ttha1mpy)H<sub>4</sub>

En la Figura A<sub>5</sub> de Anexo 1 se muestran los espectros de emisión obtenidos en las titulaciones de **2** con los iones Zn<sup>2+</sup>, Pb<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup> y Hg<sup>2+</sup>. En el caso de los iones Zn<sup>2+</sup> y Cd<sup>2+</sup> el ligante mostró una respuesta radiométrica: La intensidad de emisión del excímero disminuye (~15% en ambos iones) y la intensidad de emisión del monómero aumenta (~14% para ion Zn<sup>2+</sup> y de 5% para el ion Cd<sup>2+</sup>). En el caso de los iones Pb<sup>2+</sup> y Hg<sup>2+</sup> se observó un apagamiento de las bandas de emisión tanto de excímero (~36% y ~48%, respectivamente) como de monómero (~5% para el ion Pb<sup>2+</sup> y para el ion Hg<sup>2+</sup> de ~12%) (ver Figura 15 y Tabla 2).

En la Figura 17 se muestran las variaciones de la intensidad de emisión de excímero (I<sub>E</sub>) y monómero (I<sub>M</sub>) del ligante **2** en función de la razón [M<sup>2+</sup>]/[L]. Los cuatro iones diamagnéticos estudiados provocan disminución de la intensidad de emisión de excímero. En el caso de los iones Zn<sup>2+</sup> y Hg<sup>2+</sup>, las curvas revelan estequiometrías M:L 1:1 y 1:2, respectivamente. En el caso de Pb<sup>2+</sup> y Cd<sup>2+</sup>, los perfiles de intensidad no muestran una saturación, lo que dificultó estimar las estequiometrías de los complejos.

Respuesta del complejo Cd-(ttha1mpy)H<sub>4</sub>: Quimiosensor para Cd<sup>2+</sup>

El ligante **2** no mostró una selectividad hacia un ion metálico específico; no obstante, el ligante **2** tuvo una buena respuesta radiométrica (I<sub>E</sub>/I<sub>M</sub>) hacia los iones Zn<sup>2+</sup> y Cd<sup>2+</sup>. En ambos casos un aumento en la intensidad de la banda de monómero y una disminución en la intensidad de la banda de excímero.

Es bien sabido que los iones Pb<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup> y Hg<sup>2+</sup> son metales tóxicos no biodegradables, y por lo tanto pueden ser acumulados en el medio ambiente, lo que resultaría en una contaminación de alimentos y agua. En la literatura se encuentran

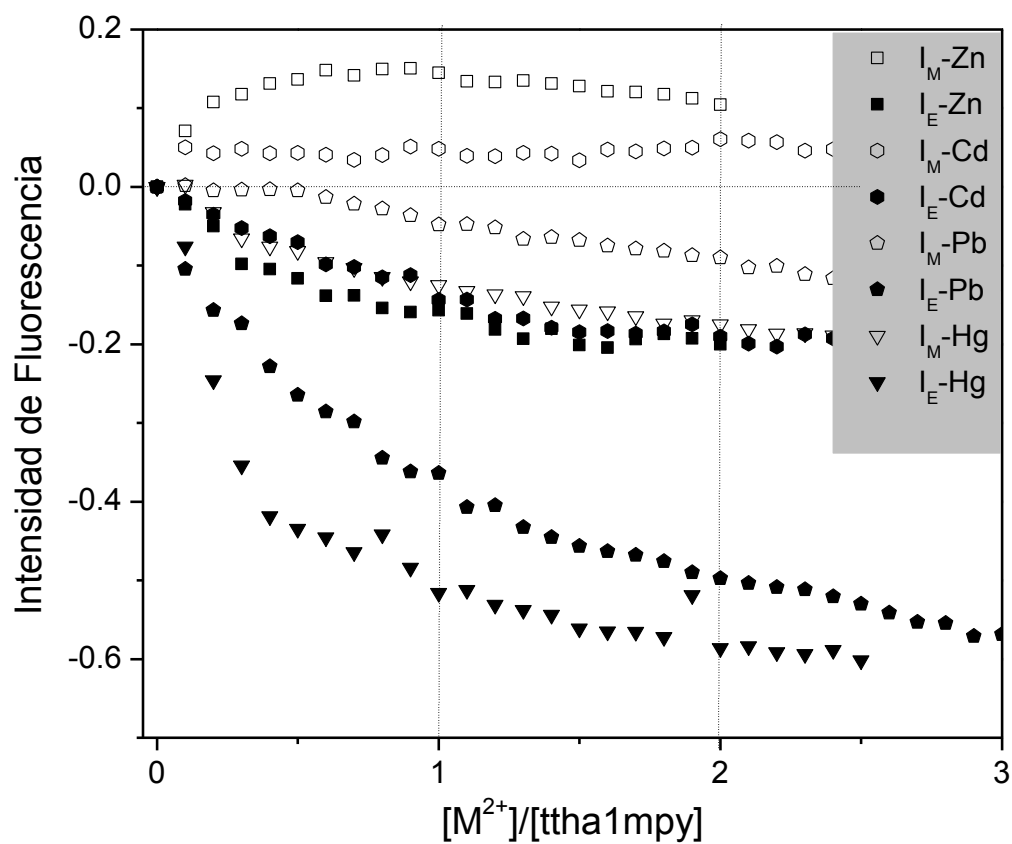
reportados varios quimiosensores del tipo bis-cromofóricos para dichos metales. Sin embargo son pocos los que muestran una respuesta radiométrica en medio acuoso<sup>[24]</sup>, entre los que se encuentra un derivado edta-naftaleno reportado por nuestro grupo<sup>[7]</sup> que responde a  $\text{Cd}^{2+}$  con este tipo de señal. Este es un punto clave para la aplicación de estos compuestos en sistemas biológicos.

