



**UNIVERSIDAD DE GRANADA**  
Facultad de Ciencias  
Departamento de Química Analítica

**NUEVAS FRONTERAS METODOLÓGICAS DE LA  
FOSFORESCENCIA A TEMPERATURA AMBIENTE.  
FOSFORESCENCIA INDUCIDA POR ÁTOMOS PESADOS Y  
OPTOSENSORES**

Alfonso Salinas Castillo

**Tesis Doctoral  
Granada, 2005**



**Esta Tesis ha sido financiada por el Ministerio de Ciencia y Tecnología (proyecto MAT2003-09074-C02), la Consejería de Medio Ambiente de la Junta de Andalucía, la Fundación UNICAJA, el Plan propio de Investigación de la Universidad de Granada y los fondos propios del grupo FQM-297 “Control Analítico Ambiental, Bioquímico y Alimentario” del Plan Andaluz de Investigación y Desarrollo Tecnológico.**



**NUEVAS FRONTERAS METODOLÓGICAS DE LA FOSFORESCENCIA A TEMPERATURA  
AMBIENTE. FOSFORESCENCIA INDUCIDA POR ÁTOMOS PESADOS Y OPTOSENSORES**

**por**

**Alfonso Salinas Castillo**

Visado en Granada a 20 de abril de 2005

Fdo: Dr. D. Alberto Fernández Gutiérrez  
Catedrático del Departamento de Química Analítica  
Facultad de Ciencias. Universidad de Granada

Fdo: Dr. Antonio Segura Carretero  
Profesor Titular del Departamento de Química Analítica  
Facultad de Ciencias. Universidad de Granada

Trabajo presentado para optar al Grado de Doctor en Ciencias Químicas.

Fdo: Alfonso Salinas Castillo



D. ALBERTO FERNÁNDEZ GUTIÉRREZ, Catedrático del Departamento de Química Analítica de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Granada y responsable del Grupo de Investigación FQM 297 "Control Analítico Ambiental, Bioquímico y Alimentario"

## **CERTIFICA**

Que el trabajo que se presenta en esta TESIS DOCTORAL con el título "NUEVAS FRONTERAS METODOLÓGICAS DE LA FOSFORESCENCIA A TEMPERATURA AMBIENTE. FOSFORESCENCIA INDUCIDA POR ÁTOMOS PESADOS Y OPTOSENSORES", ha sido realizada bajo mi dirección y la del doctor D. Antonio Segura Carretero en los laboratorios del Departamento de Química Analítica de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Granada y reúne todos los requisitos para poder optar al Grado de Doctor en Ciencias Químicas.

Y para que conste, expido y firmo el presente certificado en Granada a 20 de abril de dos mil cinco.





## ÍNDICE



<b>ÍNDICE</b> .....	<b>9</b>
<b>OBJETO DE LA MEMORIA</b> .....	<b>17</b>
<b>INTRODUCCIÓN. Espectroscopia de fosforescencia: aspectos físico-químicos</b> .....	<b>21</b>
1. Introducción a la fosforimetría.....	25
2. Aspectos fotofísicos del fenómeno luminiscente .....	26
3. Metodologías fosforescentes a temperatura ambiente.....	43
<b>REACTIVOS, INSTRUMENTACIÓN Y METODOLOGÍA</b> .....	<b>59</b>
1. Reactivos.....	63
2. Disoluciones.....	66
3. Instrumentación.....	67
4. Metodología parte A. Fosforescencia a temperatura ambiente inducida por átomos pesados .....	69
5. Metodología parte B. Optosensores fosforescentes a temperatura ambiente...	73
6. Establecimiento de los métodos analíticos .....	80
<b>PARTE A: FOSFORESCENCIA A TEMPERATURA AMBIENTE INDUCIDA POR ÁTOMOS PESADOS</b> .....	<b>85</b>
1. Nacimiento de una metodología fosforescente en disolución acuosa a temperatura ambiente .....	89
2. Denominación de la metodología .....	92
3. Justificación teórica.....	92
4. Desarrollo experimental de la metodología .....	95
5. Ventajas e inconvenientes frente a otras metodologías en disolución .....	102
<b>CAPÍTULO A.1. DETERMINACIÓN DE PRINCIPIOS ACTIVOS DE INTERÉS FARMACOLÓGICO MEDIANTE FOSFORESCENCIA A TEMPERATURA AMBIENTE INDUCIDA POR ÁTOMOS PESADOS EN DISOLUCIÓN</b> .....	<b>107</b>
A.1.1. Generalidades de los analitos .....	111
A.1.2. Estudios preliminares de variables experimentales .....	118
A.1.3. Características espectroscópicas .....	119
A.1.4. Selección de los parámetros instrumentales de medida.....	122
A.1.5. Selección de los parámetros experimentales .....	125
A.1.6. Establecimiento del método analítico .....	130

A.1.7. Aplicaciones del método propuesto a la determinación de dipiridamol en preparados farmacéuticos .....	132
<b>CAPÍTULO A.2 DETERMINACIÓN DE PESTICIDAS MEDIANTE FOSFORESCENCIA A TEMPERATURA AMBIENTE INDUCIDA POR ÁTOMOS PESADOS EN DISOLUCIÓN.....</b>	<b>137</b>
A.2.1. Generalidades de los analitos .....	141
A.2.2. Estudios preliminares de variables experimentales .....	145
A.2.3. Características espectroscópicas .....	146
A.2.4. Selección de los parámetros instrumentales de medida .....	148
A.2.5. Selección de los parámetros experimentales .....	151
A.2.6. Establecimiento de los métodos analíticos .....	157
A.2.7. Estudio de interferentes .....	159
A.2.8. Aplicaciones de los métodos propuestos .....	160
<b>CAPÍTULO A.3. CARACTERIZACIÓN DE HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS MEDIANTE FOSFORESCENCIA A TEMPERATURA AMBIENTE INDUCIDA POR ÁTOMOS PESADOS EN DISOLUCIÓN .....</b>	<b>163</b>
A.3.1. Generalidades de los hidrocarburos aromáticos policíclicos .....	167
A.3.2. Estudios preliminares de variables experimentales .....	180
A.3.3. Características espectroscópicas .....	181
A.3.4. Selección de los parámetros instrumentales de medida .....	187
A.3.5. Selección de los parámetros experimentales .....	191
A.3.6. Establecimiento de los métodos analíticos .....	204
<b>PARTE B. OPTOSENSORES FOSFORESCENTES A TEMPERATURA AMBIENTE.....</b>	<b>211</b>
B.1. Importancia actual, definición y componentes de los sensores .....	215
B.2. Diseño de un sensor .....	220
B.3. Clasificación de los sensores .....	221
B.4. Sensores ópticos .....	224
B.5. Sensores tipo célula de flujo (optosensores) .....	228
B.6. Optosensores fosforescentes a temperatura ambiente .....	234
B.7. La tecnología de impresión molecular en el desarrollo de fases sensoras.....	241
<b>CAPÍTULO B.1. DESARROLLO DE UN OPTOSENSOR FOSFORESCENTE PARA LA DETERMINACIÓN DE NAPTALAN Y SU METABOLITO LA 1-NAFTILAMINA.....</b>	<b>247</b>
B.1.1. Generalidades del naptalan.....	251
B.1.2. Objetivo .....	254
B.1.3. Características espectroscópicas.....	254

B.1.4. Selección de los parámetros instrumentales de medida .....	258
B.1.5. Selección de los parámetros experimentales.....	262
B.1.6. Variables de flujo.....	265
B.1.7. Reoptimización de las condiciones para la determinación conjunta de naptalan y su metabolito la 1-naftilamina .....	267
B.1.8. Características analíticas del método .....	273
B.1.9. Aplicaciones del método propuesto .....	276
<b>CAPÍTULO B.2. CARACTERIZACIÓN FOSFORIMÉTRICA EN FASE SÓLIDA DE HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS. OPTOSENSOR FOSFORESCENTE SELECTIVO PARA LA DETERMINACIÓN DE BENZO(α)PIRENO .....</b>	<b>277</b>
B.2.1. Estudio potencial para el desarrollo de optosensores fosforescentes para hidrocarburos aromáticos policíclicos .....	281
B.2.2. Optosensor selectivo para la determinación de benzo(a)pireno .....	289
<b>CAPÍTULO B.3. DESARROLLO DE NUEVAS FASES SENSORAS MEDIANTE LA TÉCNICA DE IMPRESIÓN MOLECULAR PARA LA DETERMINACIÓN DE HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS .....</b>	<b>305</b>
B.3.1. De resinas comerciales al diseño de polímeros.....	309
B.3.2. Elección de componentes de polímeros impresos moleculares.....	309
B.3.3. Síntesis de los polímeros impresos moleculares.....	313
B.3.3. Evaluación de los polímeros impresos fabricados.....	315
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>325</b>
<b>PUBLICACIONES DERIVADAS .....</b>	<b>331</b>



**OBJETO DE LA MEMORIA**





## OBJETO DE LA MEMORIA

Entre las numerosas técnicas instrumentales de análisis, las técnicas luminiscentes, por sus características inherentes de sensibilidad y selectividad, han atraído gran número de estudios encaminados a desarrollar nuevas y más fáciles metodologías de trabajo. Una de estas técnicas, concretamente la fosforescencia a temperatura ambiente en disolución ha sido, hasta hace pocos años, una técnica de análisis restringida a unas pocas aplicaciones, debido a la dificultad en la puesta a punto de los métodos propuestos. Sin embargo, el desarrollo de metodologías más cómodas y fáciles de realizar ha hecho que esta técnica esté adquiriendo relevancia analítica en los últimos años.

El objetivo principal de la presente Tesis Doctoral es poner de manifiesto el potencial de dos de las líneas menos desarrolladas de la fosforescencia a temperatura ambiente en disolución como son la fosforescencia a temperatura ambiente inducida por átomos pesados ("Heavy Atom Induced Room Temperature Phosphorescence" HAI-RTP) y el desarrollo de sensores fosforescentes en flujo (optosensores fosforescentes) tratando de ver problemas analíticos planteados en distintos campos de interés como son el farmacéutico y el ambiental.

Para la consecución del objetivo principal se perseguirán los siguientes objetivos:

- Establecimiento de métodos analíticos para la determinación de compuestos de interés farmacológico o ambiental mediante el uso de la fosforescencia a temperatura ambiente inducida por átomos pesados. Demostrando su aplicabilidad, evaluando sus prestaciones en el análisis de fármacos y en el control ambiental (análisis de hidrocarburos aromáticos policíclicos y pesticidas en agua y suelo).
- Desarrollo de optosensores fosforescentes para la determinación selectiva o conjunta de analitos de una misma familia química (métodos de criba o "screening"). Se demostrará su aplicabilidad evaluando sus características analíticas en la determinación de pesticidas y HAPs en agua.
- También se propone como objetivo, el estudio y desarrollo de nuevas fases sensoras luminiscentes basadas en el empleo de estructuras selectivas de reconocimiento preparadas mediante la tecnología de polímeros impresos molecularmente para su implementación en optosensores fosforescentes.



**INTRODUCCIÓN**  
**Espectroscopia de fosforescencia:**  
**aspectos físico-químicos**



## INTRODUCCIÓN

### ESPECTROSCOPIA DE FOSFORESCENCIA: ASPECTOS FÍSICO-QUÍMICOS

<b>1. INTRODUCCIÓN A LA FOSFORIMETRÍA .....</b>	
<b>2. ASPECTOS FOTOFÍSICOS DEL FENÓMENO FOSFORESCENTE .....</b>	
2.1. Absorción y emisión de luz a nivel molecular.....	
2.2. Influencia de la estructura molecular y los sustituyentes .....	
2.3. Influencia del entorno químico en la fosforescencia .....	
2.3.1. Efecto de la temperatura.....	
2.3.2. Efecto del disolvente.....	
2.3.3. Efecto del pH (efecto de ácidos y bases) .....	
2.3.4. Atenuación de fotoluminiscencia .....	
2.3.5. Influencia de átomos pesados, iones metálicos y sustancias para magnéticas .....	
2.3.6. Fotoluminiscencia de agregados moleculares .....	
<b>3. METODOLOGÍAS FOSFORESCENTES A TEMPERATURA AMBIENTE .....</b>	
3.1. Fosforescencia a baja temperatura.....	
3.2. Fosforescencia a temperatura ambiente sobre soporte sólido.....	
3.3. Fosforescencia a temperatura ambiente en disolución.....	
3.3.1. Fosforescencia sensibilizada .....	
3.3.2. Fosforescencia a temperatura ambiente en medios micelares y microemulsiones.....	
3.3.3. Fosforescencia a temperatura ambiente con ciclodextrinas .....	
3.3.4. Fosforescencia a temperatura ambiente inducida por átomos pesados .....	



## 1. INTRODUCCIÓN A LA FOSFORIMETRÍA

Los fenómenos de luminiscencia molecular son aquellos en los que tiene lugar una absorción de energía por parte de la molécula y un proceso posterior de emisión de radiación electromagnética en el que intervienen, básicamente, los estados electrónicos moleculares excitados y fundamentales. Dichos fenómenos de luminiscencia se clasifican según la fuente de excitación o forma de generar la energía que excita en: fotoluminiscencia (fluorescencia y fosforescencia) quimioluminiscencia, termoluminiscencia, radioluminiscencia, cátodoluminiscencia, electroluminiscencia, triboluminiscencia, sonoluminiscencia y piroluminiscencia.

Las técnicas luminiscentes son aquellas que se basan en la medida de la radiación electromagnética (r.e.m) y a pesar de que su campo de aplicación es más restringido que el de otras técnicas ópticas como son las de absorción, es fácil demostrar que las técnicas luminiscentes presentan una serie de ventajas. Entre éstas se pueden destacar la sensibilidad inherente, con límites de detección que suelen ser tres órdenes de magnitud menores que las técnicas de absorción, los intervalos lineales de concentraciones suelen ser superiores y especialmente la selectividad.

Las dos técnicas espectroscópicas luminiscentes más importantes son la fluorimetría y la fosforimetría. Ambas están basadas en la detección y análisis de la emisión de radiación electromagnética de una especie excitada por absorción de fotones. La diferencia entre ambas, desde el punto de vista de su fundamento físico-químico, son las transiciones electrónicas implicadas en la emisión ( $S_1-S_0$  en el caso de la fluorescencia y  $T_1-S_0$  en el caso de la fosforescencia), que confieren a la fosforimetría características especiales (p. ej. tiempos de vida largos y longitudes de onda de emisión mayores con respecto a la fluorescencia).

La fosforimetría presenta una serie de ventajas analíticas frente a la fluorimetría, entre las que se puede destacar la sensibilidad, la linealidad de la respuesta y especialmente la selectividad. La fluorimetría es una técnica que permite detectar concentraciones del orden de los ng/mL, sin embargo, la fosforimetría, es capaz de detectar cantidades en algunos casos inferiores a los ng/mL. Esto se debe, principalmente, a que los efectos debidos a la luz dispersada no se dan apenas en fosforimetría y esto permite trabajar en esta técnica con rendijas más anchas. La fosforimetría proporciona un mayor intervalo de linealidad que la fluorimetría, lo cual resulta muy interesante en gran número de análisis. Este intervalo está comprendido entre 4 y 6 órdenes de magnitud en fosforimetría, extendiéndose desde los pocos ng/mL a  $10^3$

$\mu\text{g/mL}$ , mientras que el intervalo de linealidad que proporciona la fluorimetría es generalmente de  $100 \text{ ng/mL}$  a  $200 \mu\text{g/mL}$ .

Otra gran ventaja de la fosforimetría frente a la fluorimetría es la selectividad. Intrínsecamente la fosforimetría posee, una mayor selectividad que la fluorimetría dado que no todas las moléculas que presentan fluorescencia son fosforescentes, lo que conlleva, una disminución en el número de posibles interferencias en la puesta a punto un determinado método de análisis. La señal fluorescente proporciona dos parámetros de selectividad como son las longitudes de onda de excitación y emisión, mientras que en la emisión fosforescente ofrece tres parámetros ya que hay que incluir también el tiempo de vida. Además, la emisión de fosforescencia aparece a longitudes de onda mayores que la fluorescencia, este hecho se traduce, asimismo, en una mayor selectividad dado que la emisión va a aparecer en una región espectral en la que hay menos posibilidades de que se produzca emisión por parte de posibles interferencias.

A pesar de algunas desventajas como son una mayor imprecisión de las medidas y cierta dificultad experimental las ventajas visualizan un interesante potencial de la técnica de la que anima a profundizar en el conocimiento pormenorizado de sus fundamentos fotofísicos y metodologías.

## 2. ASPECTOS FOTOFÍSICOS DEL FENÓMENO FOSFORESCENTE

### 2.1. Absorción y emisión de luz a nivel molecular

El estudio de la fosforimetría comienza en 1888, cuando Wiedemann [1] describe, por primera vez, una emisión fosforescente en disoluciones sólidas de algunos colorantes orgánicos. Sin embargo, no fue hasta cuarenta y siete años después cuando Jablonskii [2] propuso su conocido esquema de niveles de energía para explicar el fenómeno fosforescente. Este diagrama se ha convertido en una herramienta útil, incluso en nuestros días, para ilustrar los mecanismos de activación, conversión y desactivación que siguen a la excitación de una molécula a un estado excitado,  $S_n$ . Los principales procesos fotoquímicos que ocurren se muestran en la Figura 1:

- 
1. E. Wiedemann. *Ann. Physik*, 34 (1888) 446.
  2. Jablonskii. *Z. Physik*, 94 (1935) 38.



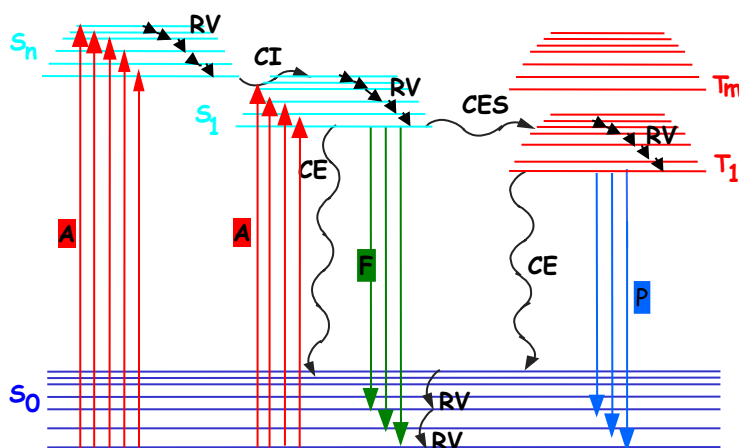


Figura 1. Diagrama de Jablonskii

En él se muestran las diferentes transiciones radiantes y no radiantes en una molécula después de su excitación a un estado singlete (A absorción; RV relajación vibracional, CE conversión externa, CI conversión interna; F fluorescencia, CES cruce entre sistemas, P fosforescencia)

Las moléculas orgánicas en el estado fundamental presentan los electrones por pares en los diferentes orbitales moleculares empezando por los de más baja energía. Por el principio de exclusión de Pauli, en un átomo no puede haber dos electrones con los cuatro números cuánticos iguales o lo que es lo mismo, los dos electrones de un orbital dado deben tener espines en direcciones opuestas y el espín total  $S$  debe ser igual a cero. Debido a esto, el estado fundamental no tiene un espín electrónico neto y tal estado es denominado como estado singlete.

La absorción (A) es el resultado de la interacción del campo eléctrico asociado a la luz con los electrones menos energéticos de la molécula en cuestión, en este caso, la molécula absorbente. La interacción del campo eléctrico con estos electrones altera la distribución electrónica de dicha molécula y provoca que la energía sea cedida por el campo eléctrico de la onda y se utilice en la promoción energética de dichos electrones. Esta absorción de energía se produce en un tiempo del orden de  $10^{-15}$  s. La intensidad de luz absorbida ( $I_a$ ) viene dada por la ley de Lambert-Beer:

$$I_a = I_0 - I_t = I_0 \cdot (1 - 10^{-\epsilon Cl}) \quad (\text{Ecuación 1})$$

donde  $I_0$  e  $I_t$  son las intensidades de luz incidente y luz transmitida respectivamente,  $\epsilon$  es la absorptividad molar, la cual representa la probabilidad de absorción para cada especie molecular,  $C$  es la concentración de la sustancia absorbente (mol/L) y  $l$  es la profundidad en centímetros del recipiente de la muestra.

La energía de la luz viene dada por la ecuación de Planck:

$$E = Nh\nu = Nhc / \lambda \quad (\text{Ecuación 2})$$

donde E es la energía asociada a la frecuencia ( $\nu$ ) y longitud de onda ( $\lambda$ ), c es la velocidad de la luz y N es el número de Avogadro. El hecho de que los niveles de energía moleculares estén cuantizados prevee que una especie molecular dada absorberá solamente luz si la energía (E) coincide con la diferencia de energía entre el estado electrónico fundamental y el estado electrónico en la molécula excitada.

Cada estado molecular electrónico tiene varios estados vibracionales asociados. En el estado electrónico fundamental casi todas las moléculas se encuentran en su estado vibracional más bajo a temperatura ambiente. Al excitar con una radiación de la zona del UV o el visible, se provoca que la molécula sea excitada a un estado vibracional de un estado electrónico excitado. La pérdida del exceso de energía vibracional y electrónica en la molécula ocurre inmediatamente, y ésta es absorbida por otras moléculas (experimentalmente moléculas del disolvente que se encuentran en constantes colisiones elásticas con la molécula excitada). La desactivación no radiante del estado excitado de la molécula se llama relajación vibracional (RV) cuando ésta pierde la energía vibracional dentro de un cierto estado electrónico dado y conversión interna (CI) cuando sufre una transición de un estado electrónico superior a uno más bajo con la misma multiplicidad de espín sin emitir radiación. Relajación vibracional y conversión interna llevan a la molécula al nivel vibracional más bajo de su estado singlete excitado más bajo en un periodo de  $10^{-14}$  a  $10^{-12}$  s.

Muchas moléculas regresan de nuevo al estado fundamental electrónico por desactivación térmica; sin embargo, en algunas moléculas, concretamente aquellas con estructura rígida, el retorno desde el estado excitado singlete más bajo al nivel vibracional más bajo del estado electrónico ocurre por mecanismos más lentos que la CI o la RV. Uno de éstos implica emisión directa de radiación visible o ultravioleta cuyas frecuencias y longitudes de onda vienen dadas por la diferencia de energía entre el estado singlete excitado más bajo y el estado electrónico fundamental. La transición radiativa entre estos estados ocurre entre  $10^{-11}$  y  $10^{-7}$  s después de la excitación inicial y se llama fluorescencia (F). El hecho de que el estado fundamental electrónico de la molécula tenga varios niveles vibracionales causa que su fluorescencia no ocurra a una sola longitud de onda, lo cual difiere por lo sugerido en la ecuación 2. De hecho, la fluorescencia se manifiesta sobre un amplio rango de longitudes de onda los cuales corresponden a varias transiciones vibracionales que son componentes de una única

transición electrónica.

Varios procesos compiten con la fluorescencia en la desactivación del estado singlete excitado más bajo. Como consecuencia, la intensidad de la fluorescencia ( $F$ ) se obtiene al multiplicar  $I_0$  (ecuación 1) por la fracción de moléculas excitadas ( $\phi_f$ ) que logran fluorecer.

$$F = \phi_f \cdot I_0 \quad (\text{Ecuación 3})$$

donde  $\phi_f$  es conocido como el rendimiento cuántico de fluorescencia o eficiencia o eficacia de fluorescencia. Usualmente es menor de la unidad pero puede llegar a valer la unidad en casos excepcionales. Su valor está relacionado con la constante de velocidad de desactivación fluorescente ( $k_f$ ) y con todos los procesos moleculares competitivos que no producen radiación ( $k_d$ ) por medio de la siguiente ecuación:

$$\phi_f = \frac{k_f}{k_f + k_d} \quad (\text{Ecuación 4})$$

Por tanto, cuantos más procesos no radiantes se encuentren compitiendo con la fluorescencia por la desactivación del estado singlete excitado más bajo, más pequeño será el valor numérico de  $\phi_f$  y por tanto, el valor de  $F$  (fluorescencia) también disminuirá. De las ecuaciones 2 y 4 se deriva la siguiente expresión:

$$F = \phi_f \cdot I_0 \cdot (1 - 10^{-\epsilon c l}) \quad (\text{Ecuación 5})$$

Otra propiedad importante de las moléculas fluorescentes es el tiempo de vida del estado singlete excitado más bajo ( $\tau_f$ ). Si la velocidad media de fluorescencia es el número de actos fluorescentes que ocurren por unidad tiempo, la vida media del estado singlete excitado más bajo es la inversa de la velocidad; o sea, cuanto más rápidos ocurran los actos internos que producen radiación, menos tiempo durará la misma. El rendimiento cuántico de la fluorescencia y el tiempo de vida del estado excitado están relacionados por la siguiente ecuación:

$$\tau_f = \phi_f \cdot \tau_N \quad (\text{Ecuación 6})$$

donde  $\tau_N$  es el tiempo de vida del estado excitado y coincidiría con la vida media de la fluorescencia de la molécula si ésta fuese el único proceso por la cual la molécula se desactiva desde el estado singlete excitado más bajo.  $\tau_f$  y  $\phi_f$  dependen de las clases y velocidades de los procesos que compiten con la fluorescencia. En contraste, tanto  $\tau_N$  como  $\varepsilon$  dependen únicamente de la estructura molecular.

Existe otro mecanismo por el cual una molécula se puede desactivar de su estado singlete excitado más bajo y que, normalmente, ocurre al mismo tiempo que la fluorescencia. Este mecanismo se denomina cruzamiento entre sistemas (CES) y tiene lugar desde el estado singlete excitado más bajo al estado triplete excitado más bajo.

El cruzamiento entre sistemas está acompañado por un cambio del momento angular del espín lo cual viola la ley de conservación del momento angular. El hecho de que éste ocurra es un millón de veces menos probable (más lento) que la conversión interna (cambio de estado singlete a singlete). Este cruzamiento entre sistemas ocurre a una velocidad comparable a la del fenómeno fluorescente, por lo tanto, compite con ella.

Las moléculas que se desactivan por medio de cruzamiento entre sistemas llegarán por relajación vibracional al nivel vibracional más bajo del estado triplete excitado más bajo. Desde este estado, las moléculas pueden pasar al estado electrónico fundamental ( $S_0$ ) con o sin emisión de radiación. Esta emisión radiativa involucrada en la transición del estado triplete al estado fundamental electrónico más bajo se llama fosforescencia (P). Esta transición también está prohibida por la ley de conservación del momento angular y se caracteriza por su larga duración ( $10^{-6}$ – $10$  s).

Algunas moléculas o bien fluorescen o bien fosforecen, lo cual las hace complementarias, en vez de competitivas, desde un punto de vista analítico. Sin embargo, algunas especies moleculares tienen la capacidad de fluorescer y fosforecer al mismo tiempo. En este caso, la banda con longitud de onda más larga es la fosforescencia debido a que el estado triplete siempre se encuentra en un estado de energía más bajo que el estado excitado singlete más bajo (figura 3).

Los diferentes estados tripletes  $T_1, T_2, \dots, T_n$  tienen energías más bajas que los correspondientes estados singletes  $S_1, S_2, \dots, S_n$  debido a la regla de Hund, la cual establece que la energía asociada con un estado de espines paralelos es siempre más

baja que uno con los espines antiparalelos. Como resultado de la regla de Hund, la fosforescencia ocurre a longitudes de onda mayores que la fluorescencia.

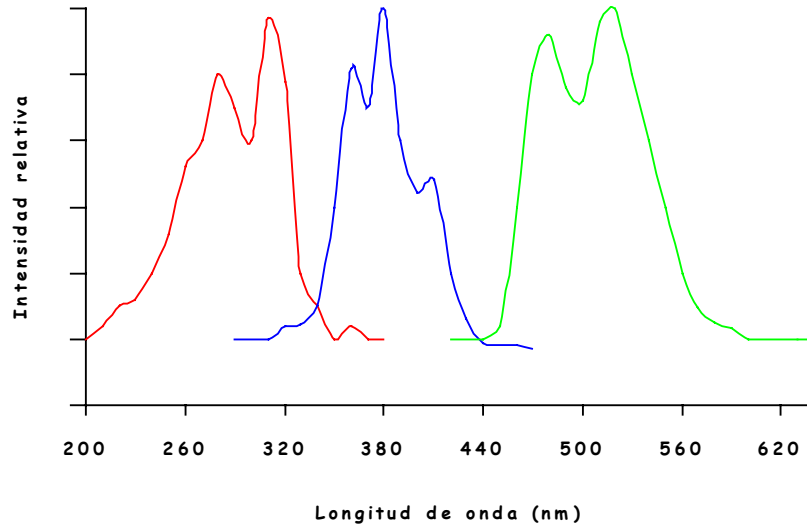


Figura 2. Espectros de excitación (—), fluorescencia (—) y fosforescencia en etanol a temperatura ambiente sobre soporte sólido (—) (papel de filtro) del fenantreno.

La relación entre la concentración de la sustancia fosforescente y la emisión de fosforescencia es similar a la relación indicada previamente para fluorescencia.

$$P = \phi_{CES} \cdot \phi_p \cdot I_0 (1 - 10^{-\epsilon Cl}) \quad (\text{Ecuación 7})$$

En esta ecuación,  $I_0$ ,  $\epsilon$ ,  $C$  y  $l$  representan lo mismo que en la ecuación 5, y  $P$  sería la fosforescencia;  $\phi_{CES}$ , el rendimiento cuántico del cruzamiento entre sistemas y  $\phi_p$  es el rendimiento cuántico de fosforescencia.

$$1 - 10^{-\epsilon Cl} = 2.3 \cdot \epsilon Cl - \frac{(2.3 \cdot \epsilon Cl)^2}{2!} + \frac{(2.3 \cdot \epsilon Cl)^3}{3!} - \dots \quad (\text{Ecuación 8})$$

que en el caso de que la cual si  $\epsilon Cl \leq 0.02$  se reduce a la forma:

$$P = 2.3 \cdot \phi_{CES} \cdot \phi_p \cdot I_0 \cdot \varepsilon \cdot C \cdot l \quad (\text{Ecuación 9})$$

Esta expresión de la señal de emisión fosforescente es la más utilizada en el análisis cuantitativo.

## 2.2. Influencia de la estructura molecular y los sustituyentes

El hecho de que una especie molecular fosforezca depende, sobre todo, de su estructura molecular. La fosforescencia se observa con más frecuencia en moléculas orgánicas muy conjugadas y con un esqueleto molecular rígido. Cuanto menos libertad vibracional y rotacional tenga la molécula, más son las probabilidades de que ésta libere la diferencia de energía entre el nivel vibracional más bajo del estado triplete y el estado singlete fundamental como radiación fosforescente, siempre que se den las circunstancias que favorezcan el cruzamiento entre sistemas.

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos y sus derivados son las moléculas más capacitadas para emitir fosforescencia. Al igual que ocurre con la fluorescencia, en la mayoría de los hidrocarburos aromáticos policíclicos se produce un desplazamiento batocrómico de las longitudes de onda con un incremento en el tamaño del anillo. Por ejemplo, la fosforescencia del antraceno ocurre a longitudes de onda mayores que para el naftaleno y para éste son mayores a su vez que para el benceno (Tabla 1).

**Tabla 1. Características fosforescentes de algunos hidrocarburos aromáticos policíclicos [3]**

Compuesto	$\lambda_p$ (nm)
Benceno	339
Naftaleno	469
Antraceno	670
Fenantreno	460
p-Terfenilo	485
Benzo(a)antraceno	595
Criseno	497
Trifenileno	420
Perileno	800

3. R.S. Becker. "Theory and interpretation of fluorescence and phosphorescence", Wiley-Interscience, New York (1969).

Además, compuestos con anillos lineales presentan habitualmente longitudes de onda mayores que los no lineales [4].

La introducción de un heteroátomo dentro del sistema  $\pi$  aromático confiere nuevas características espectroscópicas al compuesto. Estados singletes  $n\pi^*$  tienen más baja energía que los estados tripletes  $\pi\pi^*$ . Pero los correspondientes estados tripletes  $n\pi^*$  pueden a menudo tener mayor energía que los correspondientes  $\pi\pi^*$ , debido a que la diferencia de energía entre estados singletes y tripletes es más alta para sistemas  $\pi\pi^*$  que para sistemas  $n\pi^*$ .

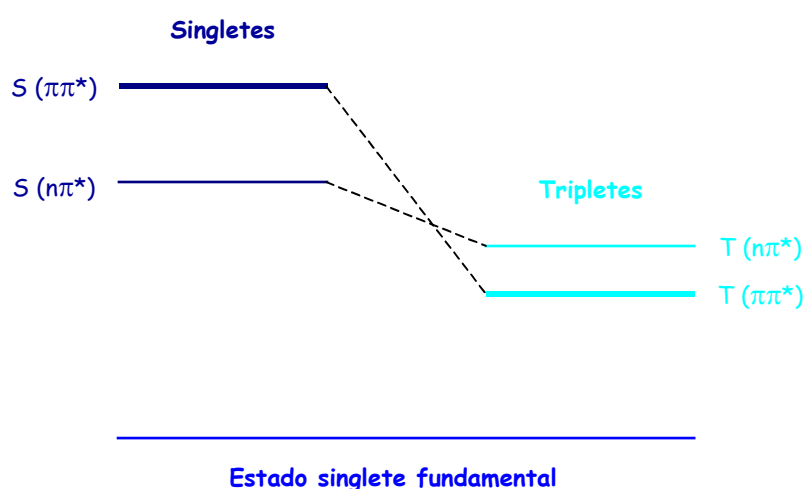


Figura 3. Diagrama de la inversión de los niveles  $n\pi^*$  y  $\pi\pi^*$  en los estados singlete y triplete.

La presencia de estados  $n\pi^*$  y  $\pi\pi^*$  de diferente multiplicidad favorece la  $K_{CES}$ , y aumenta el rendimiento cuántico de fosforescencia.

Tabla 3. Características fosforescentes de los N-heterociclos [3]

Compuesto	Triplete menos energético	$\phi_p$	$\lambda_p$ (nm)	$\tau_p$ (s)
Pirazina	$n\pi^*$	0.30	377	0.02
Pirimidina	$n\pi^*$	0.14	353	0.01
s-triazina	$n\pi^*$	muy bajo	379	0.4
Quinolina	$\pi\pi^*$	0.19	457	1.3
Quinoxalina	$\pi\pi^*$	—	465	0.25
9,10-Diazantraceno	$\pi\pi^*$	—	642	0.02

4. J.B. Birks. "Photophysics of aromatic molecules", Wiley-Interscience, New York (1970).

Los sustituyentes nitro pueden generar estados tripletes  $n\pi^*$  muy bajos. Los nitrocompuestos habitualmente no presentan fluorescencia pero pueden fosforecer.

Compuestos tipo pirrol, como son el indol y el carbazol, presentan fosforescencia del tipo  $\pi\pi^*$ . Esto es debido a la conjugación del par de electrones libres del nitrógeno con el sistema de electrones  $\pi$  del anillo aromático adyacente.

Heterociclos de oxígeno y azufre, como son el furano y el tiofeno, tienen una estructura de cinco miembros similar al pirrol. Sin embargo estos compuestos tienen un par adicional de electrones no enlazantes. Puesto que estos electrones no se pueden conjugar con el sistema de electrones  $\pi$ , las transiciones  $n\pi^*$  pueden ocurrir.

Los compuestos carbonilos, a su vez, pueden clasificarse en tres tipos:

- Compuestos que tienen un triple estado menos energético del tipo  $n\pi^*$ , tanto en medios polares como apolares.
- Compuestos que tienen un triple estado menos energético del tipo  $\pi\pi^*$ , tanto en medios polares como apolares.
- Compuestos con el estado triplete  $n\pi^*$  en medios apolares e invertido en  $\pi\pi^*$  en medios polares.

Los compuestos carbonilo del primer tipo están caracterizados por una gran diferencia  $T_m(\pi\pi^*)-T_1(n\pi^*)$ . Así, incrementos en la polaridad del medio deberían incrementar la energía del estado  $n\pi^*$  y bajar la del estado  $\pi\pi^*$  suficientemente para provocar la conversión de estados de los compuestos del segundo tipo con un estado triplete  $\pi\pi^*$  en disolventes no polares serán también  $\pi\pi^*$  en medios polares ya que el estado  $n\pi^*$  es desplazado hacia el azul (más energético) al contrario de lo que ocurre al  $\pi\pi^*$ . Finalmente los compuestos del tercer tipo están generalmente caracterizados por una pequeña diferencia  $T_m(\pi\pi^*)-T_1(n\pi^*)$ . Para estos estados un incremento en la polaridad del disolvente puede provocar una inversión del estado triplete.

Un ejemplo típico de compuestos carbonilo del tercer tipo es la 1,4-naftoquinona. En heptano este compuesto presenta una intensa señal fosforescente pero no fluorescente. En disoluciones apolares como hexano o heptano el estado triplete más bajo es  $n\pi^*$ . En disolventes polares como etanol, el estado triplete más bajo pasa de  $n\pi^*$  a  $\pi\pi^*$  y se observa otro espectro de fosforescencia con una mayor longitud de onda.



Otras especies con grupo carbonilo, como la acetofenona, la benzofenona y benzaldehido también presentan propiedades de estados tripletes  $n\pi^*$ , mientras que se observa fosforescencia de carácter  $\pi\pi^*$  para el 1-naftaldehido (Tabla 4).

**Tabla 4. Características fosforescentes de algunos carbonilos aromáticos [3]**

Compuesto	Triplete menos energético	$\phi_p$	$\lambda_p$ (nm)	$\tau_p$ (s)
Acetofenona	$n\pi^*$	0.63	387	$8 \cdot 10^{-3}$
Benzofenona	$n\pi^*$	0.75	412	$7.7 \cdot 10^{-3}$
Benzaldehido	$n\pi^*$	0.56	397	$1.5 \cdot 10^{-3}$
1-Naftaldehido	$\pi\pi^*$	0.03	507	$8 \cdot 10^{-2}$

Generalmente, los sustituyentes tienen tendencia a incrementar el rendimiento cuántico de fosforescencia, debido a los incrementos en la constante de decaimiento radiante que acompañan la extinción o distorsión de un sistema aromático.

Ciertos grupos funcionales aumentan el rendimiento cuántico de fosforescencia de moléculas aromáticas, entre éstos se encuentran átomos pesados como bromo y yodo y ciertos grupos como  $-\text{NO}_2$  y  $-\text{CHO}$ . Este aumento también ocurre en moléculas con grupos con electrones hibridados en configuración  $sp^2$  como son moléculas con nitrógeno en anillos heterocíclicos de seis miembros como la quinolina.

Estos sustituyentes tienen la capacidad de maximizar el acoplamiento espín-orbital en el sistema aromático. Este proceso favorece que se ocupe el estado triplete más bajo a costa del estado singlete excitado más bajo así como la desactivación radiativa del estado triplete. La ocupación tan eficaz y desactivación radiativa del estado triplete excitado más bajo favorece una fosforescencia de gran intensidad. Como consecuencia, compuestos de nitrógeno, derivados de bromo y yodo, aldehídos, cetonas, y N-heterocíclicos tienden a fluorecer débilmente o simplemente no fluorecen aunque muchos fosforecen intensamente.

## 2.3. Influencia del entorno químico en la fosforescencia

### 2.3.1. Efecto de la temperatura

Cuanto menor es la temperatura el rendimiento cuántico de fosforescencia tiende a ser mayor como resultado de la restricción a las libertades vibracionales, rotacionales y difusionales. Es decir menores eficacias en la conversión interna, desactivación colisional.

De hecho, estudios comparativos entre metodologías a baja temperatura y a temperatura ambiente concluyen que la resolución espectral es peor conforme aumenta la temperatura así como la intensidad de emisión fosforescente. [5,6]

Otros estudios sobre la vida media de la señal fosforescente [7,8]. Demostraron que para varios hidrocarburos aromáticos policíclicos como el naftaleno, fenantreno, pireno y bifenilo, las vidas medias decrecen de un 13 a un 37% si la temperatura aumenta desde 77 °K a temperatura ambiente.

### 2.3.2. Efecto del disolvente

Aunque la capacidad de emitir fosforescencia depende fundamentalmente de la estructura, el entorno químico y particularmente el disolvente en que la molécula se encuentra disuelta, tiene una importante influencia.

Como ya se ha discutido anteriormente, los mecanismos de interacción singlete-triplete que dan al más bajo estado triplete sus características radiantes, dependen no sólo de la naturaleza de  $T_1$  sino también de los niveles energéticos intermedios entre  $T_1$  y  $S_1$ . Un pequeño cambio de energía en uno de estos niveles intermedios puede inducir un incremento drástico en el acoplamiento E-O o suprimir esta interacción.

La dirección del cambio espectral hacia longitudes de onda mayores o menores en disolventes no polares es dependiente de la naturaleza del estado electrónico. El efecto del disolvente es a menudo una herramienta eficaz para confirmar la naturaleza de las transiciones electrónicas.

En una transición  $\pi \leftrightarrow \pi^*$ , el estado electrónico estará más estabilizado por

- 
5. E.M. Schulman, R.T.Parker. *J. Phys. Chem.*, 81 (1977) 1932.
  6. C.G. De Lima, E.M. Incola. *Anal. Chem.*, 50 (1978) 1658.
  7. P.F. Jones, S. Siegel. *J. Chem. Phys.*, 50 (1969) 1134.
  8. R.P. Widman, J.R. Huber. *J. Chem.*, 81(1972) 1524.

solvatación en el estado fundamental como resultado de un desplazamiento de carga debida a la transición electrónica y por tanto, permitirá un desplazamiento de la banda hacia el rojo con un incremento de la polaridad del disolvente.

Para transiciones  $n \leftrightarrow \pi^*$ , el momento dipolar de la molécula de soluto decrece con la transición electrónica, las correspondientes bandas de absorción se desplazarán hacia longitudes de onda más cortas con el incremento de la polaridad del disolvente.

Además de los efectos específicos que incluyen cambios espectrales de los estados electrónicos, son posibles otros efectos importantes, menos específicos, de los disolventes. Por ejemplo, las vidas medias fosforescentes de los heterociclos nitrogenados como son la isoquinoleína, quinolina y fenantridina son mayores en un disolvente conteniendo moléculas con puentes de hidrógeno que en un disolvente apolar [9].