### **Estandarización del Método Analítico Espectrofotométrico**

El sistema que se eligió para la estandarización del método analítico fue Cu-(ttha1py)H<sub>4</sub>. Dicho sistema mostró la mejor respuesta en términos de eficiencia y linealidad del cambio en la intensidad de fluorescencia del ligante al aumentar la concentración del metal. Para obtener los parámetros estadísticos, como la precisión y exactitud, se monitoreó la banda de emisión de excímero (~483.5 nm) de los espectros obtenidos en las distintas titulaciones de las soluciones estándares.

Los resultados obtenidos demuestran que el método empleado posee un límite de detección de  $5 \times 10^{-9}$  M, siendo un valor fiable, debido a que presentó un coeficiente de correlación de  $r = -0.9833$ . El valor negativo se describe como una correlación negativa, es decir, todos los puntos experimentales están en la línea recta de pendiente negativa.

En la determinación de la exactitud y precisión del método fluorescente para la cuantificación de  $\text{Cu}^{2+}$  con el ligante **1** se obtuvo lo siguiente: Exactitud= 96.4 %; Precisión=  $4.82 \times 10^{-9}$  M  $\pm$   $5.29 \times 10^{-10}$  M. Estos valores cumplen con los establecidos por la Norma Mexicana NMX-AA-051-SCFI-2001 para la verificación de un método analítico para la detección de metales (85-115%). (Las determinaciones de los valores estadísticos antes mencionados, se encuentran detallados en Anexo 2.)



**Figura 17.** Cambios en la intensidad de fluorescencia,  $[(I-I_0)/I_0]$  ( $I_E$ = figuras llenas y  $I_M$ = figuras vacías) del ligante (ttha1mpy) $H_4$  en función de la razón  $[M^{2+}]/[L]$ .  $[L]= 5.0 \times 10^{-7}$  M, pH 7.9 (buffer MOP'S),  $T=25^\circ C$ . Las intensidades se muestran como  $I_E$  y  $I_M$  normalizadas.



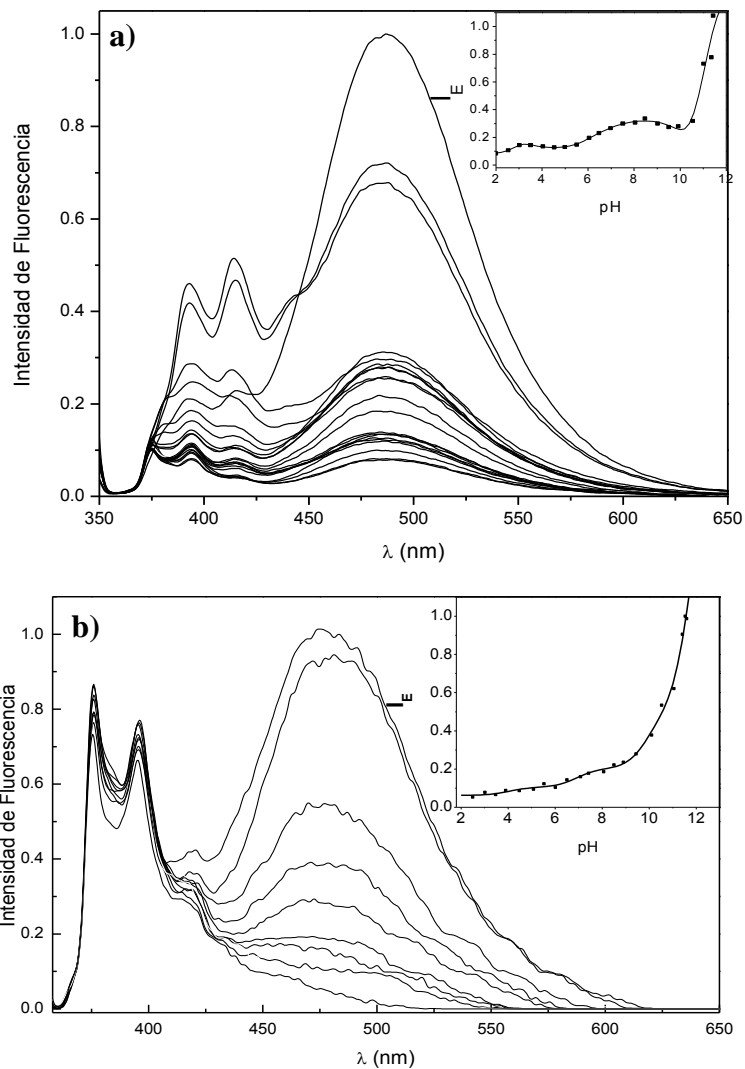
## CONCLUSIONES

1. Ambos ligantes en su forma libre muestran bandas de emisión de pireno monomérico entre 375 y 395 nm, así como una banda ancha con máximo a 488 nm atribuida a excímeros de pireno. La coordinación a todos los metales estudiados provocó apagamiento de la emisión de excímero, tanto para el ligante **1** como para el ligante **2**. Este efecto fue más significativo en el caso de **1**, lo que puede atribuirse a la menor longitud de la cadena de interconexión y por lo tanto menor flexibilidad de esta molécula respecto a su análogo **2**.
2. En cuanto a la emisión de monómero, los ligantes **1** y **2** presentaron diferentes respuestas ante el grupo de metales estudiados. La coordinación a Pb, Cu, Mn y Hg provocó disminución de la intensidad de emisión de ambas moléculas, mientras que la coordinación a Zn causó, en ambos casos, incremento de la intensidad. Ambos efectos fueron más significativos para el ligante **1**, lo que refleja una vez más la influencia de la estructura molecular.
3. Se encontró que el ligante (ttha1py)<sub>4</sub> (**1**) fue selectivo al ion Zn<sup>2+</sup>, con base en una respuesta radiométrica: aumento de la intensidad de emisión de monómero y disminución de la intensidad de emisión de excímero ( $I_E/I_M$ ). De entre todos los metales estudiados, este fue el único que indujo dicha respuesta, lo que sugiere la posible aplicación del ligante **1** para detección y cuantificación de Zn<sup>2+</sup> en medios acuosos.

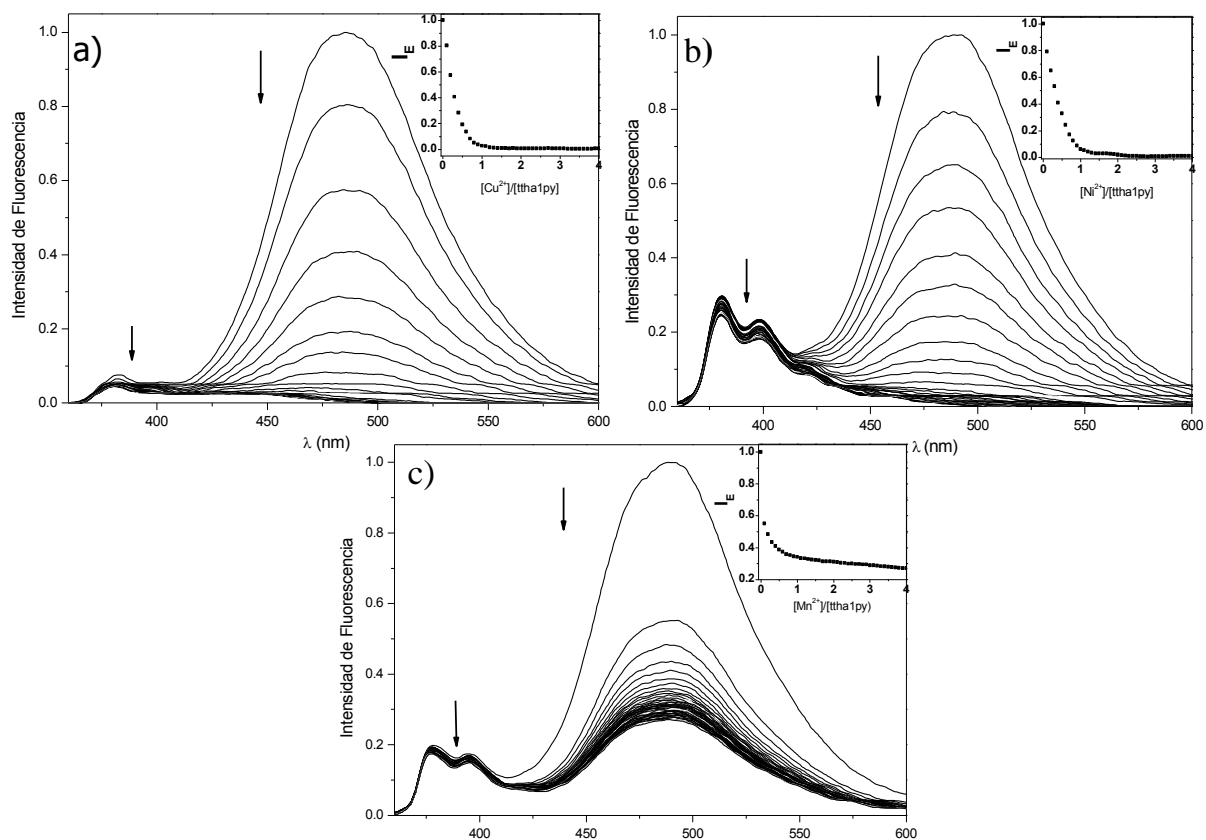
4. El ligante (ttha1mpy)H<sub>4</sub> (**2**) no mostró selectividad dentro del grupo de metales estudiados. Sin embargo, dentro del grupo de metales pesados (Pb<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup> y Hg<sup>2+</sup>), el ligante **2** muestra una respuesta radiométrica solo con el ion Cd<sup>2+</sup>. Este resultado es de relevancia ya que son pocos los quimiosensores que muestran una respuesta radiométrica a Cd<sup>2+</sup> en medio acuoso, lo que es un punto clave para la detección de este agente tóxico en sistemas biológicos.
  
5. En cuanto a la estandarización del método analítico para el sistema Cu-(ttha1py)H<sub>4</sub>, se encontró que el límite de detección del instrumento es  $\leq 5 \times 10^{-9}$  M. La exactitud y precisión del método fluorescente, fueron aceptables y cumplen con la Norma Mexicana NMX-AA-051-SCFI-2001 para la verificación de un método analítico en la detección de metales.