En moléculas con átomos que tienen pares de electrones sin enlazar en configuración electrónica  $sp^2$  (p. ej. compuestos carbonilo y ciertos N-heterocíclicos) el estado excitado singlete más bajo se forma al promover un electrón libre  $n$  a un orbital  $\pi^*$  vacío. Esto se conoce como estado singlete  $n\pi^*$ . Estas moléculas tienden a fosforecer antes que a fluorecer en disolventes apróticos, tales como hidrocarburos alifáticos, debido a que en éstos el estado excitado singlete  $n\pi^*$  es desactivado de forma eficaz por medio de cruzamiento entre sistemas singlete-triplete. Sin embargo, en disolventes protonados como agua o etanol estas moléculas se vuelven fluorescentes a costa de la fosforescencia. Esto es debido a la desestabilización del estado singlete  $n\pi^*$  más bajo por medio de enlaces de hidrógeno. Si esta interacción es suficientemente fuerte el estado singlete fluorescente  $n\pi^*$  se convierte en el estado singlete excitado más bajo el cual no se puede desactivar eficazmente por medio de cruzamiento entre sistemas singlete-triplete y por lo tanto se favorecerá la fluorescencia. Un ejemplo es la isoquinolina la cual flourece en agua pero no en ciclohexano, en éste se convierte en fosforescente.

Los disolventes que contienen átomos con números atómicos altos (p. ej. alquil yoduros) mejoran sustancialmente la intensidad de fosforescencia de moléculas en solución. Éstos "enjaulan" a las moléculas del soluto favoreciendo el acoplamiento espín-orbital en el estado singlete excitado más bajo del mismo. Esto favorece la ocupación sin emisión de radiación del estado triplete más bajo a costa del estado

singlete excitado más bajo. Por lo tanto en disolventes con átomos pesados la intensidad de fluorescencia siempre será inferior que en disolventes de masa molecular más ligera. Al mismo tiempo, la fosforescencia es generalmente aumentada por disolventes de alto peso atómico. Casi siempre es necesaria una fuente de átomos pesados externa para que la fosforescencia se pueda observar a temperatura ambiente en disolución.

### 2.3.3. Efecto del pH (efecto de ácidos y bases)

La influencia de la acidez y basicidad de una solución en el espectro de fosforescencia se deriva de la disociación de grupos funcionales ácidos o de la protonación de grupos funcionales básicos los cuales están íntimamente asociados con partes aromáticas de las moléculas fosforescentes. Dicha protonación o disociación puede alterar la naturaleza y velocidades de los procesos no radiantes que compiten con la fotoluminiscencia y por lo tanto pueden afectar el rendimiento cuántico de cruzamiento entre sistemas y por consiguiente a la emisión.

Como ejemplo, la benzofenona no flourece pero es intensamente fosforescente como resultado de un estado de excitación singlete  $n\pi^*$  el cual es rápidamente desactivado por medio de cruzamiento entre sistemas. Sin embargo, en soluciones ácidas concentradas en donde el grupo carbonilo es protonado, la benzofenona flourece intensamente y no fosforece. Evidentemente, en la forma catiónica de la molécula, el estado singlete  $\pi\pi^*$  se encuentra debajo del estado  $n\pi^*$  el cual no flourece.

La protonación y disociación alteran las separaciones relativas entre el estado fundamental y el estado triplete de las moléculas luminiscentes, y por lo tanto provocan un cambio en el espectro de luminiscencia. Estos cambios tienden a ser más tenues en el espectro de fosforescencia que en el espectro de absorción o fluorescencia y son debidos a la estabilización electrostática del estado fundamental, o lo que es lo mismo, a la desestabilización del estado excitado con relación al estado fundamental, producida por dicha protonación o disociación.

La protonación de grupos electronegativos (aceptores de electrones) como son el grupo carboxilo, carbonilo y nitrógeno piridínico, provoca cambios en el espectro de fosforescencia a longitudes de onda mayores mientras que la protonación de grupos

---

9. E.C. Lim, J. Yu. *J. Chem. Phys.*, 45 (1966) 4742.

electropositivos, como el grupo amino, produce cambios en el espectro hacia longitudes de onda más cortas.

### 2.3.4. Atenuación de fotoluminiscencia

La fosforescencia de especies luminiscentes puede ser reducida, e incluso eliminada, por medio de interacciones con otras especies moleculares en solución. Este fenómeno se conoce como atenuación de fosforescencia. Existen dos clases diferentes, la atenuación estática y la dinámica.

En la atenuación estática, las interacciones entre moléculas potencialmente fosforescentes y la especie atenuadora ocurren en el estado fundamental formando un complejo incapaz de emitir luminiscencia. La eficacia de la atenuación está gobernada por la constante de formación del complejo así como por la concentración del atenuador. Un ejemplo es la atenuación del compuesto 2,9-Dimetil-1,10-fenantrolina cuando se compleja con cobre.

En el caso de atenuación dinámica, la especie atenuadora y la especie potencialmente fosforescente reaccionan durante el tiempo de vida del estado excitado del compuesto fosforescente. Esta atenuación dinámica también se conoce como atenuación difusional y su eficacia depende de la viscosidad de la solución, del tiempo de vida del estado excitado de la especie luminiscente en ausencia de atenuadores ( $\tau_0$ ) y por supuesto de la concentración del atenuador.

Estas interacciones se recogen en la ecuación de Stern-Volmer:

$$\frac{\phi_p}{\phi_p^0} = \frac{1}{1 + k_Q \cdot \tau_p \cdot [Q]} \quad (\text{Ecuación 10})$$

donde  $k_Q$  es la constante de desactivación por choques intermoleculares entre la sustancia atenuadora y la molécula potencialmente fosforescente,  $\phi_p^0$  y  $\phi_p$  son los rendimientos cuánticos de fosforescencia en ausencia y presencia del atenuador, respectivamente y  $[Q]$  representa la concentración de la sustancia atenuadora.

El valor de  $k_Q$  típico en reacciones controladas por difusión es del orden de  $10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  mientras que en moléculas fosforescentes, el valor de  $\tau_0$  se encuentra entre  $10^{-4}$  y  $10$  s de manera tal que:

$$10^6 \text{ M}^{-1} < k_Q \tau_0 < 10^{11} \text{ M}^{-1}.$$

Por lo tanto, si la concentración de oxígeno molecular es  $10^{-3}$  M en agua a presión atmosférica,  $\phi_p/\phi_p^0$  es inapreciable para todas las especies moleculares fosforescentes. Este hecho es responsable probablemente de la pequeña cantidad de moléculas que son capaces de fosforecer en soluciones aireadas o fluidas.

### 2.3.5. Influencia de átomos pesados, iones metálicos y sustancias paramagnéticas

La velocidad de CES puede ser aumentada por la presencia de átomos de elevado peso molecular. Puesto que en la probabilidad de los procesos de CES influye el acoplamiento E-O, el cual a su vez depende del número atómico de los átomos en las proximidades del electrón excitado, la emisión fosforescente se incrementa por sustituyentes halogenados y más cuanto mayor sea su número atómico. Esto es denominado efecto de átomo pesado interno que también produce una atenuación de la fluorescencia y un descenso de la vida media de fosforescencia [10], como se muestra en la Tabla 5.

**Tabla 5. Efecto de átomo pesado interno de sustituyentes halógenos en naftaleno [10]**

Sustituyente	$\phi_f$	$\phi_P$	$\tau_p$	$K_{CES}$
H	0.55	0.051	2.6	$1 \cdot 10^5$
F	0.84	0.056	1.5	$2 \cdot 10^5$
Cl	0.058	0.30	0.29	$1.5 \cdot 10^7$
Br	0.0016	0.27	0.018	$5 \cdot 10^8$
I	<0.005	0.38	0.002	$< 3 \cdot 10^9$

Esta tabla muestra que la sustitución de un hidrógeno por un átomo de yodo incrementa la  $K_{CES}$  por un factor de  $10^4$  y el  $\phi_p$  por un factor de casi 10. Una característica del efecto de átomo pesado interno es que acorta la vida media de fosforescencia debido al acoplamiento E-O de primer orden.

La coordinación de ligandos conjugados con iones metálicos puede afectar el fenómeno de fosforescencia de distintas maneras. Los metales fuera de las series de transición cambian la longitud de onda de fosforescencia de compuestos luminescentes con los que se coordinan. Esto se debe a la polarización eléctrica originada por el ion metálico en las posiciones donde el ligando está coordinado. La fosforescencia del ligando puede ser intensificada o atenuada por medio de coordinación dependiendo de la influencia que el ion metálico tenga en el proceso

10. V.L. Ermaloev, I.P. Kotylar, K.K. Switashev. *Izvest. Akad. Nauk. SSSR*. 24 (1960) 492.

no radiante que compite con la fosforescencia. En el caso de los metales fuera de las series de transición más pesados, como Hg(III) y Bi(III), la atenuación estática resulta como consecuencia del efecto del átomo pesado el cual aumenta la velocidad de cruzamiento entre sistemas entre el estado triplete o singlete hacia el estado electrónico fundamental.

La fosforescencia de ligandos luminiscentes se mejora algunas veces y otras es atenuada por la complejación entre el ligando y los iones metálicos del grupo principal. Se cree que esto ocurre debido al carácter paramagnético de los iones metálicos, en los cuales el par de electrones desapareados del metal interactúan íntimamente con los electrones  $\pi$  del ligando, lo cual genera un medio para cruzamiento entre sistemas directamente desde el estado singlete del ligando hacia estados de mayor multiplicidad. A temperaturas muy bajas, complejos de algunos metales de transición, generalmente de Cr(III), fosforecen debido a que la velocidad de ocupación del estado triplete por cruzamiento entre sistemas paramagnéticos, compensa por la velocidad incrementada de desactivación no radiativa por el mismo mecanismo.

En ciertos complejos de metales de transición, sobre todo aquellos de lantánidos y actínidos, los electrones desapareados están en su mayor parte aislados del ligando. La excitación del ligando resulta en transferencia de energía de excitación del ion metálico donde ésta se absorbe al excitar un electrón  $f$  desapareado hacia un orbital  $f$  más elevado. Las fosforescencias se ubican en la zona roja para Eu(III) y en la verde para complejos Tb(III). Estas fosforescencias se encuentran entre las más cortas, teniendo vidas medias entre microsegundos a milisegundos y se pueden observar claramente en solución.

La presencia de átomos pesados en el entorno químico también perturba los fenómenos radiantes y no radiantes del estado triplete. Éste es conocido como efecto de átomo pesado externo y es un mecanismo de considerable importancia en fosforescencia a temperatura ambiente en disolución que será tratado posteriormente al estudiar esta metodología.

El óxido nitroso y oxígeno molecular son especies paramagnéticas capaces de formar complejos de colisión con una gran cantidad de moléculas orgánicas. Estas especies paramagnéticas pueden, por un proceso intermedio entre el efecto de átomo pesado interno y externo, incrementar el CES y atenuar la emisión desde el estado triplete por incremento de las emisiones no radiantes.

Al igual que el efecto de átomo pesado externo, el efecto del oxígeno es de gran importancia en metodologías fosforescentes en disolución, por lo cual será tratado posteriormente con más detenimiento.

### 2.3.6. Fotoluminiscencia de agregados moleculares

En soluciones concentradas existe una tendencia, por parte de las moléculas del soluto, a formar agregados y microcristales tanto en el estado fundamental como en los estados electrónicos excitados. La formación de agregados puede afectar sustancialmente la fosforescencia y/o fluorescencia de moléculas pequeñas.

Cuando dos o más moléculas conjugadas se aproximan, sus sistemas de electrones  $\pi$  se superponen alterando las energías del estado fundamental, de los estados excitados más bajos y por lo tanto su espectro. Es más, dependiendo de la orientación relativa de las moléculas en el agregado, los momentos dipolares de los monómeros pueden participar constructiva o destructivamente en la aparición de fosforescencia. Si dos o más moléculas se agregan en el mismo plano espacial, el momento dipolar de su estado singlete excitado más bajo se refuerza el uno al otro de manera tal que si se produjera emisión fluorescente, ésta ocurrirá a longitudes de onda más largas que en la molécula aislada.

Si la agregación implica dos moléculas con sus sistemas aromáticos inmediatamente el uno sobre el otro, los momentos dipolares de transición tienden a cancelarse lo cual prohíbe la excitación del estado singlete más bajo. En este caso, y debido a la significativa duración de la vida media del estado singlete más bajo (como sucede con estados singlete  $n\pi^*$  más bajos), el cruzamiento entre sistemas al estado triplete será más probable y la fosforescencia estará favorecida sobre fluorescencia en medios rígidos. Este fenómeno ocurre en cristales así como en agregados pequeños. El término que se usa en mecánica cuántica para describir este fenómeno es el de teoría de excitación.

La teoría de excitación juega quizá un papel más importante en la espectroscopía de fosforescencia de lo que es aceptado actualmente. En particular, el fenómeno de fosforescencia a temperatura ambiente no se comprende adecuadamente. Generalmente se reconoce que se requieren concentraciones más altas de la molécula fosforescente para observar fosforescencia a temperatura ambiente que a temperaturas más bajas. Este puede ser debido a bajos rendimiento cuántico de fosforescencia molecular. La probabilidad de que concentraciones altas



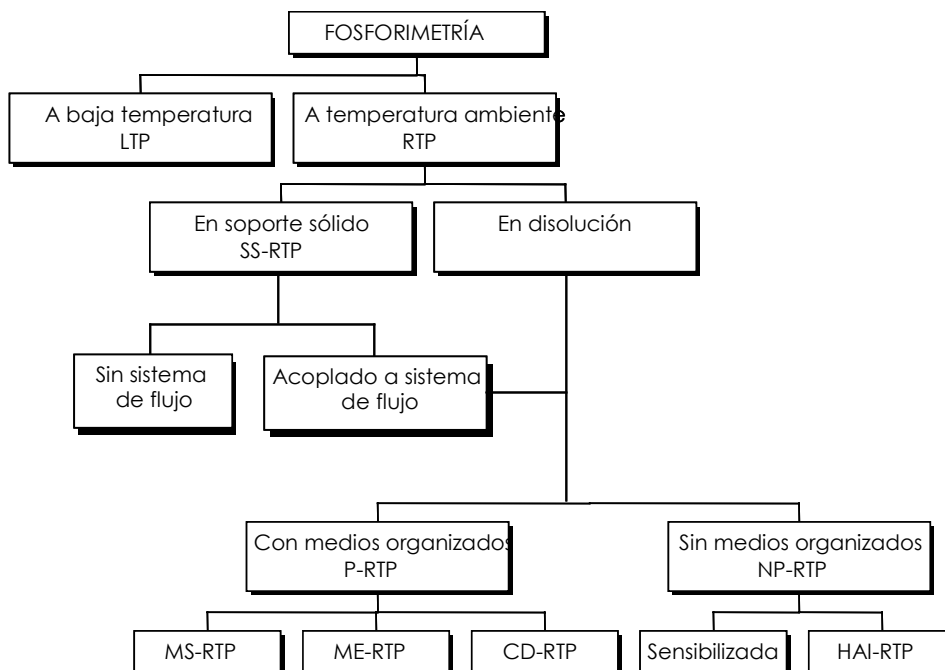
en el soluto generen formaciones de microcristales que permiten fosforescencia a temperatura ambiente no debe ser descartada en su totalidad.

Un agregado, formado por dos o más moléculas idénticas que interaccionan débilmente en el estado fundamental electrónico de tal manera que el espectro de absorción no se ve afectado, se llama un excímero. Un agregado compuesto de moléculas distintas se llama heteroexcímero o exciplex.

### 3. METODOLOGÍAS FOSFORESCENTES A TEMPERATURA AMBIENTE

En las escalas de tiempo relativas a muchos procesos físico-químicos que ocurren en la naturaleza, la fosforescencia tiene una vida media bastante larga lo cual permite que otros procesos compitan con ella para la desactivación del estado triplete excitado más bajo. Con excepción de las fosforescencias más cortas ( $\sim 10^{-6}$  s), procesos como la desactivación colisional por moléculas del disolvente, atenuación por especies paramagnéticas (p. ej. oxígeno), reacciones fotoquímicas y algunos otros procesos impiden la observación de la fosforescencia en soluciones líquidas a menos que las moléculas fosforescentes estén protegidas del entorno químico por medios organizados u otros componentes complejos. De hecho, los fenómenos de fosforescencia se empezaron a estudiar en cubetas de vidrio a la temperatura del nitrógeno líquido y más recientemente a temperatura ambiente empleando soportes sólidos sobre los que se adsorbe la especie fosforescente o en disolución mediante el uso de medios organizados.

El esquema actual de clasificación de las diferentes metodologías fosforimétricas es el que se muestran a continuación en la Figura 4.



**Figura 4. Metodologías fosforescentes**

### 3.1. Fosforescencia a baja temperatura

Las primeras señales de fosforescencia se obtuvieron de disoluciones enfriadas con líquidos o aire (Dewar, 1894). Es la denominada Fosforescencia a baja temperatura, LTP ("Low Temperature Phosphorescence"). Esta metodología presenta grandes inconvenientes relacionados con la introducción del tubo de muestra dentro del vaso Dewar de cuarzo que contenía un líquido a baja temperatura. La muestra que se coloca en tubos de cuarzo pequeños (1 y 3 mm de diámetro interno y externo, respectivamente) se introducía a su vez en un frasco Dewar, el cual se sitúa en el compartimento de muestras y se enfría a la temperatura de nitrógeno líquido (77 °K a 1 atm).

Entre los posibles refrigerantes, tales como: nitrógeno líquido, aire, gases nobles y sólidos, sólo el nitrógeno líquido es lo bastante puro para ser transparente y no luminiscente en toda la región comprendida entre 200 y 800 nm. La muestra se disolvía en un disolvente que formara un vidrio por enfriamiento, como puede ser el isopentano, aunque el disolvente más utilizado ha sido el EPA (una mezcla de éter

etílico, isopentano y etanol 5:5:2) que se congela dando un vidrio rígido claro, aunque, incluso con este disolvente no se puede evitar la formación de algo de "nieve". Para minimizar este problema, se utiliza una cubeta rotatoria ya que la rotación reduce también considerablemente uno de los factores que más contribuye a la poca precisión de la fosforimetría, como es el error de colocación de la muestra. El uso de esta cubeta rotatoria aumenta la precisión de las medidas de fosforescencia en un factor de 10 o incluso superior. Antes del enfriamiento de la muestra se debe burbujear nitrógeno para eliminar el oxígeno presente.

A pesar de todos estos intentos, el primer trabajo sobre fosforescencia cuantitativa no apareció hasta 1957 y la mayoría de las aplicaciones cuantitativas aparecieron en la literatura a partir de 1962 [11-13]. Fue el grupo de trabajo del Prof. Winefordner el que estableció las bases de la fosforescencia a baja temperatura, desarrollando multitud de aplicaciones a muestras complejas entre los años 1965 y 1974.

Luego, en la década de los 60, la mayor parte de las aplicaciones fosforimétricas usaban disolventes rígidos a baja temperatura (77 °K), siendo la necesidad de utilizar estas condiciones criogénicas una de las principales limitaciones de la fosforimetría convencional.

Fue concretamente en 1975 cuando Aarón y Winefordner [14] revisaron la fosforimetría a baja temperatura en términos de teoría, instrumentación y aplicaciones, siendo Ward y col. [15] en 1981 los que en una revisión posterior sobre fosforimetría indicaron que desde 1975 son muy pocos los trabajos publicados en este campo utilizando esta metodología, ya que como se ha mencionado, la fosforimetría a baja temperatura, presenta graves inconvenientes de introducción de muestra, largos tiempos de análisis y la imposibilidad de utilizarla en sistemas de flujo y todos ellos relacionados con la necesidad de trabajar en condiciones criogénicas.

---

11. S. Freed, M.H. Vise. *Anal. Biochem.*, 5 (1962) 338.

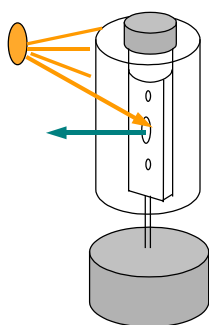
12. S.P. McGlynn, B.T. Neely, W.C. Neely. *Anal. Chim. Acta*, 28 (1963) 472.

13. J.D. Winefordner, H.W. Latz. *Anal. Chem.*, 35 (1963) 1517.

### 3.2. Fosforescencia a temperatura ambiente sobre soporte sólido

Roth en 1967, introdujo la fosforescencia a temperatura ambiente sobre soporte sólido, SS-RTP ("Solid Surface Room Temperature Phosphorescence"), basada en adsorber los compuestos sobre materiales sólidos como el papel de filtro, gel de sílice, acetato sódico, polímeros y diversos compuestos inorgánicos<sup>16,17</sup>. Por definición del rendimiento cuántico de fosforescencia se deduce que el valor de las distintas constantes de velocidad de los procesos de desactivación ( $K_Q$ ) son inversamente proporcionales a la viscosidad, por lo tanto, la obtención de señales fosforescentes se ve favorecida por aumento de la viscosidad manteniendo la temperatura a un valor ambiental (20 ó 25 °C).

La SS-RTP se ha convertido en una metodología práctica de detección de numerosos compuestos orgánicos y consiste en hacer incidir la fuente de radiación sobre la matriz sólida y registrar la fosforescencia de las moléculas adsorbidas. La radiación de la fuente sobre la matriz y la radiación luminiscente emitida es reflejada de la superficie del material sólido y también puede transmitirse a través de éste [18]. La fosforescencia de muestras sólidas se puede medir usando un simple accesorio que permite colocar dicha muestra de tal forma que su superficie esté a 45° con respecto al rayo incidente y localizado adecuadamente en el instrumento. Debido a la concentración tan alta de muestra pura en el sólido, la luz no penetra muy lejos en su interior, de manera que la fosforescencia que se observa sólo es de la capa superficial. Además, estas emisiones se ven acompañadas de altos niveles de radiación dispersa y de la propia excitación (Figura 5).



**Figura 5. Obtención de señales fosforescente en superficie sólida**

- 
14. J.J. Aarón, J.D. Winefordner. *Talanta*, 22 (1975) 707.
  15. J.L. Ward, G.L. Walden, J.D. Winefordner. *Talanta*, 28 (1981) 201.
  16. R.J. Hurtubise. "Solid surface luminescence analysis: Theory instrumentation and applications", M. Dekker, New York, (1981).
  17. T. Vo-Dinh. "Room-temperature phosphorimetry for chemical analysis", Wiley, New York, (1984).
  18. W.W. Wendlandt, H.G. Hecht. "Reflectance spectroscopy", Wiley, New York, (1966).

Hasta los trabajos de Schulman y Walling [19,20] no se reconoció el potencial de la fosforescencia a temperatura ambiente sobre soporte sólido. Desde entonces han aparecido numerosos estudios y el fenómeno de la RTP en soporte sólido ha sido estudiado con detenimiento [11,12,21].

El papel de filtro es la superficie sólida más usada para obtener RTP a partir de compuestos adsorbidos en él [22]. En 1989 García Sánchez y col. aplican por primera vez la modalidad de sincrónica derivada para aplicarla a la determinación de warfarina en suero [23]. Pal y col. [24,25] introducen el uso de surfactantes para mejorar las características de los métodos propuestos en esta modalidad. Junior y Campiglia [26] describen la posibilidad de detección de serotonina, triptamina y gramina adsorbidas en superficie sólida en presencia de dodecil sulfato sódico. Este papel de filtro ha sido tratado con otros medios para mejorar las características de la emisión fosforescente. Así, el empleo de ciclodextrinas (CDs) en la fosforescencia del antraceno [27], compuestos poliaromáticos y heterocíclicos en presencia de talio o plomo, como átomos pesados [28,29], el 1-naftol y 2-naftol con  $\alpha$ - y  $\beta$ -ciclodextrinas en presencia de NaCl o NaBr [30].

A la vista de estas publicaciones se deduce que la obtención de fosforescencia a temperatura ambiente en soporte sólido con papel de filtro puede ser incrementada por el tratamiento de la superficie con mezclas de medios organizados y átomos pesados como es el caso de mezclas al 80% de  $\alpha$ -CD/NaCl [31-36], mezclas al 1%  $\alpha$ -CD/NaCl [37] o mezclas al 30%  $\beta$ -CD/NaCl [38]. Capitán-Vallvey y col. [39] en 1998 presentan una mejora para la determinación de ácido nalidixico mediante fosforimetría a temperatura

- 
19. E.M. Schulman, C.J. Walling. *Science*, 178 (1972) 53.
  20. E.M. Schulman, C.J. Walling. *J. Phys. Chem.*, 77 (1973) 902.
  21. G. Ramis Ramos, I.M. Khasawneh, M.C. García-Álvarez-Coque, J.D. Winefordner. *Talanta*, 35 (1988) 41.
  22. L.F. Capitán Vallvey, M.K.A. Deheidell, R. Avidad. *Fresenius J. Anal. Chem.*, 362 (1998) 307.
  23. F. García Sánchez, C. Cruces Blanco. *Anal. Chim. Acta*, 222 (1989) 177.
  24. W. Watts, J. Caraway, T. Vo-Dinh. *Analysis*, 20 (1992) 149.
  25. T. Ai-Jun, W. Yingguang, L. Longdi. *Anal. Chim. Acta*, 271 (1996) 171.
  26. J.R.F. Junior, A.D. Campiglia. *Talanta*, 42 (1995) 1505.
  27. T. Vo-Dinh, A.M. Alak. *Appl. Spectrosc.*, 41 (1987) 963.
  28. A.M. Alak, T. Vo-Dinh. *Anal. Chem.*, 60 (1988) 596.
  29. A.M. Alak, N. Contoloni, T. Vo-Dinh. *Anal. Chim. Acta*, 217 (1989) 17.
  30. S.M. Ramasay, R.J. Hurtubise. *Mikrochem.*, 40 (1989) 317.
  31. J.M. Bello, R.J. Hurtubise. *Appl. Spectrosc.*, 40 (1986) 790.
  32. J.M. Bello, R.J. Hurtubise. *Anal. Lett.*, 19 (1986) 775.
  33. J.M. Bello, R.J. Hurtubise. *Anal. Chem.*, 59 (1987) 2395.
  34. J.M. Bello, R.J. Hurtubise. *Anal. Chem.*, 60 (1988) 1285.
  35. J.M. Bello, R.J. Hurtubise. *Anal. Chem.*, 60 (1988) 129.
  36. J.M. Bello, R.J. Hurtubise. *Appl. Spectrosc.*, 42 (1988) 619.
  37. M.D. Richmond, R.J. Hurtubise. *Appl. Spectrosc.*, 43 (1989) 810.
  38. M.D. Richmond, R.J. Hurtubise. *Anal. Chem.*, 61 (1989) 2643.

ambiente transmitida. En el desarrollo de esta técnica proponen la determinación de varios pesticidas como son el morestan, warfarina, tiabendazol y carbaril [40-43].

A pesar de las buenas características de sensibilidad que se obtienen con los procedimientos de fosforescencia a temperatura ambiente sobre soporte sólido existe la limitación de no poder usarse fácilmente como metodologías de detección en sistemas dinámicos tales como cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) o análisis por inyección en flujo (FIA). Con objeto de mejorar estas limitaciones, en los últimos años, el grupo de investigación del Prof. Sanz-Medel ha llevado a cabo diversas adaptaciones de esta metodología a sistemas FIA mediante la utilización de diversos tipos de resinas regenerables para el análisis de diversos elementos metálicos mediante formación de quelatos [44,45] y otros compuestos orgánicos de interés [46,47] o mediante la utilización de sol-geles [48,49].

A partir de esto, el mismo grupo de investigación desarrolla la técnica para la fabricación de optosensores para la determinación de ultratrazas de metales aplicándolo sobre todo a la detección de los mismos en aguas de mar [50-52]. También recientemente han llevado a cabo una determinación de cianuros en aguas de consumo humano [53] y de organofosfatos [54].

Una introducción más detallada sobre este tipo de optosensores se desarrollara al comienzo de la Parte B de esta Memoria.

- 
39. L.F. Capitán Vallvey, F. Ojeda, M. Del Olmo, R. Avidad, A. Navalón, T. Vo-Dinh. *Appl. Spectrosc.*, 52 (1998) 101.
  40. L.F. Capitán Vallvey, M.K.A. Deheidel, R. Avidad. *Arch. Env. Contaminat. and Toxicol.*, 37 (1999) 1.
  41. L.F. Capitán Vallvey, M.K.A. Deheidel, R. Avidad. *Anal. Let.*, 31 (1998) 2767.
  42. L.F. Capitán Vallvey, M.K.A. Deheidel, I. De Orbe, R. Avidad. *Analyst*, 124 (1999) 49.
  43. L.F. Capitán Vallvey, M.K.A. Deheidel, R. Avidad. *Mikrochim. Acta*, 130 (1999) 273.
  44. A. Sanz-Medel. *Anal. Chim. Acta*, 283 (1993) 367.
  45. Y.M. Liu, R. Pereiro García, M.J. Valencia Gómez, M.E. Díaz García, A. Sanz-Medel, *Anal. Chem.*, 66 (1994) 836.
  46. M.J. Valencia González, Y.M. Liu, M.E. Díaz García, A. Sanz-Medel. *Anal. Chim. Acta*, 283 (1993) 439.
  47. F. Álava-Moreno, L. Yi Ming, M.E. Díaz García A. Sanz-Medel. *Mikrochim. Acta*, 112 (1993) 47.
  48. J.M. Costa Fernández, M.E. Díaz García, A. Sanz-Medel, *Sensors Actuators B.*, 38 (1997) 103.
  49. J.M. Costa Fernández, M.E. Díaz García, A. Sanz-Medel. *Anal. Chim. Acta*, 360 (1998) 17.
  50. R. Pereiro García, Y.M. Liu, M.E. Díaz García, A. Sanz Medel. *Anal. Chem.*, 63 (1991) 1759.
  51. B.S. De la Riva, J.M. Costa Fernández, R. Pereiro García, A. Sanz Medel. *Anal. Chim. Acta*, 395 (1999) 1.
  52. J. Díaz García, J.M. Costa Fernández, N. Bordel, R. Pereiro, A. Sanz-Medel. *Anal. Chim. Acta*, 486 (2003) 1.
  53. M.T. Fernández Argüelles, J.M. Costa Fernández, R. Pereiro, A. Sanz-Medel. *Anal. Chim. Acta*, 491 (2003) 27.

### 3.3. Fosforescencia a temperatura ambiente en disolución

Hasta hace poco tiempo, la fosforescencia a temperatura ambiente en disolución sólo se podía observar bajo condiciones muy especiales tales como disoluciones ultrapuras [55] o para un número de moléculas muy pequeño, entre las cuales se pueden destacar bifenilos puente [56].

Por otro lado, la necesidad de desarrollar la fosforimetría en disolución para su posible adaptación como metodología de detección en sistemas dinámicos (CLAR y FIA), de gran importancia en la Química Analítica actual, ha propiciado la investigación de diversas metodologías que han hecho posible el desarrollo de la fosforescencia en disolución y a temperatura ambiente.

En conclusión, el valor de las distintas constantes de velocidad de los procesos de desactivación o "quenching" ( $K_Q$ ) es directamente proporcional a la temperatura e inversamente proporcional a la viscosidad.

Por lo tanto, para la obtención de señales fosforescentes a temperatura ambiente en disolución se puede provocar un aumento de la viscosidad, manteniendo la temperatura a un valor próximo a la temperatura ambiente (20 ó 25 °C), mediante la utilización de medios organizados (que aumentan la viscosidad en el microentorno que rodea al analito basándose en interacciones a nivel molecular). Del uso de distintos medios organizados surgen tres metodologías de trabajo posibles: Fosforescencia a temperatura ambiente en medios micelares (MS-RTP) ("Micellar-Stabilized Room Temperature Phosphorescence"), Fosforescencia a temperatura ambiente en microemulsiones (ME-RTP) ("Microemulsion Room Temperature Phosphorescence") y Fosforescencia a temperatura ambiente en ciclodextrinas (CD-RTP) ("Cyclodextrin Room Temperature Phosphorescence").

Además de este aspecto aparecen otros dos sumamente importantes a la hora de obtener señales en disolución, que aunque en las otras metodologías anteriormente descritas son destacables, es ahora, en las metodologías desarrolladas en disolución cuando adquieren una trascendencia fundamental como son el efecto del átomo pesado y el efecto del oxígeno:

- 
54. J.M. Traviesa Álvarez, J.M. Costa Fernández, R. Pereiro, A. Sanz-Medel. *Talanta*, 62 (2004) 827.
  55. C.A. Parker, C.G. Hatchard. *J. Phys. Chem.*, 30 (1962) 276.
  56. R.B. Bonner, M.K. DeArmond, G.H. Wahl. *J. Am. Chem. Soc.*, 94 (1972) 988.

*Efecto de átomo pesado.* El acoplamiento espín-orbital se ve favorecido por la presencia de campos magnéticos nucleares. La presencia de especies como átomos pesados con gran carga nuclear generan un elevado campo magnético que en las cercanías de una molécula incrementa, de forma directa, el cruce entre sistemas y de forma indirecta, la emisión fosforescente. Este fenómeno fue observado por primera vez en compuestos orgánicos que tenían como sustituyentes distintos átomos pesados [57] y se denominó efecto de átomo pesado interno. Este efecto beneficia las transiciones singlete-triplete radiantes pero también afecta a las no radiantes, por lo que no siempre se observa fosforescencia en moléculas que contienen este tipo de átomos. Sin embargo, fue Kasha [58] en 1952 el primero en demostrar la perturbación de la emisión luminiscente por la presencia de un átomo pesado externo estudiando el efecto de la presencia de yoduro de etilo en la fosforescencia del 1-cloronaftaleno. Este fenómeno se denomina efecto de átomo pesado externo y se diferencia del anterior en que los átomos pesados no están unidos químicamente al compuesto de interés. Se han propuesto varios mecanismos para explicar este efecto en compuestos aromáticos:

- ✓ Un mecanismo de intercambio, en el cual, el estado triplete perturbado toma "prestada" intensidad radiante de una transición de espín prohibido, que se localiza normalmente en el átomo pesado perturbador. La extensión de la mezcla de los estados tripletes del átomo perturbador depende del grado de interacción de intercambio entre el par de electrones del estado triplete de la molécula aromática y los electrones asociados con un estado triplete excitado del átomo pesado perturbador [59].
- ✓ Un mecanismo de transferencia de carga, que conlleva la interacción de los estados tripletes excitados con los estados singletes excitados de transferencia de carga del complejo compuesto aromático-átomo pesado perturbador [60,61].

*Efecto del oxígeno.* El rendimiento cuántico de fosforescencia es inversamente proporcional a la concentración de los atenuadores que afectan a la desactivación luminiscente. El oxígeno es uno de los atenuadores del estado triplete más eficaz [4], tanto que este fenómeno ha sido propuesto como método para monitorizar la difusión

---

57. D. McClure. *J. Chem. Phys.*, 17 (1949) 905.

58. M. Kasha. *J. Chem. Phys.*, 20 (1952) 71.

59. G.W. Robinson. *J. Chem. Phys.*, 46 (1967) 572.

60. J.N. Murrel, *Mol. Phys.*, 3 (1960) 319.

61. H. Tsubonura, R. Mulliken. *J. Am. Chem. Soc.*, 82 (1960) 5966.



del oxígeno y del aire en varios materiales [62-64,48]. Hay varios modelos teóricos para explicar el efecto del oxígeno en la fosforescencia. Así, tenemos el de McGlynn y col. en 1969, Murrell, en 1960 [60] y el de Kawaoka y col. en 1967 [65].

La atenuación o fenómeno de "quenching" por parte del oxígeno se observa tanto en la emisión fluorescente como fosforescente aunque la disminución de la intensidad de emisión es más drástica en la fosforescencia debido a que el tiempo de vida del estado triplete es mayor que el del estado singlete. El mecanismo de atenuación colisional se puede describir por la llamada ecuación de Stern-Volmer (ecuación 10). Luego, de esta ecuación se deduce que el oxígeno es un "quencher" o atenuador muy eficaz y puede originar serios problemas a la emisión fosforescente [66].

Aunque el papel real del oxígeno aún es un tema de investigación, desde un punto de vista analítico, su efecto de atenuación no es crítico en la emisión de fosforescencia de compuestos adsorbidos en sustratos sólidos, dado que pueden observarse intensas señales de fosforescencia en presencia del aire ambiental, siempre que esté seco. Las muestras líquidas, sin embargo, requieren una exhaustiva desoxigenación de las disoluciones para mostrar señales de fosforescencia significativas.

Existen distintos métodos para la desoxigenación de las muestras pero el empleado durante más tiempo ha sido la purga con nitrógeno, aunque este procedimiento causa graves problemas de formación de espumas cuando se utilizan medios micelares y por ello es lento y tedioso. Hunter y Szczepanski en 1984 [67], describieron un método para preparar disoluciones en atmósfera libre de oxígeno que consiste en utilizar un recipiente hermético provisto de guantes para el trabajo desde el exterior y sometido a un flujo de nitrógeno. Éste y otros métodos de desoxigenación descritos, como el de congelación-descongelación de las muestras, son todos incómodos y poco prácticos.

Posteriormente, Díaz García y Sanz-Medel [68] propusieron un método de desoxigenación química muy efectivo que consiste en emplear sulfito sódico como desoxigenante. Dicha desoxigenación está basada en la siguiente reacción:

- 
- 62. S. Czarniecki, M. Kryszewski. *J. Polymer. Sci.*, 1A (1963) 3067.
  - 63. L. Yi-Ming, R. Pereiro García, M.J. Valencia González, M.E. Díaz García, A. Sanz-Medel, *Anal. Chem.*, 66 (1994) 836.
  - 64. R. Badía, M.E. Díaz García, A. Sanz-Medel. *Mikrochim. Acta*, 121 (1995) 51.
  - 65. K. Kawaoka, A.U. Khan, P.R. Kearns. *J. Chem. Phys.*, 46 (1967) 1842.
  - 66. W.L. Hinze, H.N. Singh, Y. Baba, N.G. Hearvy. *Trends in Anal. Chem.*, 3 (1984) 193.
  - 67. T.F. Hunter, A.J. Szczepanski. *J. Phys. Chem.*, 88 (1984) 1231.
  - 68. M.E. Díaz García, A. Sanz-Medel. *Anal. Chem.*, 56 (1986) 1436.



Esta reacción es rápida a pH neutro o alcalino, permitiendo la observación de fosforescencia de distintos compuestos a temperatura ambiente y sin necesidad de precauciones especiales.

Recientemente, Zhang y col. [69] han propuesto la utilización de otros dos procedimientos de desoxigenación para sistemas fosforimétricos usando ciclodextrinas, basados en la generación de una corriente de hidrógeno y dióxido de carbono in situ que desplazan físicamente al oxígeno de la disolución.

### 3.3.1. Fosforescencia sensibilizada.

Donkerbroek y col. [70,71] demostraron el potencial analítico de un modo de fosforescencia a temperatura ambiente que denominaron fosforescencia sensibilizada. En ella, el analito se detecta indirectamente por la fosforescencia emitida por un aceptor que debe tener un rendimiento cuántico alto en disoluciones y un estado triplete de baja energía. Después de la excitación, el analito actúa como donador de energía cediendo la energía a un aceptor. Este hecho tiene lugar debido a que el estado triplete del aceptor es de menos energía que el del donador produciéndose una transferencia de energía triplete-triplete desde el donador (analito de interés) al aceptor, generalmente biacetilo o 1,4-dibromonaftaleno (Figura 6).

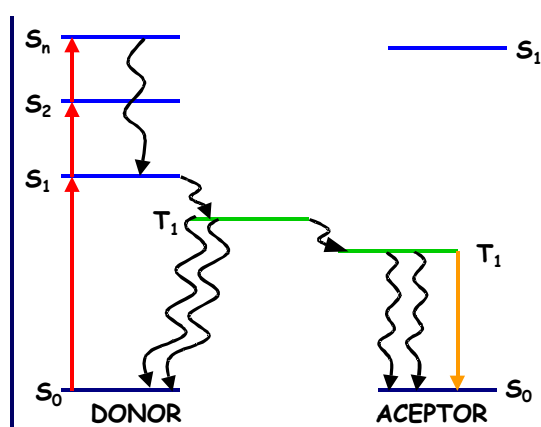


Figura 6. Esquema energético de la fosforescencia sensibilizada

69. H.R. Zhang, J. Zhang, Y.S. Wei, W.J. Jin, C.S. Liu. *Anal. Chim. Acta*, 357 (1997) 119.  
 70. J.J. Donkerbroek, C. Gooijer, N.H. Velthorst, R.W. Frei. *Anal. Chem.*, 54 (1982) 891.

En estas condiciones, la energía transferida en este proceso compite con otras muchas desactivaciones. Para incrementar la reacción de transferencia de energía en el modo de fosforescencia sensibilizada de biacetilo se ha propuesto el empleo de distintos medios micelares como dodecil sulfato sódico (SDS) o ciclodextrinas (CDs) para incrementar la fosforescencia de especies como los hidrocarburos aromáticos polinucleares o compuestos heterocíclicos nitrogenados [70,72-75]

### 3.3.2. Fosforescencia a temperatura ambiente en medios micelares y microemulsiones

La fosforescencia a temperatura ambiente en medios micelares se basa en la utilización de agentes surfactantes. En general, el microentorno micelar suele ofrecer una protección especial de los estados excitados (singlete y triplete) de una molécula frente a procesos de "quenching" o desactivación no radiante. El resultado de esta propiedad o característica de tipo general es que se han observado grandes aumentos en los rendimientos cuánticos fosforescentes en el seno de un medio micelar (Figura 7).

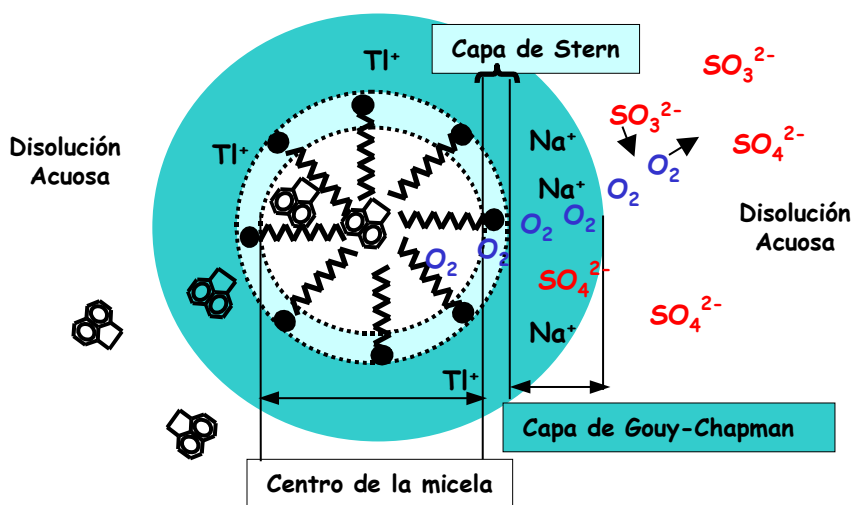


Figura 7. Esquema químico simplificado de la metodología basada en la utilización de medios micelares

71. J.J. Donkerbroek, N.J.R. Van Eikema Hommes, C. Gooijer, N.H. Velthorst, R.W. Frei. *J. Chromatogr. B*, 255 (1983) 581.
72. F.J. De Luccia, L.J. Cline Love. *Anal. Chem.*, 56 (1984) 2811.
73. F.J. De Luccia, L.J. Cline Love. *Talanta*, 32 (1985) 665.
74. L.A. Blyshak, I.M. Warner. *Anal. Chem.*, 62 (1990) 1953.
75. G. Melnikov, S. Shtykov, I. Goryacheva. *Anal. Chim. Acta*, 439 (2001) 81.