## ANEXOS

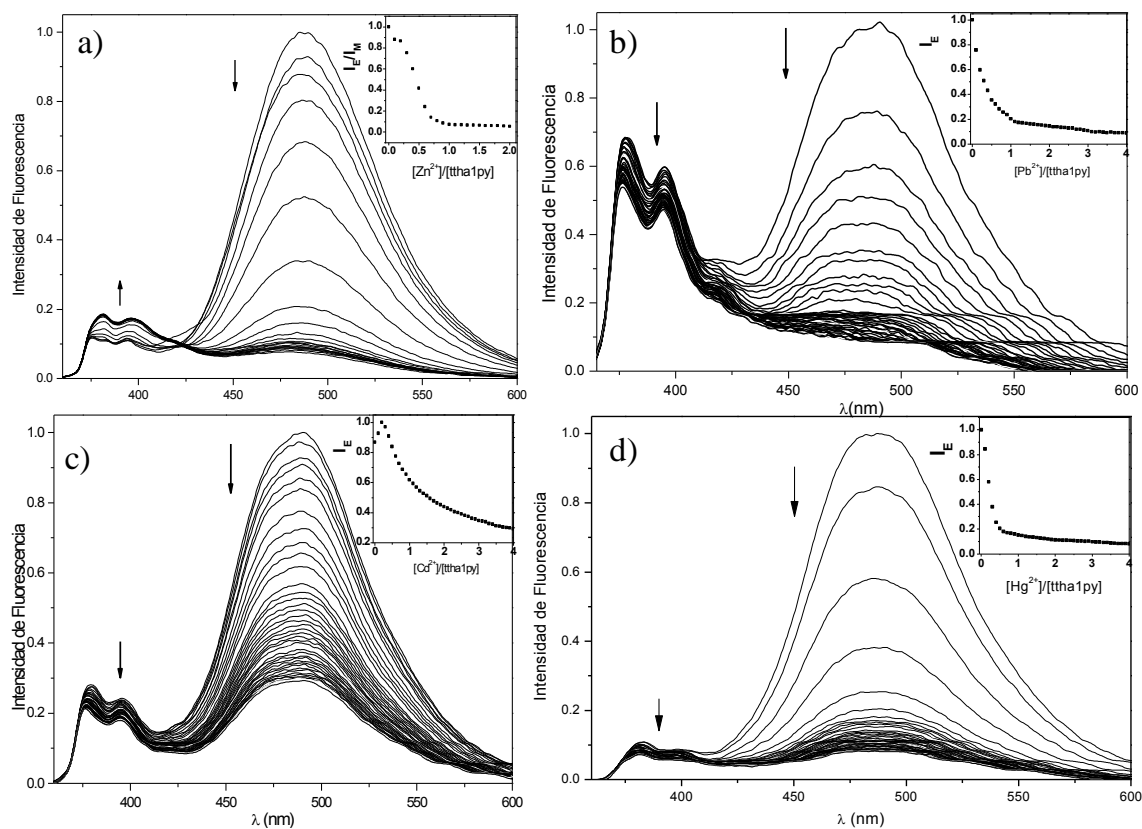
### Anexo 1: Figuras



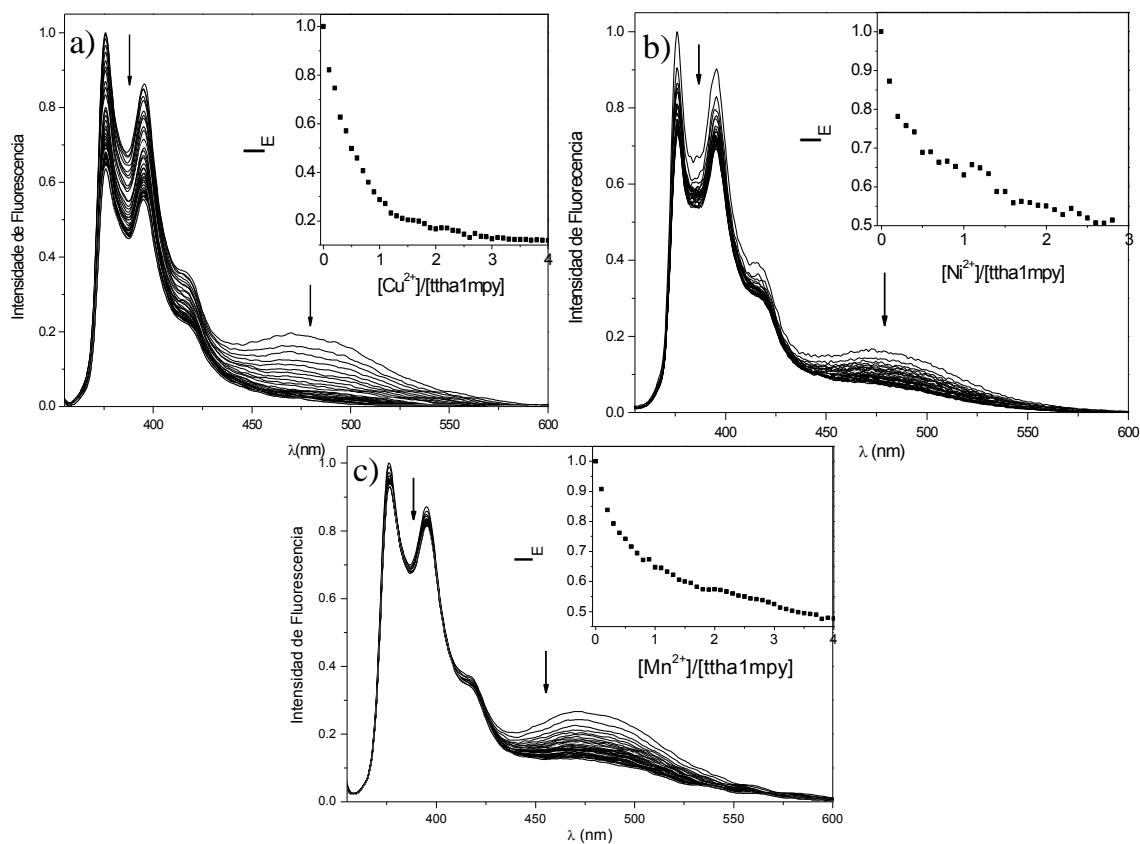
**Figura A1.** Espectros de emisión de los ligantes a) (ttha1py)H<sub>4</sub> y b) (ttha1mpy)H<sub>4</sub> (normalizada), en solución acuosa a diferentes valores de pH. En los recuadros se muestran las variaciones de las intensidades de excímero normalizadas en función del pH (■ experimental, — calculada).