El primer trabajo que describe la obtención de RTP en medio micelar data de 1977, y se debe a Kalyanasundaram y col. [76], que obtienen señales de fosforescencia a temperatura ambiente del 1-bromonaftaleno y 1-bromopireno en disoluciones desoxigenadas de dodecil sulfato sódico. Turro y Aikawa en 1980 [77] examinaron igualmente los procesos fotofísicos de 1-cloronaftaleno en medio micelar.

Fueron Cline Love y co.l [78-81], los primeros en obtener fosforescencia a temperatura ambiente en medio micelar (MS-RTP) de compuestos que no poseían en su estructura átomos pesados, obteniendo MS-RTP de varios hidrocarburos aromáticos polinucleares, de carbazol y derivados y de drogas tales como propranolol y naproxén. Las señales de fosforescencia se producían en presencia de átomos pesados como talio o plata.

Díaz García y Sanz-Medel [68], propusieron la sustitución del paso de nitrógeno como sistema de desoxigenación, por el uso de sulfito sódico como desoxigenante químico. Empleando este procedimiento, obtuvieron señales fosforescentes a temperatura ambiente de varios hidrocarburos aromáticos policíclicos, en dodecil sulfato sódico y en presencia de talio. La técnica se aplicó a la determinación de niobio [82] en presencia de bromoformo como átomo pesado, y de aluminio [83,84] por formación de sus respectivos complejos con ferrón en bromuro de cetiltrimetilamonio [85].

La denominada fosforescencia a temperatura ambiente en disolución en presencia de medios micelares ("Micelle stabilized room temperature phosphorescence") (MS-RTP) se ha desarrollado en los últimos años como una técnica analítica muy prometedora [86-95]. Segura Carretero y col. han utilizado la fosforescencia a

- 
76. K. Kalyanasundaram, F. Grieser, J.K. Thomas. *Chem. Phys. Lett.*, 51 (1977) 501.
  77. N.J. Turro, M.J. Aikawa. *J. Am. Chem. Soc.*, 102 (1980) 4866.
  78. L.J. Cline Love, J.G. Habarta, M. Skrilec. *Anal. Chem.*, 53 (1981) 437.
  79. M. Skrilec, L.J. Cline Love. *J. Phys. Chem.*, 85 (1981) 2047.
  80. R. Weinberger, P. Yarmchuk, L.J. Cline Love. *Anal. Chem.*, 54 (1982) 1552.
  81. R.A. Femia, L.J. Cline Love. *Anal. Chem.*, 56 (1984) 327.
  82. A. Sanz-Medel, P.L. Martínez García, M.E. Díaz García, *Anal. Chem.*, 59 (1987) 774.
  83. M.R. Fernández de la Campa, M.E. Díaz García, A. Sanz-Medel. *Anal. Chim. Acta*, 212 (1988) 235.
  84. M.E. Díaz García, M.R. Fernández de la Campa, W.L. Hinze, A. Sanz-Medel, *Mikrochim. Acta*, 3 (1988) 269.
  85. Y. Liu, M.R. Fernández de la Campa, M.E. Díaz García, A. Sanz-Medel. *Anal. Chim. Acta*, 234 (1990) 233.
  86. J.N. Miller. *Trends in Anal. Chem.*, 1 (1981) 31.
  87. R.J. Hurtubise. *Anal. Chem.*, 55 (1983) 669.
  88. L.J. Cline Love, J.G. Habarta, J.G. Dorsey. *Anal. Chem.*, 56 (1984) 1132.
  89. J. Weijun, L. Chansong. *Anal. Chem.*, 65 (1993) 863.
  90. J. Weijun, L. Chansong. *Anal. Chem.*, 65 (1993) 863.
  91. S.C.M. Gioia, A.D. Campiglia. *Anal. Chim. Acta*, 287 (1994) 89.

temperatura ambiente en medio micelar para la determinación de distintos pesticidas tales como ácido 1-naftalenacético y tiabendazol [96,97].

Esta técnica también es muy útil en el análisis de mezclas de hidrocarburos, ya sea por diferenciación de tiempos de vida de fosforescencia [78] o por espectroscopía de barrido sincrónico [81,98]. Asimismo, se han publicado un gran número de trabajos sobre el uso de la MS-RTP como nuevo método de detección en cromatografía líquida [80,99-102]. También, Panadero y col. [103] llevaron a cabo en 1994 la determinación del insecticida carbaril mediante la adaptación de la metodología MS-RTP a un sistema FIA.

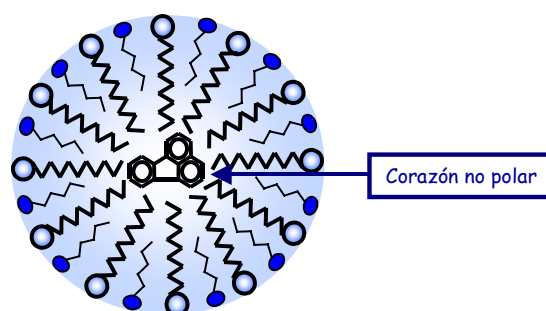
A partir de este último trabajo se desarrolló esta nueva metodología basada como se ha mencionado, en el uso de un sistema FIA denominada de flujo parado. El sistema FIA es utilizado para controlar la mezcla de los reactivos y posteriormente es detenido el flujo en la cubeta de medida para proceder al registro de la señal fosforescente. La cubeta de medida es el reactor lo cual permite el estudio de reacciones químicas en su etapa inicial además del registro de intensidades de fosforescencia justo en el instante de la mezcla en la cubeta. Haciendo uso de esta metodología se encuentran descritos trabajos como la determinación de naproxen en suero [104], alopurinol en orina [105], de nafronil [106] y dipiramidol [107] en preparaciones farmacéuticas. Así como la determinación del pesticida napropamida en muestras reales de vegetales [108].

Otra metodología fosforescente en disolución basada en el uso de medios micelares es la denominada fosforescencia a temperatura ambiente en microemulsiones (ME-RTP), ("Microemulsions room temperature phosphorescence"), en la que se hace uso

- 
92. T. Ai-Jun, W. Yingguang, L. Longdi. *Anal. Chim. Acta*, 271 (1996) 171.
  93. A. Segura Carretero, C. Cruces Blanco, A. Fernández Gutiérrez. *Talanta*, 43 (1996) 1001.
  94. J.A. Murillo Pulgarín, A.A. Molina, P.F. López. *Anal. Chim. Acta*, 382 (1999) 77.
  95. J.A. Murillo Pulgarín, A.A. Molina, P.F. López. *Analyst*, 122 (1997) 253.
  96. A. Segura Carretero, C. Cruces Blanco, F. Alés Barrero, A. Fernández Gutiérrez. *J. Agric. Food Chem.*, 46 (1998) 561.
  97. A. Segura Carretero, C. Cruces Blanco, R. Estrada Fernández, A. Fernández Gutiérrez. *Fresenius J. Anal. Chem.*, 360 (1998) 605.
  98. R.A. Femia, L.J. Cline Love. *Spectrochim. Acta*, 42a (1986) 1239.
  99. D.W. Armstrong, W.L. Hinze, K.H. Bui, H.N. Singh. *Anal. Lett.*, 14 (1981) 1659.
  100. P. Yarmchuk, R. Weinberger, R.F. Hirsch, L.J. Cline Love. *Anal. Chem.*, 54 (1982) 2233.
  101. M. Arunyanart, L.J. Cline Love. *Anal. Chem.*, 56 (1984) 1557.
  102. P. Yarmchuk, R. Weinberger, R.F. Hirsch, L.J. Cline Love. *J. Chromatogr. A*, 283 (1984) 47.
  103. S. Panadero, A. Gómez Hens, D. Pérez Bendito. *Anal. Chem.*, 66 (1994) 919.
  104. S. Panadero, A. Gómez Hens, D. Pérez Bendito. *Anal. Lett.*, 28 (1995) 1405.
  105. T. Pérez Ruiz, C. Martínez Lozano, V. Tomas, J. Martín. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 32 (2003) 225.
  106. A. Muñoz de la Peña, A. Espinosa Mansilla, J.A. Murillo Pulgarín, A.A. Molina, P.F. López. *Analyst*, 123 (1998) 2285.
  107. A. Muñoz de la Peña, A. Espinosa Mansilla, J.A. Murillo Pulgarín, A.A. Molina, P.F. López. *Talanta*, 48 (1999) 1061.

de microemulsiones como medio organizado para aumentar la rigidez del medio pero obteniendo un corazón hidrofóbico con capacidad de disolver moléculas apolares o grandes moléculas y conseguir de esta forma señal fosforescente.

Las microemulsiones son mezclas homogéneas de agua y un disolvente orgánico en presencia de un surfactante (habitualmente SDS) y un co-surfactante (un alcohol de talla mediana con un grupo alquilo de C-4 a C-8). Las características del corazón de la microemulsión, más apolares que en el caso de las micelas, amplían el campo de aplicación de la MS-RTP a analitos no solubles en las mismas (Figura 8).



**Figura 8. Esquema de una microemulsión**

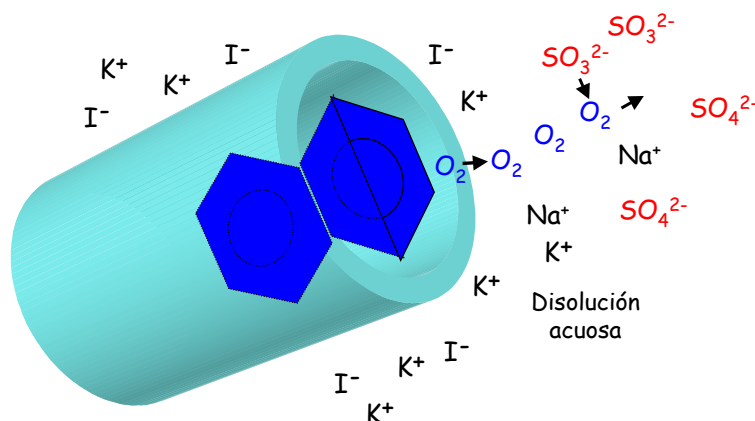
Se contemplan en bibliografía trabajos que describen métodos de determinación de diversos hidrocarburos aromáticos policíclicos [109-113] y pesticidas [114] mediante fosforimetría en disolución con microemulsiones.

### 3.3.3. Fosforescencia a temperatura ambiente con ciclodextrinas

La observación de procesos fosforescentes en presencia de ciclodextrinas se debe a que las moléculas de analito se introducen en la cavidad interna de estos compuestos aislándose del ambiente que las rodea y sus estados excitados están más protegidos de los procesos de "quenching", así como de otros procesos de decaimiento no radiante que ocurren en disolución. La inclusión causa restricción en la movilidad molecular y/o alteraciones en la polaridad del microentorno que rodea la

- 
108. J.A. Murillo Pulgarín, L.F.G. Bermejo. *J. Agric. Food Chem.*, 50 (2002) 1002.  
 109. J. Weijun, D. Yansheng, L. Changsong, Z. Sushe. *Anal. Chem.*, 54 (1994) 1552.  
 110. C. Cruces Blanco, A. Segura Carretero, A. Fernández Gutiérrez. *Anal. Chim. Acta*, 318 (1996) 357.  
 111. A. Segura Carretero, C. Cruces Blanco, A. Fernández Gutiérrez. *Anal. Chim. Acta*, 329 (1996) 165.  
 112. A. Segura Carretero, C. Cruces Blanco, M. Sánchez Polo, J.C. Ávila Rosón, A. Fernández Gutiérrez. *Anal. Chim. Acta*, 474 (2002) 91.  
 113. A. Segura Carretero, C. Cruces Blanco, M. Sánchez Polo, A. Fernández Gutiérrez, A. Fernández Nieves. *Polycycl. Aromat. Compd.*, 23 (2003) 237.

molécula. Las principales ventajas que pueden derivarse de este hecho son el incremento de la eficiencia del fenómeno de emisión y la ganancia asociada de sensibilidad, el uso de un medio acuoso para realizar la determinación y la prevención de reacciones laterales que pueden conducir a interferencias por parte de los componentes de la disolución (Figura 9).



**Figura 9. Esquema de un sistema fosforescente mediante utilización de ciclodextrinas**

Ya en 1977, Tubushi y col. [115], usaron una  $\beta$ -ciclodextrina modificada, con un grupo de benzofenona como sustituyente, y obtuvieron fosforescencia del 1-bromonaftaleno. Posteriormente, Turro y col. [116] demostraron que las ciclodextrinas podían ser utilizadas de una manera similar a los medios micelares, para la observación de fosforescencia en disoluciones acuosas [117-120].

Fueron los componentes del grupo de investigación dirigido por Cline Love [121,122,98], los primeros en obtener fosforescencia a temperatura ambiente de compuestos que no contenían átomos pesados en su estructura al incluirlos en ciclodextrinas. Utilizaron 1,2-dibromoetano como átomo pesado externo. Las señales de fosforescencia de varios hidrocarburos aromáticos polinucleares, heterociclos nitrogenados y diversas drogas, fueron atribuidas a la formación de un compuesto ternario entre la ciclodextrina, el bromoalcano y el compuesto de interés.

- 
114. A. Segura Carretero, C. Cruces Blanco, A. Fernández Gutiérrez. *Anal. Sci.*, 12 (1996) 653.  
 115. Tubushi, K. Fujita, L.C. Yuan. *Tetrahedrom. Lett.*, 29 (1977) 2503.  
 116. N.J. Turro, G.S. Cox, X. Li. *Photochem. Photobiol.*, 27 (1978) 523.  
 117. N.J. Turro, J.D. Bolt, Y. Kuroda, I. Tabushi. *Photochem. Photobiol.*, 35 (1982) 69.  
 118. N.J. Turro, T. Okubo, C.J. Chung. *J. Am. Chem. Soc.*, 104 (1982) 1789.  
 119. N.J. Turro, T. Okubo, G.C. Weed. *Photochem. Photobiol.*, 35 (1982) 325.  
 120. N.J. Turro, K. Liu, M. Chow, P. Lee. *Photochem. Photobiol.*, 37 (1983) 149.  
 121. S. Scypinski, L.J. Cline Love. *Anal. Chem.*, 56 (1984) 331.  
 122. L.J. Cline Love, M.L. Grayeski, J. Noroski, R. Weinberguer. *Anal. Chim. Acta*, 170 (1985) 3.

De una manera similar, se ha observado fosforescencia a temperatura ambiente del acenafteno incluido en  $\gamma$ -ciclodextrina [123] o en  $\beta$ -ciclodextrina, en presencia de bromoalcoholes, como 2-bromoetanol o 2,3-dibromo-1-propanol, previa desoxigenación mediante paso de nitrógeno [124] o utilizando sulfito sódico como agente desoxigenante [125,126]. Se describen además en bibliografía determinaciones de diferentes pesticidas por esta técnica como son el ácido 2-naftoxiacético y el 1-naftilacético [127], y de la naftalenacetamida en presencia de 1,3-dibromopropano como átomo pesado [128] incluidos en  $\beta$ -ciclodextrinas. Además se describe la fosforescencia en  $\alpha$ -ciclodextrina del 6-bromo-2 naftol [129].

Recientemente se esta utilizando esta técnica sin necesidad de desoxigenación del medio para hidrocarburos aromáticos o compuestos heterocíclicos nitrogenados [130-132].

### 3.3.4. Fosforescencia a temperatura ambiente inducida por átomos pesados

Esta metodología ha sido denominada Fosforescencia a Temperatura Ambiente Inducida por Átomos Pesados (Heavy Atom Induced Room Temperature Phosphorescence, HAI-RTP) y será tratada con detalle posteriormente en la presente Memoria.

- 
123. G.M. Escandar, A. Muñoz de la Peña. *Anal. Chim. Acta*, 370 (1998) 199.  
124. S. Hamai. *J. Am. Chem. Soc.*, 111 (1989) 3954.  
125. A. Muñoz de la Peña, I. Durán Merás, F. Salinas. *Anal. Chim. Acta*, 255 (1991) 351.  
126. A. Segura Carretero, C. Cruces Blanco, A. Fernández Gutiérrez, A. Muñoz de la Peña. *Appl. Spectrosc.*, 52 (1998) 420.  
127. A. Muñoz de la Peña, F. Salinas, M.J. Gómez, M. Sánchez Peña, I. Durán Merás. *Talanta*, 40 (1993) 1657.  
128. A. Muñoz de la Peña, M.C. Mahedero, A. Espinosa Mansilla, A.B. Sánchez, M. Reta. *Talanta*, 48 (1999) 15.  
129. A. Muñoz de la Peña, M.P. Rodríguez, G.M. Escandar. *Talanta*, 51 (2000) 949.  
130. X.Z. Du, W.H. Lu, H.L. Deng, J.G. Hou, J.Z. Gao, J.W. Kang. *Spectrosc. Anal.*, 24 (2004) 402.  
131. L.X. Mu, Y. Wang, Z. Zhang, W.J. Jin. *Anal. Lett.*, 37 (2004) 1469.  
132. J.J. Wu, Y. Wang, J.B. Chao, L.N. Wang, W.J. Jin. *J. Phys. Chem. B*, 108 (2004) 8915.



## **REACTIVOS, INSTRUMENTACIÓN Y METODOLOGÍA**



## REACTIVOS, INSTRUMENTACIÓN Y METODOLOGÍA

<b>1. REACTIVOS .....</b>	<b>63</b>
1.1. Analitos .....	63
1.2. Átomos pesados y agente desoxigenante .....	64
1.3. Fases sensoras .....	64
1.4. Disolventes orgánicos .....	65
<b>2. DISOLUCIONES .....</b>	<b>66</b>
2.1. Analitos.....	66
2.2. Átomos pesados y desoxigenantes .....	66
2.2. Regeneradoras.....	66
<b>3. INSTRUMENTACIÓN.....</b>	<b>67</b>
3.1. Medidas de fosforescencia.....	67
3.2. Pesada .....	68
3.3. Material para análisis por inyección en flujo .....	68
3.4. Material adicional .....	69
<b>4. METODOLOGÍA PARTE A. FOSFORESCENCIA A TEMPERATURA AMBIENTE INDUCIDA POR     ÁTOMOS PESADOS.....</b>	<b>69</b>
4.1. Características espectroscópicas.....	70
4.2. Selección de los parámetros instrumentales de medida.....	70
4.2.1. Optimización del voltaje del detector.....	70
4.2.1. Optimización del tiempo de demora e integración .....	71
4.2.1. Optimización del ancho de rendijas .....	71
4.3. Selección de variables experimentales .....	71
4.3.1. Optimización de reactivos .....	71
4.3.2. Influencia de disolventes orgánicos .....	72
4.3.3. Influencia del pH.....	72
4.3.4. Estabilidad con el tiempo.....	72
<b>5. METODOLOGÍA PARTE B. OPTOSENSORES FOSFORESCENTES A TEMPERATURA AMBIENTE ...</b>	<b>73</b>
5.1. Selección de la fase sensora.....	74
5.2. Características espectroscópicas en fase sólida .....	75
5.3. Diseño del sistema de flujo .....	76
5.4. Selección de la disolución regenerante .....	77
5.5. Selección de parámetros instrumentales de medida .....	78
5.5.1. Optimización del voltaje del detector.....	78

5.5.2. Optimización del ancho de rendijas .....	78
5.6. Optimización de variables experimentales .....	78
5.6.1. Optimización de átomo pesado y desoxigenante .....	78
5.6.2. Tipo y porcentaje de disolvente orgánico .....	78
5.6.3. Influencia del pH .....	78
5.7. Optimización de variables de flujo .....	79
5.7.1. Velocidad de flujo .....	79
5.7.2. Volumen de inyección de muestra .....	80
<b>6. ESTABLECIMIENTO DEL MÉTODO ANALÍTICO .....</b>	<b>80</b>
6.1. Procedimiento operatorio .....	80
6.2. Recta de calibrado .....	80
6.3. Parámetros de fiabilidad .....	80
6.4. Método de adición de patrón .....	83

## 1. REACTIVOS

Los reactivos empleados en la parte experimental de la presente Memoria se pueden agrupar en: analitos, moléculas suministradoras de átomos pesados, agente desoxigenante, fases sensoras, disolventes orgánicos y especies interferentes.

### 1.1 Analitos

Los analitos empleados se muestran en la Tabla R-1 junto con la abreviatura empleada en el texto, datos correspondientes a su casa comercial suministradora y referencia.

**Tabla R-1. Analitos**

<b>Analito</b>	<b>Siglas</b>	<b>Casa comercial y referencia</b>
Dipiridamol	-	Sigma, ref.: D-9766
Nafcilina	-	Sigma, ref.: N-3269
Fuberidazol	FBZ	Riedel-de Haën, ref.: 45515
Napropamida	-	Riedel-de Haën, ref.: 36175
Naptalan	NAP	Riedel-de Haën, ref.: 34361
1-Naftilamina	NNA	Riedel-de Haën, ref.: 34390
Naftaleno	NAPH	Supelco, ref.: LA-83011
Acenafileno	ACEN	Supelco, ref.: LA-88342
Acenafteno	ACE	Supelco, ref.: LA-92694
Fluoreno	FLU	Supelco, ref.: LA-74473
Fenantreno	PHE	Supelco, ref.: LA-92542
Antraceno	ANT	Supelco, ref.: LA-86593
Fluoranteno	FLT	Supelco, ref.: LA-88185
Pireno	PYR	Supelco, ref.: LA-74472
Criseno	CHRY	Supelco, ref.: LA-38984
Benzo(a)antraceno	BaA	Supelco, ref.: LA-91542
Benzo(k)fluoranteno	BkF	Supelco, ref.: LA-84149
Benzo(b)fluoranteno	BbF	Supelco, ref.: LA-94245
Benzo(a)pireno	BaP	Supelco, ref.: LA-88347
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	IcdP	Supelco, ref.: LA-63804
Benzo(g,h,i)perileno	BghiP	Supelco, ref.: LA-94961
Dibenzo(a,h)antraceno	DBahA	Supelco, ref.: LA-94494

Todos los HAPs se adquirieron conjuntamente en una colección (KIT 610-N) de Supelco con referencia 4-7351.

### 1.2. Átomos pesados y agente desoxigenante

Los átomos pesados utilizados en forma de sales se muestran junto con los datos correspondientes a la casa suministradora, pureza y referencia en la Tabla R-2.

Como agente desoxigenante se utilizó sulfito sódico, los datos correspondientes a la casa suministradora, pureza y referencia se muestran también en la Tabla R-2.

**Tabla R-2. Átomos pesados y agente desoxigenante**

Reactivo	Casa comercial y referencia
KI	Merck, 99.5%, ref.: 05043
TiNO <sub>3</sub>	Aldrich, 99.9%, ref.: 30,923-0
Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub>	Merck, 98%, ref.: 6657

### 1.3. Fases sensoras

Las resinas comerciales usadas como fases sensoras se muestran en la Tabla R-2 junto con los datos correspondientes a su carácter iónico o no iónico, casa comercial suministradora y referencia.

**Tabla R-3. Resinas**

Tipo de resina	Carácter	Casa comercial y referencia
Gel de Sílica "Davisil"	No iónico	Supelco, ref.: 236845
Gel de Sílica "Merck"	No iónico	Supelco, ref.: 242179
Amberlita XAD 2	No iónico	Supelco, ref.: 20275
Amberlita XAD 4	No iónico	Supelco, ref.: 20276
Amberlita XAD 7	No iónico	Supelco, ref.: 13361-U
Dowex 1x2	Aniónico	Fluka, ref.: 44295
Dowex 1x4	Aniónico	Supelco, ref.: 1X4200
Dowex 1x8	Aniónico	Fluka, ref.: 44335
Dowex 50wx2	Catiónico	Fluka, ref.: 44460
Dowex 50wx4	Catiónico	Fluka, ref.: 44480
Dowex 50wx8	Catiónico	Fluka, ref.: 44515

Para la fabricación de los polímeros impresos se usaron los prepolimeros y entrecruzador mostrados en la Tabla R-4.

**Tabla R-4. Reactivos polímeros impresos**

<b>Reactivo</b>	<b>Casa comercial y referencia</b>
Difenilmetano 4, 4'- isocianato	Merck, ref.: 8.10797
Bromohidroquinona	Fluka, ref.: 85610
Tetrabromohidroquinona	Fluka, ref.: 85624
Tetrabromobisfenol A	Sigma, ref.:23978
Floroglucinol	Fluka, ref.: 79330
Bisfenol A	Sigma, ref.:239658

#### 1.4. Disolventes orgánicos

Los disolventes orgánicos empleados se muestran en la Tabla R-5 junto con los datos correspondientes a su pureza, casa comercial suministradora y referencia.

**Tabla R-5. Disolventes orgánicos**

<b>Disolvente</b>	<b>Casa comercial y referencia</b>
Tetrahidrofurano	Merck, ref.: 1.09731
Tolueno	Merck, ref.: 1.0024
Etanol	Merck, ref.: 1.00983
Metanol	Scharlau, ref.: Me0302
Acetona	Merck, ref.: 1.00014
Acetonitrilo	Panreac, ref.: 131881
1,4-Dioxano	Sigma, ref.: D-9553
N,N-Dimetilformamida	Merck, ref.: 3053

## 2. DISOLUCIONES

### 2.1. Analitos

Se prepararon disoluciones madre de dipiridamol, nafcilina, fuberidazol, napropamida, naptalan y 1-naftilamina de 50 µg/mL, disolviendo 2.5 mg de cada uno en agua bidestilada hasta un volumen final de 50 mL. En el caso de los HAPs y debido a su baja solubilidad en agua, se prepararon disoluciones madre de 50 µg/mL de cada uno en etanol, metanol, acetona, acetonitrilo, 1,4-dioxano y N,N-dimetilformamida disolviendo 2.5 mg de analito en los 50 mL de cada disolvente orgánico.

### 2.2. Átomos pesados y desoxigenante

Las dos sales utilizadas como átomo pesado se prepararon a diferentes concentraciones. Así para el caso del KI, se prepararon disoluciones de concentración 2 M y 5 M, disolviendo 166 gr. o 426 g. respectivamente, en 250 mL de agua bidestilada. Mientras para el  $\text{TINO}_3$  se prepararon disoluciones de 0.25 M pesando 6.66 g. y disolviéndolos en 100 mL de agua bidestilada.

El agente desoxigenante utilizado en la presente memoria fue  $\text{Na}_2\text{SO}_3$ . La disolución utilizada tenía una concentración de 0.2 M y fue preparada disolviendo 0.630 g en 25 mL de agua bidestilada. Esta disolución debe ser preparada diariamente y hay que mantenerla siempre en un matraz cerrado para evitar su oxidación por el oxígeno atmosférico.

### 2.3. Regeneradoras

Se han utilizando distintos regenerantes que permitieran que el optosensor propuesto fuese un sistema reutilizable. Así se ensayaron:

- ✓ Disoluciones de ácidos: HCl 6 M,  $\text{HNO}_3$  (6 M y 15 M) y  $\text{H}_2\text{SO}_4$  6 M
- ✓ Disoluciones de bases: NaOH 0.05, 0.1, 0.5, 1, 2, 4 y 8 M
- ✓ Disolventes orgánicos puros (etanol, metanol, acetona, acetonitrilo, 1,4-dioxano y dimetilformamida) y sus disoluciones en agua bidestilada en diferentes proporciones.



### 3. INSTRUMENTACIÓN

#### 3.1. Medidas de fosforescencia

Las medidas de intensidad relativa de fosforescencia (IRP), la respuesta del optosensor y el registro de los espectros así como el cálculo de los tiempos de vida, se han llevado a cabo en un espectrofotómetro Varian Cary Eclipse (Figura R-1). Es un equipo versátil, compacto y fácil de manejar, que ofrece la posibilidad de realizar medidas de fluorescencia, fosforescencia y quimioluminiscencia en el mismo equipo, sin la necesidad de acoplar accesorios externos.

Posee una lámpara de Xe pulsante acoplada a la óptica Schawarzschild con una potencia de pico equivalente de 75 kW y una anchura de pico de 2  $\mu$ s en su zona media. La lámpara se enciende sólo cuando toma medidas, manteniendo la muestra en oscuridad mientras tanto, para así poder trabajar con muestras fotodegradables.

Presenta dos monocromadores en configuración Czerny-Turner con 0.125 m de distancia focal, con red de difracción de 30x35 mm y 1200 rayas por milímetro, centradas a 440 nm para el de emisión y de 370 nm para el de excitación. Cubriendo el intervalo de 200-900 nm con una exactitud de  $\pm 1$  nm, una repetibilidad de  $\pm 0.2$  nm, y con una sensibilidad (banda raman del agua)  $< 500:1$ .

Su geometría de haz horizontal incrementa la sensibilidad y hace que sólo requiera 0.5 mL de muestra, en una cubeta convencional. Permite la variación de las rendijas tanto de excitación como de emisión de 1.5 a 20 nm con velocidad de barrido máxima de 24000 nm/min. Funciona bajo Windows 95/98/NT y bajo distintos tipos de programas, en función de la clase de trabajo que se vaya a realizar.



Figura R-1. Equipo Varian Cary Eclipse.

### 3.2. Pesada

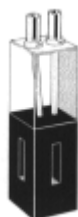
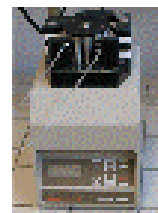
Las pesadas se llevaron a cabo mediante la utilización de un granatario y una balanza de precisión.



- ✓ Granatario Cobos modelo serie CB (sensibilidad 1 mg).
- ✓ Balanza Mettler modelo AE240 (sensibilidad 0.01 mg).

### 3.3. Material para análisis por inyección en flujo

- ✓ Bomba peristáltica Gilson Miniplus 3 de cuatro canales.
- ✓ Válvulas de inyección de 6 vías Supelco Rheodyne 5020.



- ✓ Célula de flujo de cuarzo Hellma modelo 176.052-QS con un paso de luz de 1.5 mm y una altura del centro de la ventana de 15 mm.
- ✓ Jeringas esterilizadas de 10 mL Plastipak.
- ✓ Tubos de Teflón (politetrafluoroetileno) de 0.8 mm de diámetro interno.
- ✓ Conexiones Omnifit de teflón.

### 3.4. Material adicional

- ✓ Baño de ultrasonidos Selecta modelo Ultrasons de 40 Khz de frecuencia.
- ✓ Micropipetas Transferpette Brand Typ Digital de 10-50  $\mu\text{L}$ , 50-250  $\mu\text{L}$  y 200-1000  $\mu\text{L}$ .
- ✓ Mortero de ágata.
- ✓ Tamices con paso de luz 0.160 mm, 0.120 mm y 0.080 mm (Filtro).
- ✓ Material de vidrio como pipetas y matraces, graduadas y aforadas de diversos volúmenes comprendidos entre 1 y 50 mL, tubos de ensayo, tubos de tapón de rosca y vasos diversos.



## 4. METODOLOGÍA PARTE A. FOSFORESCENCIA A TEMPERATURA AMBIENTE INDUCIDA POR ÁTOMOS PESADOS

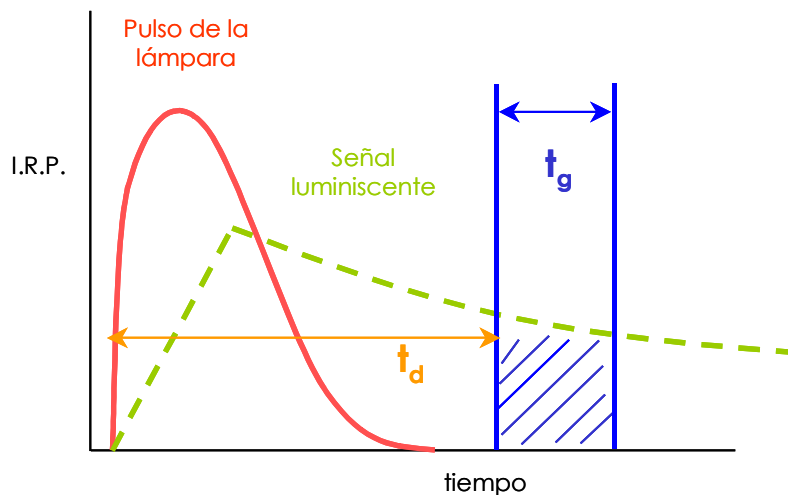
Para llevar a cabo la optimización de los parámetros y variables estudiadas se han realizado tres medidas para cada valor de parámetro o variable experimental con respecto al tiempo, obteniéndose el registro de la intensidad relativa de fosforescencia con el tiempo y calculando su intervalo de error mediante la ecuación:

$$\text{Intervalo de error} = \pm \frac{s \cdot t}{\sqrt{n}}$$

donde  $s$  es la desviación estándar de las medidas,  $n$  es el número de réplicas realizadas (en nuestro caso hemos elegido 20) y  $t$  es la  $t$  de student para  $n-1$  grados de libertad y un nivel de confianza del 95% (que para el caso de tres réplicas tiene el valor de 2.093).

## 4.1. Características espectroscópicas

Se registraron los espectros de excitación y de emisión fosforescentes, el espectro de fosforescencia total y la curva de decaimiento fosforescente a los máximos de excitación y de emisión. Estos datos experimentales aportan información suficiente sobre todas las características espectroscópicas del compuesto en estudio. Los espectros de excitación y emisión fosforescentes muestran las longitudes de onda de máxima intensidad. El espectro de fosforescencia total permite conocer, de forma global, la zona espectral donde existe señal fosforescente así como su mapa de contorno. La curva de decaimiento fosforescente, (ver figura R-2) permite establecer dos parámetros instrumentales: tiempo de decaimiento ( $t_d$ ) y tiempo de integración ( $t_g$ ).



**Figura R-2. Definición del tiempo de respuesta ( $t_d$ ) y de integración ( $t_g$ ).**

## 4.2. Selección de parámetros instrumentales de medida

### 4.2.1. Optimización del voltaje del detector

La sensibilidad se refiere a la capacidad del instrumento para medir una señal distinguiéndola del ruido de fondo. Se ajusta mediante el cambio de voltaje aplicado al fotomultiplicador. La sensibilidad del detector es una medida del grado de ampliación de las señales luminiscentes. Su valor puede variar entre 100 a 1000 V, si bien lo normal cuando se trabaja con la lámpara de pulso del espectrofotómetro es de 800 a 1000 V. Este parámetro afecta tanto al valor de la señal analítica como a su reproducibilidad.

#### 4.2.2. Optimización del tiempo de demora e integración

A partir de la curva de decaimiento fosforescente se pueden conocer los valores extremos de  $t_d$  y  $t_g$ . El primero indica el tiempo a partir del cual se integra la señal fosforescente, debe estar comprendido entre el tiempo que dura el pulso de la lámpara (aproximadamente  $12 \mu\text{s}$ ) y el impuesto por la vida media del compuesto. El tiempo de integración es el tiempo durante el cual se integra la señal fosforescente. Estos dos parámetros afectan a la sensibilidad y selectividad de los métodos propuestos.

#### 4.2.3. Optimización del ancho de rendijas

Las medidas de fosforescencia deben registrarse forzosamente a las máximas rendijas de excitación y emisión que dispone el espectrofotómetro, 20/20 nm respectivamente, puesto que a rendijas menores las señales son prácticamente imperceptibles.

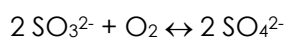
### 4.3. Selección de variables experimentales

#### 4.3.1. Optimización de reactivos

En este apartado se van a optimizar los reactivos utilizados para la obtención de señales de fosforescencia en la metodología HAI-RTP:

- Un agente desactivante del estado singlete que favorezca el cruzamiento intersistemas: Para ello se usará el KI y  $\text{TlNO}_3$ , ya que los iones  $\text{I}^-$  y  $\text{Tl}^+$  pueden situarse fácilmente alrededor del analito favoreciendo el cruzamiento entre sistemas ( $S \rightarrow T$ ) y provocar la desactivación fosforescente.
- Un agente desoxigenante que favorezca la eliminación de oxígeno, presente en la disolución y evitar su efecto sobre el estado triplete provocando la desactivación de este estado. En la presente memoria se utilizó, en todos los casos, como agente desoxigenante  $\text{Na}_2\text{SO}_3$ .

El proceso de desoxigenación tiene lugar de forma química mediante la adición a la solución que contiene el analito de una cierta cantidad de agente desoxigenante. El proceso de desoxigenación, se debe a su poder reductor:



Se ha visto que un factor importante que afecta tanto a la intensidad de fosforescencia como al tiempo de estabilización de la señal fosforescente es la concentración de agente desoxigenante, por lo que es necesario, para cada sistema, optimizar la concentración de  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  midiendo tanto la señal de fosforescencia como el tiempo de estabilización de la misma.

#### 4.3.2. Influencia de disolventes orgánicos

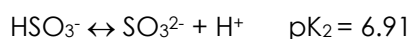
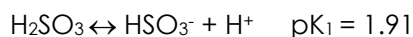
La limitación de la HAI-RTP al estudio de analitos solubles en agua, hace necesario estudiar la influencia de la presencia de pequeños porcentajes de disolventes orgánicos, miscibles con ella, con el fin de posibilitar la solubilización de sustancias que no lo fueran en medio acuoso, y ampliar de esta forma el campo de aplicabilidad de esta técnica.

Se han estudiado distintos disolventes orgánicos miscibles con agua y de distinta constante dieléctrica (etanol, metanol, acetona, acetonitrilo y dimetilformamida) y la influencia de distintas proporciones de los mismos sobre la señal fosforescente en cada sistema.

#### 4.3.3. Influencia del pH

El pH afecta a la disociación de los diferentes compuestos presentes en el sistema en función de su  $\text{pK}_a$ .

Por otro lado como agente desoxigenante se ha utilizado sulfito sódico y el pH del medio afecta a la capacidad de dicho reactivo en la eliminación del oxígeno. El pH a partir del cual se ha comprobado que la actuación desoxigenante del sulfito es positiva es aproximadamente 6, algo que se puede confirmar por los equilibrios de disociación ácido-base:



Por tanto es necesario realizar un estudio de la influencia del pH en la emisión fosforescente de cada analito variando el mismo desde 4 hasta 10.

#### 4.3.4. Estabilidad con el tiempo

Existe una cierta cinética en la reacción de desoxigenación de las disoluciones, pero una vez transcurrida, la señal permanece estable. Es necesario conocer durante cuanto tiempo la señal es estable o al menos, si permanece estable durante un

tiempo adecuado para poder realizar las medidas analíticas. Para ello, se registró la intensidad de fosforescencia emitida por las muestras durante un tiempo de al menos una hora.

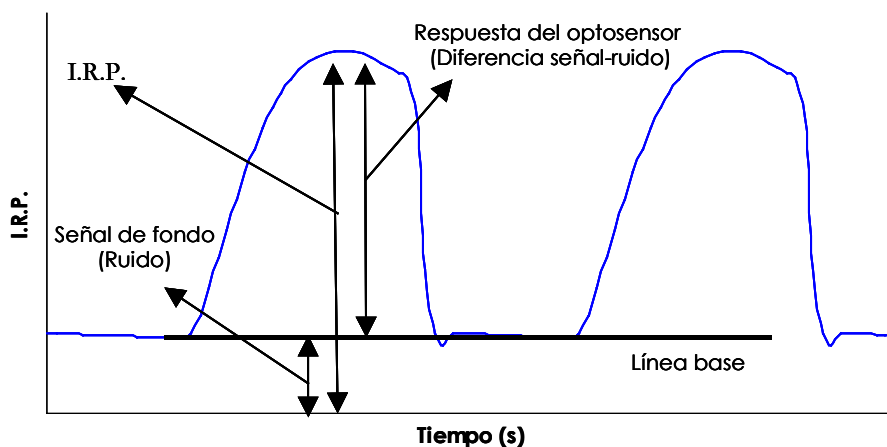
## 5. METODOLOGÍA PARTE B. OPTOSENSORES FOSFORESCENTES A TEMPERATURA AMBIENTE

Para llevar a cabo la optimización de los parámetros y variables estudiadas se han realizado tres medidas para cada valor de parámetro o variable experimental con respecto al tiempo, obteniéndose el fiagrama (registro de la intensidad relativa de fluorescencia con el tiempo) y calculando su intervalo de error mediante la ecuación:

$$\text{Intervalo de error} = \pm \frac{s \cdot t}{\sqrt{n}}$$

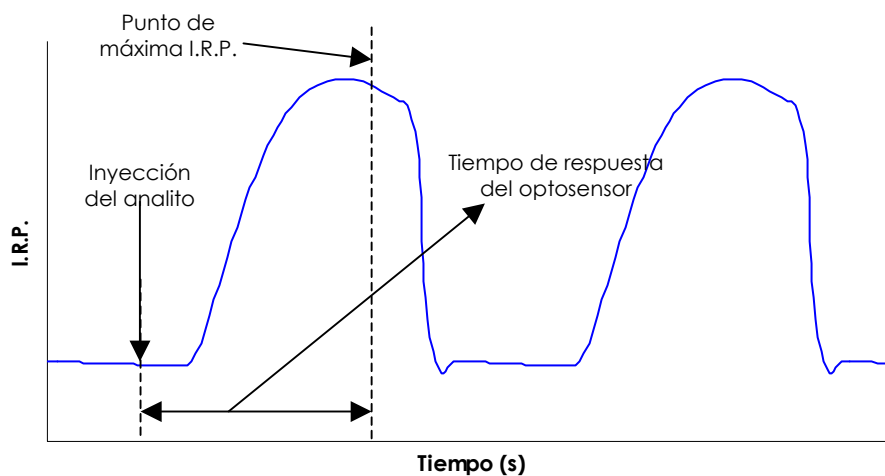
donde  $s$  es la desviación estándar de las medidas,  $n$  es el número de réplicas realizadas (normalmente tres) y  $t$  es la  $t$  de student para  $n-1$  grados de libertad y un nivel de confianza del 95% (que para el caso de tres réplicas tiene el valor de 4.303).

Así, se establece la intensidad relativa de fosforescencia (I.R.P.) como la cantidad de luz, en unidades arbitrarias, que llega al detector del fosforímetro. Por otro lado, se ha establecido la respuesta del optosensor como la diferencia entre la I.R.P. obtenida cuando el analito está soportado sobre la fase sensora (señal) y la I.R.P. obtenida por la dispersión de la luz en la fase sensora (ruido) (véase Figura R-3).



**Figura R-3. Definición de línea base, I.R.P., señal de fondo o ruido y respuesta del optosensor o diferencia señal-ruido.**

Por último, el *tiempo de respuesta* del optosensor es el tiempo que transcurre desde que se inyecta el analito hasta que se obtiene la mayor señal (Figura R-4).