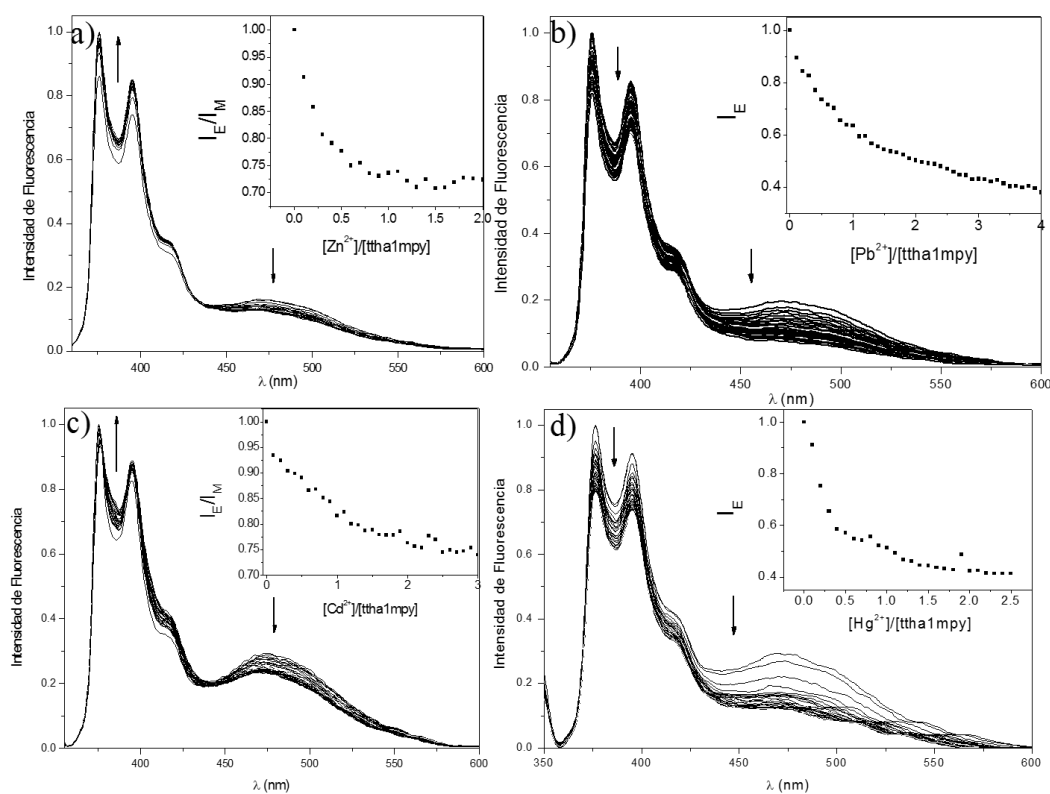
**Figura A<sub>2</sub>.** Espectros de emisión obtenidos en las titulaciones espectroscópicas de (ttha1py)H<sub>4</sub> con: a) Cu<sup>2+</sup>; b) Ni<sup>2+</sup>; c) Mn<sup>2+</sup>. La relación molar  $[M^{2+}]/[L]$  varía desde 0 hasta 4.  $[L]=1.0 \times 10^{-6}$  M; pH 7.9, T=25°C;  $\lambda_{ex}=340$  nm. Recuadros: Variación de la intensidad de excímero ( $I_E$ ) en función de la razón molar  $[M^{2+}]/[ttha1py]$  de 0-4.



**Figura A3.** Espectros de emisión obtenidos en las titulaciones espectroscópicas de  $(ttha1py)H_4$  con: a)  $Zn^{2+}$ ; b)  $Pb^{2+}$ ; c)  $Cd^{2+}$ ; d)  $Hg^{2+}$ . La relación molar  $[M^{2+}]/[L]$  varía desde 0 hasta 4.  $[L]=1.0 \times 10^{-6}$  M; pH 7.9,  $T=25^\circ C$ ;  $\lambda_{ex}=340$  nm. Recuadros: en a) Variación de la razón  $I_E/I_M$  en función  $[Zn^{2+}]/[ttha1py]$  de 0-2. en b), c) y d) variación de la intensidad de excímero ( $I_E$ ) en función  $[M^{2+}]/[ttha1py]$  de 0-4.



**Figura A4.** Espectros de emisión obtenidos en las titulaciones espectroscópicas de (ttha1mpy)H<sub>4</sub> con: a) Cu<sup>2+</sup>; b) Ni<sup>2+</sup>; c) Mn<sup>2+</sup>. La relación molar [M<sup>2+</sup>]/[L] varía desde 0 hasta 4. [L]=5.0×10<sup>-7</sup> M; pH 7.9, T=25°C; λ<sub>ex</sub>= 342 nm. Recuadros: Variación de la intensidad de excímero (I<sub>E</sub>) en función de la razón molar [M<sup>2+</sup>]/[ttha1mpy] de 0-4.



**Figura A5.** Espectros de emisión obtenidos en las titulaciones espectroscópicas de (ttha1mpy) $H_4$  con: a)  $Zn^{2+}$ ; b)  $Pb^{2+}$ ; c)  $Cd^{2+}$ ; d)  $Hg^{2+}$ . Variando la relación molar  $[M^{2+}]/[L]$  varía desde 0 hasta 4.  $[L]=5.0 \times 10^{-7}$  M; pH 7.9,  $T=25^\circ C$ ;  $\lambda_{ex}=342$  nm. Recuadros: en a) y c) variación de la razón  $I_E/I_M$  en función  $[M^{2+}]/[ttha1mpy]$ ; en b) y d) variación de la intensidad de excímero ( $I_E$ ) en función  $[M^{2+}]/[ttha1mpy]$ .

## Anexo 2: Ecuaciones para la determinación de las medidas de calibración

- Valores experimentales obtenidos

[Cu]M	Intensidad 483.5 nm
$x_i$	$y_i$
$5E^{-09}$	426.125
$1E^{-08}$	413.035
$3E^{-08}$	353.485
$5E^{-08}$	296.854
$7E^{-08}$	279.568

### 1. Cálculo de Limite de detección

[Cu] M	Intensidad 483.5 nm					
$x_i$	$y_i$	$(x_i - \bar{x})$	$(x_i - \bar{x})^2$	$(y_i - \bar{y})$	$(y_i - \bar{y})^2$	$(x_i - \bar{x}) * (y_i - \bar{y})$
$5E^{-09}$	426.125	$-2.80E^{-08}$	$7.84E^{-16}$	72.3116	5228.96749	$-2.02E^{-06}$
$1E^{-08}$	413.035	$-2.30E^{-08}$	$5.29E^{-16}$	59.2216	3507.19791	$-1.36E^{-06}$
$3E^{-08}$	353.485	$-3.00E^{-09}$	$9.00E^{-18}$	-0.3284	0.10784656	$9.85E^{-10}$
$5E^{-08}$	296.854	$1.70E^{-08}$	$2.89E^{-16}$	-56.9594	3244.37325	$-9.68E^{-07}$
$7E^{-08}$	279.568	$3.70E^{-08}$	$1.369E^{-15}$	-74.2454	5512.37942	$-2.75E^{-06}$
$\bar{x} = 3.30E^{-08}$	353.8134	$\Sigma = 0$	$2.98E^{-15}$	0	17493.0259	$-7.10E^{-06}$