**Figura R-4. Definición del tiempo de respuesta del optosensor.**

### 5.1. Selección de la fase sensora

Para el desarrollo de un optosensor se ha de elegir una fase sensora que permita una fijación selectiva en su estructura química del analito en estudio y que ésta tenga propiedades fosforescentes adecuadas.

Para ello, se han evaluado 11 tipos de resinas diferentes: no iónicas (Gel de Sílica Davisil, Gel de Sílica Merck, Amberlita XAD 2, Amberlita XAD 4 y Amberlita XAD 7), aniónicas (Dowex 1x2, Dowex 1x4 y Dowex 1x8) y catiónicas (Dowex 50wx2, Dowex 50wx4 y Dowex 50wx8). También se ha evaluado polímeros impresos moleculares, los cuales fueron sintetizados en nuestro laboratorio.

Además del tipo de fase sensora, el tamaño de la misma también influye en la interacción que se produce entre el analito y la fase sensora. Por ello, se trituraron las resinas en un mortero de ágata y se tamizaron obteniendo cuatro tamaños diferentes de partícula: < 80  $\mu\text{m}$ , entre 80 y 120  $\mu\text{m}$ , entre 120 y 160  $\mu\text{m}$  y > 160  $\mu\text{m}$ ).

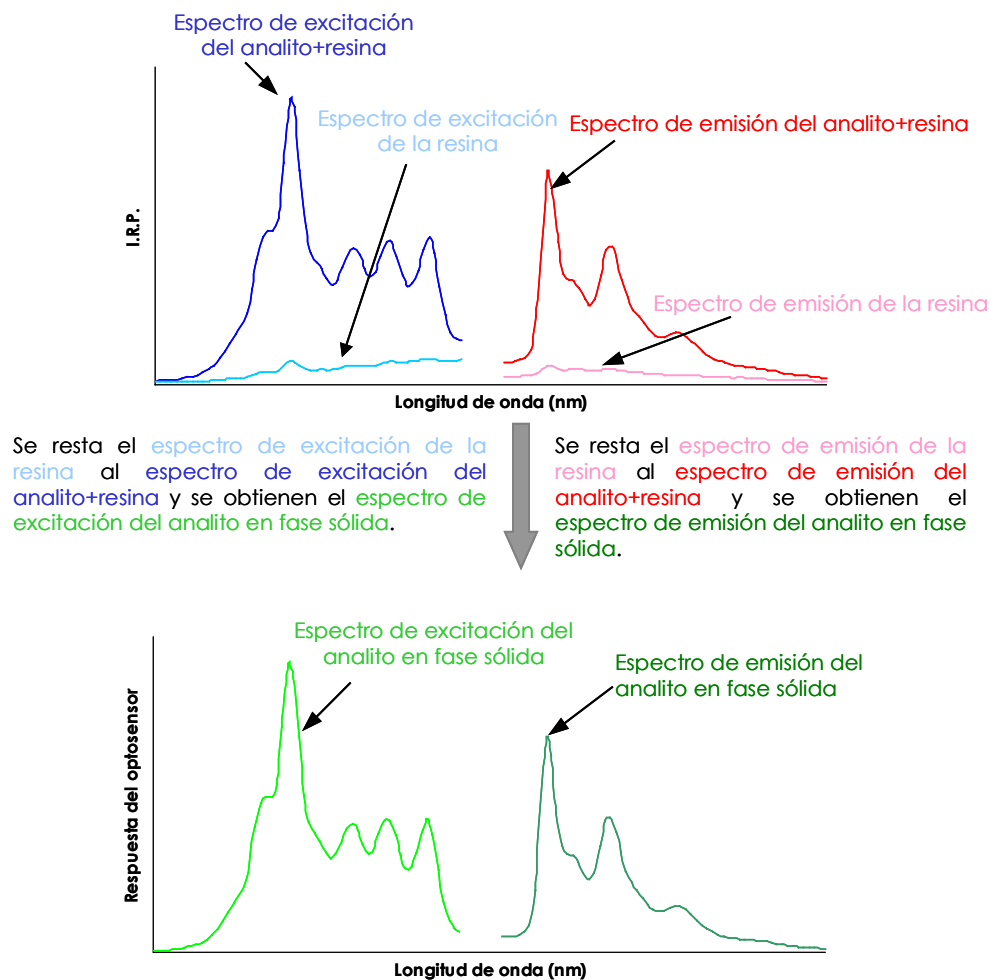
Para la selección de la fase sensora, estas (a un tamaño de partícula entre 80 y 120  $\mu\text{m}$ ) se empaquetaron en la célula de flujo y se evaluó la respuesta del optosensor obtenida por cada una de ellas así como el error de las medidas. Una vez seleccionada ésta, se procedió al estudio del efecto del tamaño de partícula



evaluando la respuesta del optosensor y el error producido para cada tamaño ensayado de la resina seleccionada.

### 5.2. Características espectroscópicas en fase sólida

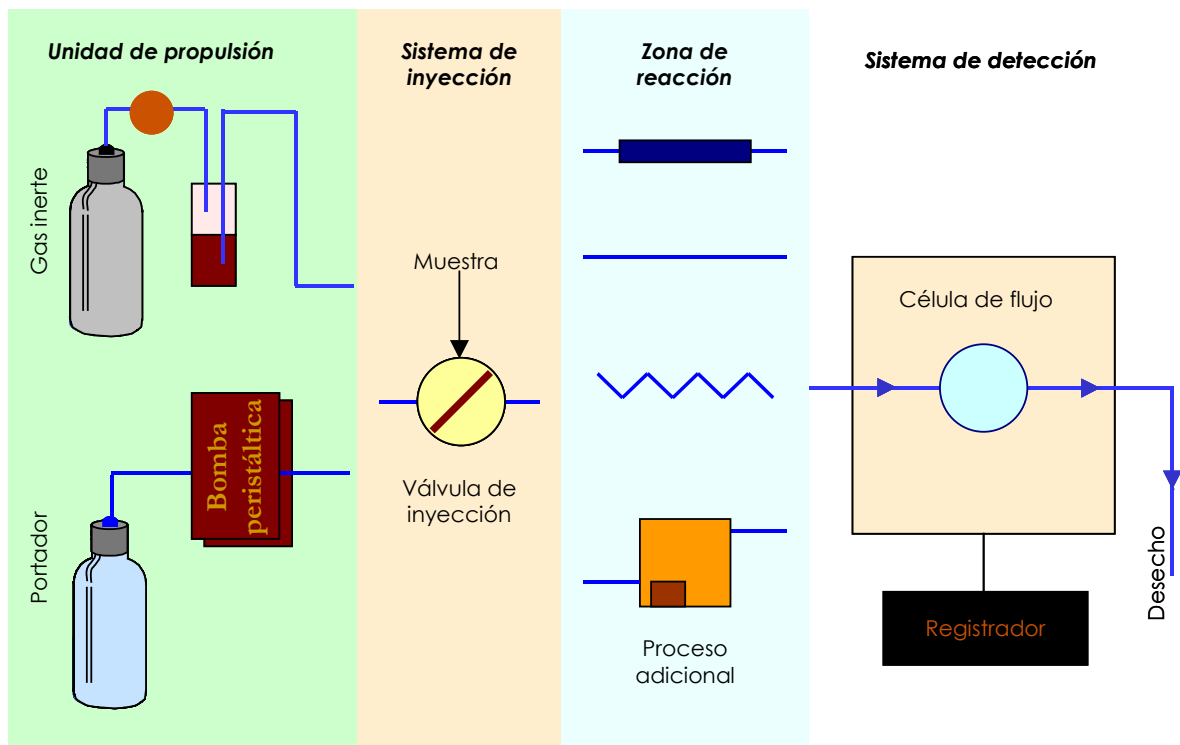
Una suspensión de la resina seleccionada en una disolución de concentración conocida del analito se empaquetó en la cubeta de flujo y se registraron los espectros de emisión y excitación, obteniéndose las características espectroscópicas del analito soportado en la fase sensora. Posteriormente, una suspensión de la resina se empaquetó en la cubeta de flujo y se volvieron a registrar los espectros de excitación y emisión fosforescente a las longitudes de onda del analito. Para determinar cuales son las longitudes de onda para la medida de fosforescencia se procedió a la eliminación de la contribución de la fase sensora, mediante una substracción de los espectros obtenidos cuando el analito estaba fijado y cuando no lo estaba (véase Figura R-5).



**Figura R-5. Esquema general de la obtención de las características espectroscópicas en fase sólida.**

### 5.3. Diseño del sistema de flujo

El sistema FIA utilizado en la presente Memoria está formado por una bomba peristáltica que impulsa a una disolución portadora, una válvula de inyección de muestra, una válvula de regeneración y un sistema de detección, que para optosensores convencionales es una cubeta de flujo situada en el compartimento de muestra del espectrofotómetro (ver Figura R-6), este sistema ha sido utilizado en todos los Capítulos de la Parte B de la presente Memoria.



**Figura R-6. Esquema general de un sistema FIA.**

En la cubeta, la resina se retiene mecánicamente por una malla de tela y se hace coincidir la fase sensora con el haz de excitación y el monocromador de emisión del instrumento (véase la Figura R-7).

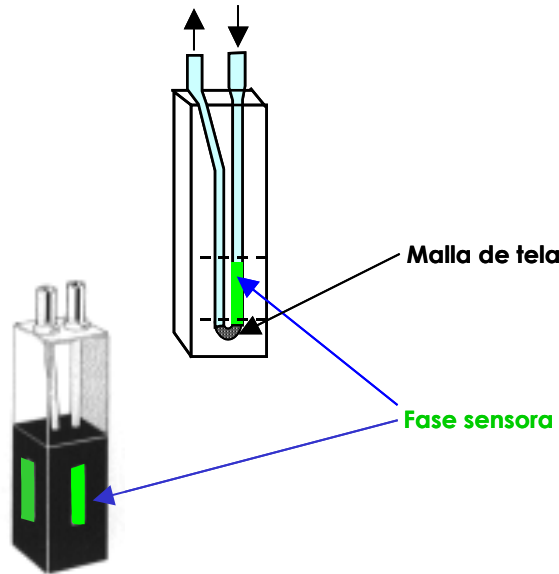


Figura R-7. Esquema de la cubeta de flujo empleada.

#### 5.4. Selección de la disolución regenerante

Cuando la interacción entre el analito y la fase sensora es irreversible en un tiempo adecuado para su uso analítico, es necesario la utilización de un sistema de regeneración que transforme al optosensor en reutilizable.

Para proceder con la selección de la disolución regenerante, se empaquetó la resina y se inyectó el analito en estudio. Cuando todo el analito estaba retenido en la fase sensora, se procedió a la inyección de las diferentes disoluciones regeneradoras, seleccionando aquella que de forma rápida y repetitiva reproducía con más exactitud la línea base y por tanto la respuesta del optosensor (véase Figura R-8).

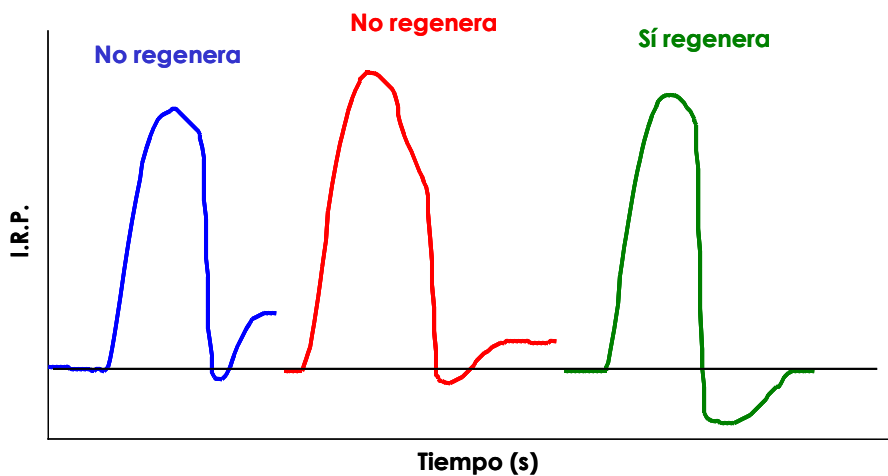


Figura R-8. Selección de la disolución regenerante.

## 5.5. Selección de parámetros instrumentales de medida

### 5.5.1. Optimización del voltaje del detector

Para su optimización se realizaron sucesivas inyecciones de una muestra en el sistema de flujo mientras se variaba el voltaje aplicado al fotomultiplicador, seleccionado como óptimo aquel voltaje que producía la mayor respuesta del optosensor con un error adecuado al método pretendido.

### 5.5.2. Optimización del ancho de rendijas

Para su optimización se realizaron sucesivas inyecciones de una muestra en el sistema de flujo mientras se variaba la anchura de las rendijas de excitación y emisión simultáneamente en todos los posibles valores de anchura, seleccionado como aperturas de rendija óptimas aquellas que producían la mayor diferencia señal-ruido.

## 5.6. Optimización de variables experimentales

### 5.6.1. Optimización de átomo pesado y desoxigenante

En este apartado se siguió la misma metodología utilizada en el punto 4.3.1. de esta sección, realizando sucesivas inyecciones de una muestra en el sistema de flujo mientras se variaba el tipo y concentración de átomo pesado tanto para la disolución portadora como para la muestra. De igual forma se realizaron inyecciones sucesivas de diferentes concentraciones de  $\text{Na}_2\text{SO}_3$ .

### 5.6.2. Tipo y porcentaje de disolvente orgánico

El disolvente orgánico se utiliza en el desarrollo de optosensores de analitos altamente insolubles en agua. La presencia del disolvente orgánico ayuda a la solubilización de los analitos en mezclas hidro-orgánicas e impide que éstos queden retenidos en los tubos de teflón del sistema FIA.

Para su selección, se adicionaron porcentajes crecientes de disolventes orgánicos miscibles con agua a las muestras, manteniendo la ausencia de disolvente orgánico en el portador, y se seleccionó aquel que producía una respuesta del optosensor adecuada al menor porcentaje posible. Una vez seleccionado el tipo y porcentaje de disolvente orgánico en las muestras se procedió a la selección del

porcentaje de disolvente orgánico óptimo en el portador. Para ello, manteniendo las muestras en sus condiciones experimentales óptimas, se varió el porcentaje del disolvente orgánico en el portador, seleccionando el porcentaje adecuado para obtener la mayor diferencia señal-ruido.

Hay que tener en cuenta, que tanto las válvulas de inyección como las tuberías de teflón y conectores soportan la presencia de disolvente orgánico, sin embargo, las tuberías de las bombas peristálticas se deterioran rápidamente con su presencia, por lo que, en todos los casos en la que la presencia de disolvente orgánico en el portador no mejore sustancialmente la respuesta del mismo se optará por no adicionarlo en la disolución portadora.

### **5.6.3. Influencia del pH**

El pH afecta a la disociación de los grupos ionizables de los diferentes compuestos en función de su  $pK_a$  y también a la capacidad de retención de estos analitos en la resina. Por tanto, es necesario establecer el pH óptimo de medida fosforescente de los analitos en las fases sensoras y seleccionar el tipo y concentración de la disolución reguladora más adecuada a ese pH.

Para establecer el pH de trabajo se prepararon una serie de portadores y muestras a diferentes pHs (fijados con HCl y/o NaOH)

## **5.7. Optimización de variables de flujo**

Las variables FIA que afectan principalmente al tiempo de respuesta y a la sensibilidad del optosensor son la velocidad de flujo y el volumen de muestra inyectado.

### **5.7.1. Velocidad de flujo**

La bomba peristáltica usada permite establecer diferentes flujos en función de la velocidad de rotación de la bomba y del calibre de los tubos utilizados. Para ello, previamente se eligió un tubo de calibre adecuado y se estableció la relación entre velocidad de la bomba y flujo en mL/min.

Para seleccionar el flujo adecuado se procedió a registrar la respuesta del optosensor y el tiempo de respuesta mientras se variaba la velocidad de flujo,

seleccionándose como óptima aquella en la que se obtenía la mayor diferencia señal-ruido y el menor tiempo de respuesta posible.

### **5.7.2. Volumen de inyección de muestra**

En la válvula de inyección de muestra se pueden acoplar bucles de diferentes volúmenes entre 0.5 y 4.0 mL (experimentalmente se ha demostrado que volúmenes superiores a 4 mL dificultan mucho la introducción de muestra debido a la gran presión originada en la válvula).

Para su optimización, se procedió a registrar la respuesta del optosensor y el tiempo de respuesta mientras se variaba el volumen del bucle de la válvula de inyección de muestra, seleccionándose como solución de compromiso aquel en el que se obtenía la mayor diferencia señal-ruido y el menor tiempo de respuesta posible.

## **6. ESTABLECIMIENTO DEL MÉTODO ANALÍTICO**

### **6.1. Procedimiento operatorio**

Optimizados todos los parámetros instrumentales y variables experimentales se procede al establecimiento del procedimiento operatorio a seguir en el desarrollo del método propuesto, indicando de una forma precisa las condiciones a las cuales se han de llevar a cabo las medidas.

### **6.2. Recta de calibrado**

Se estableció la recta de calibrado del método establecido, variando la concentración del analito dentro del intervalo lineal y registrando la respuesta fosforescente a las condiciones expuestas en su procedimiento operatorio. Se midieron tres réplicas para cada nivel de concentración.

### **6.3. Parámetros de fiabilidad**

El tratamiento estadístico de los datos se realizó siguiendo los procedimientos propuestos por la IUPAC [1].

Dicho procedimiento propone estimar los parámetros de calidad del método a partir de una serie de réplicas de distintos patrones; para ello es necesario obtener la recta de calibrado, se recomiendan 3 réplicas para 5 valores de concentración. La ecuación de la recta sería:

$$R = a + b \cdot c \quad (\text{Ecuación 1})$$

donde  $R$  indica la señal del instrumento,  $c$  la concentración,  $a$  la ordenada en el origen y  $b$  la pendiente; el cálculo de la ecuación de la recta de calibrado se hace aplicando el modelo estadístico de la regresión lineal, que permite, no sólo encontrar dicha ecuación con el menor error a partir de las medidas experimentales, sino que también suministra una medida de la imprecisión de este cálculo.

Con los datos obtenidos, se calculan los valores de la pendiente y de la ordenada en el origen, a partir de las ecuaciones correspondientes. Hay que destacar que deben tomarse todas las parejas de valores de forma individual y no calcular la media de las señales para cada patrón de concentración.

El tratamiento estadístico se ha llevado a cabo mediante los cálculos descritos por la IUPAC que indican que es posible establecer unos límites alrededor del valor medio estimado, dentro de los cuales se puede esperar hallar la media de la población con cierto grado de probabilidad. Estos límites se denominan límites de confianza o probabilidad de que sea cierto que la media de la población está comprendida entre ellos. El intervalo definido por los límites alrededor de la media estimada se denomina intervalo de confianza. Se usará, durante todos los cálculos, un nivel de confianza del 95%.

El intervalo dentro del cual se puede afirmar que se encuentra la media de la probabilidad o nivel de confianza, se puede escribir:

$$\bar{c} \pm \frac{t \cdot s}{\sqrt{n}} \quad (\text{Ecuación 2})$$

donde  $\bar{c}$  es la concentración media obtenida a partir de las muestras analizadas,  $t$  es el valor estadístico de la  $t$  de Student y  $s$  es la desviación estándar de estos valores.

---

1. IUPAC. "Nomenclature, symbols, units and their usage in spectrochemical analysis-II. Data interpretation", 33B (1978) 242.

Además de estos intervalos, se obtiene el valor del error relativo medio ( $E_r$ ), que evalúa conjuntamente la precisión y exactitud, y el valor de la desviación estándar relativa ( $DER$ ), que evalúa la precisión de la determinación, y cuyas expresiones son:

$$E_r = \frac{100 \cdot t \cdot s}{\bar{c} \cdot \sqrt{n}} \quad (\text{Ecuación 3})$$

$$D.E.R. = \frac{100 \cdot s}{\bar{c} \cdot \sqrt{n}}$$

donde  $s$  es la desviación estándar obtenida en los ensayos de repetibilidad, expresados en unidades de "señal analítica".

Según la IUPAC, el límite de detección ( $L.D.$ ) se define como la mínima cantidad de analito, expresada en unidades de concentración, distinguible de la correspondiente señal del blanco con un cierto nivel de confianza, y viene expresado por:

$$L.D. = \frac{k \cdot s_{\text{señal}}}{b} \quad (\text{Ecuación 4})$$

donde  $b$  es la pendiente de la curva de calibrado y  $k$  es un valor numérico elegido según el nivel de confianza que se desee. Se ha utilizado un valor de  $k=3$  correspondiente a un nivel de confianza del 99.86%.

El límite de cuantificación ( $L.C.$ ) se establece como el límite inferior de concentraciones por debajo del cual las medidas no ofrecen un determinado nivel de confianza. Viene dado por la expresión:

$$L.C. = \frac{k \cdot s_{\text{señal}}}{b} \quad (\text{Ecuación 5})$$

utilizándose un valor de  $k=10$ .

El término precisión se refiere a la repetibilidad o reproducibilidad de un conjunto de medidas repetidas o el grado de dispersión de las medidas individuales, en torno a su media. El parámetro más útil para establecer la precisión del método de análisis es la desviación estándar. Por otra parte, el término exactitud se refiere a la diferencia o error entre la media del conjunto de resultados y un valor que se acepta como verdadero o correcto.



El intervalo dinámico lineal se define como el intervalo de concentraciones en el que la curva de la señal analítica es lineal, o la zona donde la pendiente de dicha curva de calibración permanece constante.