- a) Calculo del coeficiente de correlación (r):

$$r = \frac{\{\sum_i (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})\}}{\{[\sum_i (x_i - \bar{x})^2 (y_i - \bar{y})^2]\}^{1/2}}$$

$$r = \frac{(-7.10E^{-6})}{\{(2.98E^{-15})(1749.0259)\}^{1/2}}$$

$r = -0.9833$
---------------



b) Cálculo de la recta de regresión de Y sobre X:

$$b = \frac{\{\sum_i(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})\}}{\sum_i(x_i - \bar{x})^2}$$

$$b = \frac{-7.10E^{-6}}{2.98E^{-15}} = -2,382,550.336$$

$$a = \bar{y} - b\bar{x}$$

$$a = 353.8134 - [(-2,382,550.336)(3.30E^{-8})] = \underline{432.4375}$$

Sustituyendo la ecuación:

$$y = -2,382,550.336x + 432.4375$$

c) Cálculos Estadísticos:

$X_i$ [Cu]M	$Y_i$	$\hat{Y}_i$	$(Y_i - \hat{Y}_i)$	$(Y_i - \hat{Y}_i)^2$
$5E^{-09}$	426.125	420.524	5.60	31.371201
$1E^{-08}$	413.035	408.611	4.42	19.571776
$3E^{-08}$	353.485	360.960	-7.47	55.875625
$5E^{-08}$	296.854	313.309	-1.65E <sup>-01</sup>	270.767025
$7E^{-08}$	279.568	265.658	1.39 E <sup>-01</sup>	193.4881
$\Sigma =$				571.073727

$$s_{y/x} = \left\{ \frac{\sum_i (y_i - \hat{y}_i)^2}{n - 2} \right\}^{1/2}$$

$$s_{y/x} = \left( \frac{571.073727}{5 - 2} \right)^{1/2} = 13.797$$

a) Aplicando la definición de límite de detección:

$$Y - Y_B = 3S_B$$

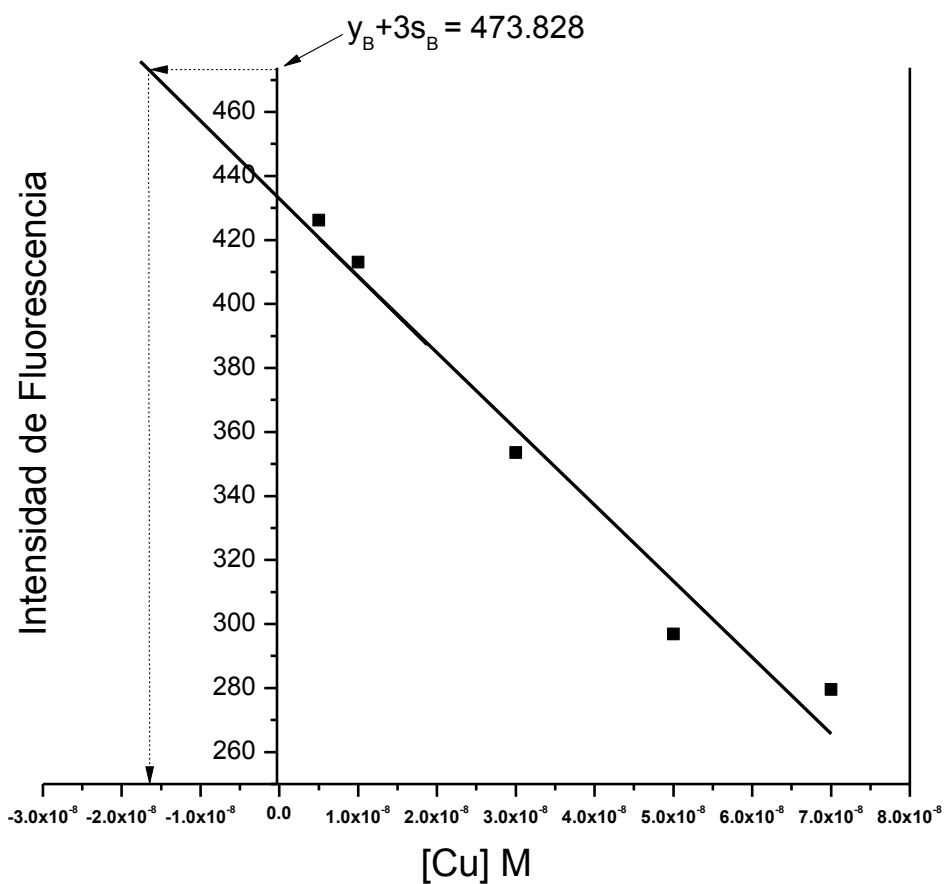
Donde:  $Y_B = a$                        $a =$  ordenada en el espacio

$S_B = S_{y/x}$                        $S_B =$  desviación estándar del blanco

entonces:                       $Y = Y_B + 3S_B$

Sustituyendo:                       $Y = 432.437 + 3(13.797)$

$Y = 473.828$



**Limite de detección del instrumento es  $\leq 5E^{-9}$  M.**

## 2. Precisión

Intensidad 483.5 nm	[Cu] M		
$y_i$	$x_i$	$(x_i - \bar{x})$	$(x_i - \bar{x})^2$
423.633	$4.5E^{-09}$	$-3.2E^{-10}$	$1.024E^{-19}$
423.154	$4.5E^{-09}$	$-3.2E^{-10}$	$1.024E^{-19}$
423.470	$4.5E^{-09}$	$-3.2E^{-10}$	$1.024E^{-19}$
419.476	$5.1E^{-09}$	$2.8E^{-10}$	$7.840E^{-20}$
418.035	$5.5E^{-09}$	$6.8E^{-10}$	$4.624E^{-19}$
$\bar{x} =$	$4.82E^{-09}$	$\Sigma =$	$8.48E^{-19}$

$$S = \sqrt{\frac{\sum i (x_i - \hat{x}_i)^2}{n - 1}}$$

$$S = \sqrt{\frac{8.48E^{-19}}{5 - 1}} = \sqrt{2.12E^{-19}}$$

$$S = 4.60E^{-10}$$

$$x = \bar{x} \pm t_{\alpha/2} \frac{s}{\sqrt{n}}$$

$$x = 4.82E^{-09} \pm 2.57 \left( \frac{4.60E^{-10}}{\sqrt{5}} \right)$$

$$x = 4.82E^{-09} \pm 5.29E^{-10}$$

## 3. Exactitud

$$\text{Recuperación (\%)} = \frac{\text{concentración media experimental}}{\text{concentración teórica}} \times 100$$

$$\text{Recuperación(\%)} = \frac{4.82E^{-09}}{5E^{-09}} \times 100 = 96.4 \%$$

## BIBLIOGRAFÍA

1. Sullivan, J. B.; Krieger, G. R., *Clinical Environmental Health and Toxic Exposures*. Lippincott Williams & Wilkins: 2001.
2. Valeur, B.; Berberan-Santos, M. N., *Molecular Fluorescence*. John Wiley & Sons: 2012.
3. Boyke, W., *Detection of Transition Metal Ion Using Fluorescent Sensor*. School of Chemical Science, 2002.
4. Bargossi, C.; Fiorini, M. C.; Montalti, M.; Prodi, L.; Zaccheroni, N., Recent developments in transition metal ion detection by luminescent chemosensors. *Coordination Chemistry Reviews* 2000, 208, 17-32.
5. Prodi, L.; Montalti, M.; Zaccheroni, N.; Dolci, L. S., *Topics in Fluorescence Spectroscopy*. 2 ed.; Springer US: 2005; Vol. 9.
6. Shiraiishi, Y.; Tokitoh, Y.; Hirai, T., pH- and H<sub>2</sub>O-Driven Triple-Mode Pyrene Fluorescence. *Organic Letters* 2006, 8, 3841-3844.
7. Machi, L.; Santacruz, H.; Sánchez, M.; Inoue, M., Cd<sup>2+</sup>-sensing bichromophore: Excimer Emission from an EDTA-methylnaphthalene Derivative. *Inorganic Chemistry Communications* 2007, 10, 547-550.
8. Machi, L.; Muñoz, I. C.; Pérez, R.; Sánchez, M.; Inoue, M., Pyrene-Bichromophores Composed of Polyaminopolycarboxylate Interlink: pH Response of Excimer Emission. *Supramolecular Chemistry* 2009, 21, 665-673.
9. Pérez-González, R.; Machi, L.; Inoue, M.; Sánchez, M.; Medrano, F., Fluorescence and Conformation in Water-soluble Bis(pyrenyl amide) Receptors Derived from Polyaminopolycarboxylic Acids. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 2011, 219, 90-100.
10. Pérez González, R. Síntesis de Ligantes Acíclicos Derivados de Ácidos Poliaminopolicarboxílicos Funcionalizados con Unidades Pireno o Antraceno como Potenciales Sensores Fluorescentes de pH. Universidad de Sonora, Hermosillo, Sonora, México, 2012.
11. Avila Manzanares, J. E. Síntesis de un Nuevo Quimiosensor Fluorescente Tipo Bis-Cromofórico del Ácido Trietilentetraaminohexaacético (ttha) Funcionalizado con Grupos Pireno y Estudios de Coordinación hacia los Iones Cu<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup> y Zn<sup>2+</sup> en Solución Acuosa. Universidad de Sonora, Hermosillo, Sonora, Mexico, 2010.
12. Skoog, D. A.; Crouch, S. R.; Holler, F. J.; Anzures, M. B., *Principios de Análisis Instrumental*. Cengage Learning Latin America: 2008.
13. Fabbrizzi, L.; Poggi, A., *Transition Metals in Supramolecular Chemistry*. Springer: 2010.
14. Prodi, L.; Bolletta, F.; Montalti, M.; Zaccheroni, N., Luminescent Chemosensors for Transition Metal Ions. *Coordination Chemistry Reviews* 2000, 205, 59-83.
15. Czarnik, W. A., *In Fluorescent Chemosensor for Ion and Molecule Recognition*. Washington, DC., 1993; p 6.

16. Kakizawa, Y. A.; Nakamura, H., Syntheses and Complexing Behavior of New Fluorescent Reagents for Alkaline Earth Metal Ions. *Chemistry Letters* 1993, 22, 1671-1674.
17. Shiraishi, Y.; Tokitoh, Y.; Nishimura, G.; Hirai, T., Solvent-Driven Multiply Configurable On/Off Fluorescent Indicator of the pH Window: A Diethylenetriamine Bearing Two End Pyrene Fragments. *The Journal of Physical Chemistry B* 2007, 111, 5090-5100.
18. Winnik, F. M., Photophysics of Preassociated Pyrenes in Aqueous Polymer Solutions and in Other Organized Media. *Chemical Reviews* 1993, 93, 587-614.
19. Yang, J.-S.; Lin, C.-S.; Hwang, C.-Y., Cu<sup>2+</sup>-Induced Blue Shift of the Pyrene Excimer Emission: A New Signal Transduction Mode of Pyrene Probes. *Organic Letters* 2001, 3, 889-892.
20. Suzuki, Y.; Morozumi, T.; Nakamura, H.; Shimomura, M.; Hayashita, T.; Bartsh, R. A., New Fluorimetric Alkali and Alkaline Earth Metal Cation Sensors Based on Noncyclic Crown Ethers by Means of Intramolecular Excimer Formation of Pyrene. *The Journal of Physical Chemistry B* 1998, 102, 7910-7917.
21. Sancenón, F.; Descalzo, A. B.; Lloris, J. M.; Martínez-Máñez, R.; Pardo, T.; Seguí, M. a. J.; Soto, J., Open-chain Polyazaalkanes Functionalised With Pyrene Groups as Sensing Fluorogenic Receptors for Metal Ions. *Polyhedron* 2002, 21, 1397-1404.
22. Jun, E. J.; Won, H. N.; Kim, J. S.; Lee, K.-H.; Yoon, J., Unique Blue Shift Due to the Formation of Static Pyrene Excimer: Highly Selective Fluorescent Chemosensor for Cu<sup>2+</sup>. *Tetrahedron Letters* 2006, 47, 4577-4580.
23. Pedras, B.; Santos, H. M.; Fernandes, L.; Covelo, B.; Tamayo, A.; Bértolo, E.; Capelo, J. L.; Avilés, T.; Lodeiro, C., Sensing Metal Ions With Two New Azomethine–thiophene Pincer Ligands (NSN): Fluorescence and MALDI-TOF-MS Applications. *Inorganic Chemistry Communications* 2007, 10, 925-929.
24. Hung, H.-C.; Cheng, C.-W.; Ho, I. T.; Chung, W.-S., Dual-mode Recognition of Transition Metal Ions by Bis-triazoles Chained Pyrenes. *Tetrahedron Letters* 2009, 50, 302-305.
25. Jiang, P.; Guo, Z., Fluorescent Detection of Zinc in Biological Systems: Recent Development on the Design of Chemosensors and Biosensors. *Coordination Chemistry Reviews* 2004, 248, 205-229.
26. Zhou, Y.; Zhu, C.-Y.; Gao, X.-S.; You, X.-Y.; Yao, C., Hg<sup>2+</sup>-Selective Ratiometric and “Off–On” Chemosensor Based on the Azadiene–Pyrene Derivative. *Organic Letters* 2010, 12, 2566-2569.
27. Bhalla, V.; Tejpal, R.; Kumar, M.; Puri, R. K.; Mahajan, R. K., Terphenyl Based ‘Turn On’ Fluorescent Sensor for Mercury. *Tetrahedron Letters* 2009, 50, 2649-2652.
28. Kim, J. S.; Choi, M. G.; Song, K. C.; No, K. T.; Ahn, S.; Chang, S.-K., Ratiometric Determination of Hg<sup>2+</sup> Ions Based on Simple Molecular Motifs of Pyrene and Dioxaoctanediamide. *Organic Letters* 2007, 9, 1129-1132.
29. Hou, C.; Xiong, Y.; Fu, N.; Jacquot, C. C.; Squier, T. C.; Cao, H., Turn-on Ratiometric Fluorescent Sensor for Pb<sup>2+</sup> Detection. *Tetrahedron Letters* 2011, 52, 2692-2696.

30. Chandrasekhar, V.; Pandey, M. D., Fluorescence Sensing of  $\text{Cu}^{2+}$  and  $\text{Hg}^{2+}$  by a Dipyrene Ligand Involving an Excimer-Switch off Mechanism. *Tetrahedron Letters* 2011, 52, 1938-1941.
31. Martínez, R.; Espinosa, A.; Tárraga, A.; Molina, P., New  $\text{Hg}^{2+}$  and  $\text{Cu}^{2+}$  Selective Chromo- and Fluoroionophore Based on a Bichromophoric Azine. *Organic Letters* 2005, 7, 5869-5872.
32. Chen, K.-H.; Lu, C.-Y.; Cheng, H.-J.; Chen, S.-J.; Hu, C.-H.; Wu, A.-T., A Pyrenyl-appended Triazole-based Ribose as a Fluorescent Sensor for  $\text{Hg}^{2+}$  Ion. *Carbohydrate Research* 2010, 345, 2557-2561.
33. Elder, J. F., Metal Biogeochemistry in Surface-Water Systems-A Review of Principles and Concepts. *Geological Survey Circular* 1988, 1013, 43.
34. Kwong, Y. T. J.; Roots, C. F.; Roach, P.; Kettley, W., Post-mine Metal Transport and Attenuation in the Keno Hill Mining District, Central Yukon, Canada. *Environmental Geology* 1997, 30, 98-107.
35. Costa, M.; Davidson, T. L.; Chen, H.; Ke, Q.; Zhang, P.; Yan, Y.; Huang, C.; Kluz, T., Nickel Carcinogenesis: Epigenetics and Hypoxia Signaling. *Mutation Research* 2005, 592, 79-88.
36. Gómez, A.; Meza, F., D.; Villalba Atondo, A., Estimation of Potential Pollution from Mine Tailings in the San Pedro River (1993-2005), México-US Border. *Environmental Geology* 2008, 57, 1469-1479.
37. Meza-Figueroa, D.; Maier, R. M.; de la O-Villanueva, M.; Gómez-Alvarez, A.; Moreno-Zazueta, A.; Rivera, J.; Campillo, A.; Grandlic, C. J.; Anaya, R.; Palafox-Reyes, J., The Impact of Unconfined Mine Tailings in Residential Areas From a Mining Town in a Semi-arid Environment: Nacozari, Sonora, Mexico. *Chemosphere* 2009, 77, 140-147.
38. López-Ríos, O.; Lechuga-Anaya, M., Contaminantes en los Cuerpos de Agua del Sur de Sonora. *Secretaría de Salud Pública* 2001, 43, 298-305.
39. Miller, J. N.; Miller, J. C., *Estadística Aplicada a la Química Analítica*. 2 ed.; Addison-Wesley Iberoamericana: Wilmington, EUA, 1998.
40. NMX-AA-051-SCFI-2001, N., Análisis de Agua-determinación de metales por absorción atómica en aguas naturales, potables, residuales y residuales tratadas-método de prueba. (*CANCELA A LA NMX-AA-051-1981*).
41. Lakowicz, J. R., *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Springer: 2006.