#### 6.4. Método de adición de patrón

El establecimiento de la veracidad de un método analítico conlleva la comprobación de que los resultados obtenidos por su aplicación no son significativamente diferentes del verdadero valor convencional. Para ello, y en ausencia de materiales y métodos de referencia, se recurre al uso de la metodología de adición de patrón.

El uso de esta metodología requiere la ausencia de errores sistemáticos que no puedan ser corregidos, bien atribuibles al sistema de medida o cometidos en el proceso de calibrado, o bien debidos a una interferencia directa a partir de la matriz de la muestra (definida por Cardone como cualquier sustancia de la matriz de la muestra, que es mayor o menor que la debida sólo al analito, produciendo así un error sistemático de magnitud no aceptable).

Si la técnica de adición de patrón se utiliza para comprobar la validez de un procedimiento analítico, es necesario asegurar que no existe el efecto interactivo matriz-analito, es decir, que no existe un error sistemático proporcional que provocaría una modificación de la pendiente del calibrado con adición. Para comprobarlo hay que comparar la pendiente de la recta obtenida en el calibrado con adición de patrón con la pendiente de la recta de calibrado. El paralelismo de tales rectas implica la ausencia de tal efecto interactivo.

Para ensayar la igualdad de pendientes, se usa un test de la  $t$  de Student. El estadístico, con  $(n_S+n_A-4)$  grados de libertad, a utilizar se calcula por la siguiente expresión:

$$t_{CDI}(b) = \frac{|b_S - b_A|}{s_p \sqrt{\frac{1}{\sum (c_{i,S} - \bar{c}_S)^2} + \frac{1}{\sum (c_{i,A} - \bar{c}_A)^2}}} \quad (\text{Ecuación 6})$$

donde  $b_S$  es la pendiente de la recta del calibrado,  $b_A$  es la pendiente de la recta de adición de patrón,  $s_p$  es la desviación estándar promedio entre el calibrado y

la recta de adición de patrón,  $c_{i,S}$  son los valores de cada concentración usados en el calibrado con patrones tomados de forma individual,  $c_{i,A}$  son los valores de cada concentración usados en la adición de patrón tomados de forma individual,  $\bar{c}_S$  es la concentración media del conjunto de patrones utilizados en la recta de calibrado y  $\bar{c}_A$  es la concentración media del conjunto de patrones añadidos en la recta de adición de patrón.

La desviación estándar promedio ( $s_p$ ) se calcularía:

$$s_p = \sqrt{\frac{(n_S - 2) \cdot s_S^2 + (n_A - 2) \cdot s_A^2}{n_S + n_A - 4}} \quad (\text{Ecuación 7})$$

donde  $n_S$  es el número de datos utilizados para establecer el calibrado con patrones,  $n_A$  es el número de datos utilizados para establecer la recta de adición de patrón,  $s_S$  es la desviación estándar de regresión de la recta de calibrado y  $s_A$  la desviación estándar de regresión de la recta de adición de patrón.

Para el cálculo de las desviaciones estándar de regresión, tanto de la recta de calibrado como de la de adición de patrón, se utiliza la ecuación 6:

$$s_{R,C}^2 = \frac{1}{n - 2} \left[ (RR) - \frac{(Rc)^2}{(cc)} \right] \quad (\text{Ecuación 8})$$

Las pendientes no difieren significativamente para un nivel de significación del 99%, si el valor de la  $t(b)$  calculada es menor que la  $t(b)$  tabulada.

**PARTE A**  
**Fosforescencia a temperatura ambiente**  
**inducida por átomos pesados**

El trabajo derivado de esta Introducción ha sido publicado en la revista  
"Critical Reviews in Analytical Chemistry 35 (2005) 1" (ver ANEXO I).



## INTRODUCCIÓN PARTE A

### FOSFORESCENCIA A TEMPERATURA AMBIENTE INDUCIDA POR ÁTOMOS PESADOS

1. NACIMIENTO DE UNA METODOLOGÍA FOSFORESCENTE EN DISOLUCIÓN ACUOSA A TEMPERATURA AMBIENTE .....	89
2. DENOMINACIÓN .....	92
3. JUSTIFICACIÓN TEÓRICA.....	92
4. DESARROLLO EXPERIMENTAL DE LA METODOLOGÍA.....	95
5. VENTAJAS Y LIMITACIONES FRENTE A OTRAS METODOLOGÍAS EN DISOLUCIÓN .....	102



Hasta hace relativamente pocos años, para el desarrollo de cualquier metodología fosforimétrica en disolución y a temperatura ambiente, se ha considerado indispensable la triada formada por: un medio organizado (agente micelar, microemulsión o ciclodextrina) para proporcionar viscosidad al microentorno que rodea al analito e impedir la desactivación por choques intermoleculares; la presencia de un átomo pesado para favorecer el cruce entre sistemas; y la presencia de un agente desoxigenante para eliminar el oxígeno presente en las muestras.

## 1. NACIMIENTO DE UNA METODOLOGÍA FOSFORESCENTE EN DISOLUCIÓN ACUOSA A TEMPERATURA AMBIENTE

En el año 1995, los investigadores Li y Huang [1] de la Universidad de Tsing Hua (Beijing, República Popular China) estudiaron algunas propiedades fosforescentes del cloruro de dansilo y de varios aminoácidos derivatizados con este marcador luminiscente en superficie sólida y medios micelares. Más tarde, este mismo grupo de investigación [2,3] comprobó que era posible obtener emisión fosforescente de estos mismos compuestos en disolución acuosa sin hacer uso de medios organizados estableciendo las características fosforescentes (longitudes de onda, intensidad relativa y vida media) de cada uno de ellos (Tabla 1). Igualmente, propusieron un método fosforimétrico para la determinación de cloruro de dansilo en presencia de nitrato de talio y sulfito sódico como desoxigenante, alcanzándose un límite de detección de  $1.9 \times 10^{-8}$  M. Se estudiaron, asimismo, diferentes sales de átomos pesados tales como KI, KBr,  $\text{KNO}_3$ ,  $\text{HCOOTl}$  y  $\text{TlNO}_3$ , pero sólo este último compuesto indujo emisión fosforescente, concluyendo en que debería existir una interacción específica de cruzamiento entre sistemas entre el  $\text{TlNO}_3$  y el cloruro de dansilo. Con respecto al efecto de la posible adición de medios organizados como ciclodextrinas (CD) y dodecil sulfato sódico (DSS), demostraron que tanto la  $\alpha$ - como la  $\beta$ -CD no afectaban a la señal fosforescente mientras que la  $\gamma$ -CD la atenúa siendo necesario un periodo de pre-irradiación para que las señales de las muestras fuesen estables. La adición de DSS no aumenta la emisión del sistema, no obstante, se observa un desplazamiento de las longitudes de onda cuando la concentración de DSS se encuentra cercana a su concentración micelar crítica. En este trabajo estudiaron también la influencia de la

- 
1. L.D. Li, W.G. Huang. *Anal. Chim. Acta*, 31 (1995) 345.
  2. L.D. Li, Y.D. Chen, A.J. Tong. *Huaxue Tongbao*, 6 (1996) 46.
  3. L.D. Li, Y.D. Chen, Y. Zhao, A.J. Tong. *Anal. Chim. Acta*, 341 (1997) 241.

presencia de diferentes disolventes orgánicos observando que con porcentajes inferiores al 25% de acetona no se producían cambios sustanciales ni en la emisión ni en el tiempo de estabilización de la señal, salvo con metanol, etanol o propanol con los que se observaron cambios sustanciales en el tiempo de aparición de la señal mientras que con acetonitrilo, butanona y 1,4-dioxano se producía una desaparición total de la fosforescencia.

A pesar del estado embrionario de esta metodología, los autores vislumbraron ciertas ventajas frente a las otras metodologías fosforescentes en disolución existentes hasta ese momento, como por ejemplo CD-RTP o MS-RTP:

- 1) Sin un medio protector a nivel microscópico, la metodología no sólo es más simple sino que se evitan otros problemas relacionados con la adición de ese medio.
- 2) Esta metodología genera sistemas transparentes sin la aparición de turbidez (como ocurre en la CD-RTP) y sin que se formen espumas (como ocurre en la MS-RTP).
- 3) Además, el hecho de que la señal fosforescente se induzca directamente en disolución acuosa hace posible que se pueda combinar con otras técnicas como la cromatografía líquida, el análisis por inyección en flujo o la electroforesis capilar.

En 1996, nuestro grupo de investigación [4] (Universidad de Granada, España) publicaron la determinación del ácido  $\beta$ -naftoxiacético utilizando TX-100 como medio micelar a una concentración 15 veces inferior a su concentración micelar crítica. Dos años más tarde, este grupo de investigación comprobó que era posible establecer métodos analíticos fosforescentes en disolución para la determinación de varios derivados del naftaleno utilizando exclusivamente diferentes sales de átomos pesados (KI y  $\text{TlNO}_3$ ) como favorecedores del cruzamiento entre sistemas y sulfito sódico como agente desoxigentante, sin necesidad de utilizar medios organizados, denominando a la metodología *Fosforescencia a Temperatura Ambiente Inducida por Átomo Pesado* ("Heavy Atom Induced Room Temperature Phosphorescence", HAI-RTP) [5]. Se estudiaron, además del ácido  $\beta$ -naftoxiacético, otros dos compuestos derivados del

---

4. A. Segura Carretero, C. Cruces Blanco, A. Fernández Gutiérrez. *Talanta* 43 (1996) 1001.

5. A. Segura Carretero, C. Cruces Blanco, B. Cañabate Díaz, A. Fernández Gutiérrez. *Anal. Chim. Acta*, 361 (1998) 217.



naftaleno como la nafazolina y acenafteno estableciéndose para los tres las condiciones experimentales óptimas de la emisión fosforescente. Se probaron diferentes sales de átomos pesados (KI, NaI, KBr, NaBr, KCl, TlNO<sub>3</sub>, Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> y AgNO<sub>3</sub>) a varios niveles de concentración, concluyendo que la sal de átomo pesado más adecuada para el ácido β-naftoixiacético y acenafteno era TlNO<sub>3</sub> en concentraciones 0.25 y 0.05 M, respectivamente. Sin embargo, para la nafazolina se obtenían mejores resultados utilizando KI a una concentración de 1.0 M. Estos autores propusieron tres métodos analíticos con unos límites de detección de 167, 44 y 65 ng/mL para ácido β-naftoixiacético, nafazolina y acenafteno, respectivamente.

Este trabajo demostró que la metodología era aplicable a diferentes naftalenos sustituidos y confirmó la posibilidad de utilización de otra sales de átomos pesados, en concreto el KI frente al TlNO<sub>3</sub> muy utilizado, sobre todo en metodologías con medios micelares, aunque presente graves problemas de toxicidad.

De forma paralela y siguiendo en esta misma línea de ampliar el número de compuestos que ofrecían señal fosforescente en estas condiciones, Li y col. [6] publicaron un trabajo en donde además de denominar por primera vez a la metodología como *fosforescencia a temperatura ambiente en medios no protegidos* ("Non-Protected Fluid Room Temperature Phosphorescence", NP-RTP) ensayaron 26 derivados del naftaleno con diferentes sustituyentes, comprobando que la mayoría de ellos emitían señales fosforescentes en presencia siempre de TlNO<sub>3</sub> y sulfito sódico (Tabla 1). Los autores concluyeron que la emisión fosforescente en estas condiciones experimentales es una característica regular de los derivados naftalénicos. También realizaron una serie de consideraciones sobre el efecto de la estructura química del naftaleno y de los sustituyentes en la naturaleza del estado triplete más bajo. Los fosforóforos con grupos sustituyentes electrón donantes, particularmente los que tienen electrones *n*, tienden a aumentar la fosforescencia ya que aumentan la movilidad electrónica en el anillo naftalénico. Los sustituyentes con carga negativa, al pH de trabajo, también aumentan la señal fosforescente puesto que permiten un mayor acercamiento del átomo pesado perturbador, Tl<sup>+</sup>, a la estructura aromática favoreciéndose el cruce entre sistemas. Los compuestos con átomos pesados como sustituyentes también presentaron una intensidad de fosforescencia relativamente elevada. Por último, en los compuestos con grupos sustituyentes del tipo -NO u -OH, no se observaron señales analíticamente útiles.

---

6. L.D .Li, Y. Zhao, Y.G. Wu, A.J. Tong. *Talanta*, 46 (1998) 1147.

## 2. DENOMINACIÓN DE LA METODOLOGÍA

Aunque el fin conseguido por los dos grupos de investigación anteriormente mencionados ha sido el mismo, la denominación de esta nueva metodología ha sido diferente. Así, el grupo de investigación de la Universidad de Tsing Hua la ha denominado *fosforescencia a temperatura ambiente en medios no protegidos* [6], mientras que el de la Universidad de Granada la ha denominado *fosforescencia a temperatura ambiente inducida por átomo pesado* [5].

De este primer nombre (NP-RTP) se entiende que han considerado a la nueva metodología con claras referencias a las anteriores metodologías fosforescentes en disolución con la única finalidad de crear una distinción entre ellas, sin considerar el verdadero principio de la aparición de la emisión fosforescente (la presencia de sulfito sódico y relativamente elevadas concentraciones de átomo pesado). Por lo tanto parece más aconsejable el segundo nombre propuesto (HAI-RTP), ya que describe mejor el aspecto básico de que *la fosforescencia está inducida por la presencia de átomo pesado*. De hecho no se observan señales en ausencia total de átomo pesado en ninguno de los casos anteriormente descritos, incluso utilizando sulfito sódico como desoxigenante.

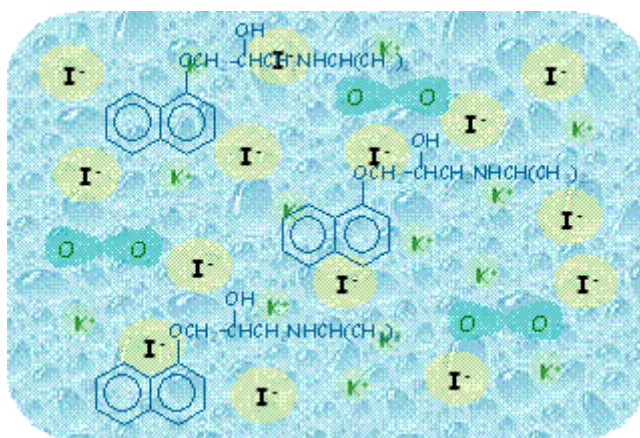
En cualquier caso, esta metodología supone una innovación metodológica en la obtención de señales fosforescentes en disolución, tal y como se demuestra en los trabajos anteriormente descritos. Por lo tanto, se puede considerar la aparición de una metodología alternativa a las ya existentes en disolución. No obstante, esta realidad puede sugerir clasificar las metodologías fosforescentes en disolución, subdividiéndolas en las desarrolladas mediante el uso de medios organizados y sin medios organizados. Dentro de la primera se situaría la MS-RTP, ME-RTP y la CD-RTP, mientras que en la segunda estarían la fosforescencia sensibilizada y la HAI-RTP. Nos parece, por tanto, mucho más adecuado este segundo nombre para esta metodología.

## 3. JUSTIFICACIÓN TEÓRICA

La justificación teórica de esta nueva metodología se fundamenta en dos hechos básicamente: los aspectos químico-físicos relacionados con la emisión fosforescente en presencia de sulfito sódico y relativamente elevadas concentraciones de sales de átomos pesados y por las mejoras instrumentales de los últimos años.

El acoplamiento espín-orbital se ve favorecido por la presencia de campos magnéticos nucleares. La presencia de especies como átomos pesados con gran carga nuclear genera un elevado campo magnético que en las cercanías de una molécula incrementa, de forma directa, el cruce entre sistemas y de forma indirecta, la emisión fosforescente. Este fenómeno fue observado por primera vez en compuestos orgánicos que tenían como sustituyentes distintos átomos pesados y se denominó *efecto de átomo pesado interno* [7]. Sin embargo, fue Kasha [8] en 1952 el primero en demostrar la perturbación de la emisión luminiscente por la presencia de un átomo pesado externo estudiando el efecto de la presencia de yoduro de etilo en la fosforescencia del 1-cloronaftaleno. Este fenómeno se denomina *efecto de átomo pesado externo* y se diferencia del anterior en que los átomos pesados no están unidos químicamente al compuesto de interés.

El hecho de que se puedan observar señales fosforescentes analíticamente útiles se debe, en gran medida, a la presencia de relativamente elevadas concentraciones de átomo pesado en las cercanías de la molécula lo que favorece de manera sustancial el rendimiento cuántico de fosforescencia (Figura 1).



**Figura 1. Esquema básico la fosforescencia a temperatura ambiente inducida por átomos pesados**

La magnitud del acoplamiento entre los momentos magnéticos del electrón y del núcleo del átomo pesado depende de la distancia entre ambos sistemas. En medios micelares, esta distancia está impuesta por la longitud de las cadenas de los agentes micelares (Figura 2), la cual es del orden de los 8-17 Å, dependiendo del

7. D. McClure. *J. Chem. Phys.*, 17 (1949) 905.

8. M. Kasha. *J. Chem. Phys.*, 20 (1952) 71.

agente micelar utilizado, sin embargo en esta nueva metodología esa distancia se minimiza favoreciendo el cruzamiento entre sistemas.

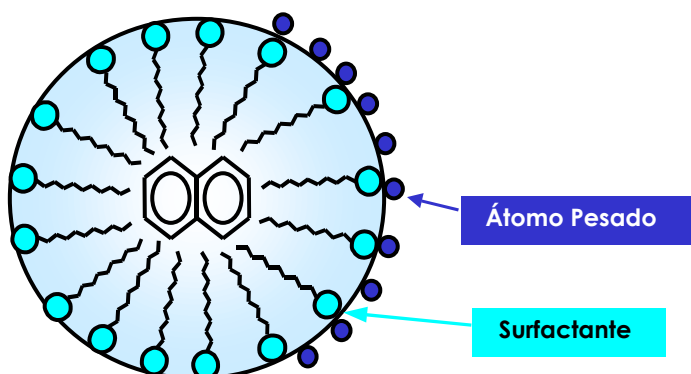


Figura 2. Esquema básico de la fosforimetría en medio micelar

En la fosforescencia inducida por átomos pesados, la falta de viscosidad de los medios (al no utilizar medios organizados) provoca un aumento evidente de la constante de desactivación bimolecular ( $k_{PQ}$ ) y por lo tanto, una disminución del rendimiento cuántico de fosforescencia.

El rendimiento cuántico de fosforescencia es inversamente proporcional a la concentración de los atenuadores que afectan a la desactivación luminiscente. El oxígeno tal y como se comentó en la introducción general es uno de los más eficaces atenuadores del estado triplete, tanto que este fenómeno ha sido propuesto como método para monitorizar la difusión del oxígeno y del aire en varios materiales [9-11]. La atenuación o fenómeno de "quenching" por parte del oxígeno se observa tanto en la emisión fluorescente como fosforescente, aunque la disminución de la intensidad de emisión es más drástica en la fosforescencia debido a que el tiempo de vida del estado triplete es mayor que el del estado singlete.

Sin embargo, este inconveniente se ve suplido por una mayor cercanía de los átomos pesados a las estructuras fosforescentes del analito, con lo que el acoplamiento espín orbital se favorece y, en consecuencia, el rendimiento cuántico de la emisión fosforescente aumenta.

Por otro lado, desde el punto de vista práctico, las mejoras instrumentales en los

- 
9. S. Czarniecki, M. Kryszewski. *J. Polymer. Sci.*, 1A (1963) 3067.
  10. L. Yi Ming, R. Pereiro García, M.J. Valencia González, M.E. Díaz García, A. Sanz-Medel. *Anal. Chem.*, 66 (1994) 836.
  11. R. Badía, M.E. Díaz García, A. Sanz-Medel. *Mikrochim. Acta*, 121(1995) 51.

Últimos años han permitido medir señales cada vez menos intensas en magnitud y discriminarlas fácilmente del ruido de fondo. El desarrollo de nueva instrumentación en la década de los 70, como la aparición de las lámparas de pulso, permitió un gran avance en los estudios de la fosforimetría en disolución [12]. Por otro lado, el papel de la electrónica moderna en el desarrollo de la luminiscencia molecular, más evidente en los últimos 40 años, ha supuesto un gran desarrollo de la instrumentación controlada por microprocesadores y de detectores multidimensionales y ésta ha sido, a su vez, la consecuencia de los avances en la ingeniería electrónica [13].

#### 4. DESARROLLO EXPERIMENTAL DE LA METODOLOGÍA

El desarrollo instrumental como única justificación de la observación de señales fosforescentes en disolución sin necesidad de utilizar medios organizados queda refrendada en la observación de fosforescencia de compuestos con átomo pesado interno en presencia exclusivamente de  $\text{Na}_2\text{SO}_3$ . Así, Mou y col. [14] han puesto de manifiesto que es posible obtener señales fosforescentes del  $\beta$ -Br-naftaleno en disolución acuosa sin medios organizados utilizando únicamente sulfito sódico como desoxigenante. Además, estos autores indican que el sistema es muy sensible a la adición de diferentes disolventes orgánicos, describiendo que es posible desarrollar un método en presencia de un 2.5% de acetonitrilo obteniendo un límite de detección de  $4.7 \times 10^{-8}$  M, aunque en este caso se necesita un pequeño tiempo de pre-irradiación de las muestras antes de conseguir la estabilización de la señal.

En esta línea de desarrollo de la metodología, estos mismos autores han estudiado el efecto de los sustituyentes en la fosforescencia a temperatura ambiente del sulfonato de naftilamina en medios no protegidos [15]. Así, indican que para determinados derivados como el 1-amino-4-naftalenosulfonato sódico (1,4-ANS), 1-amino-5-naftalenosulfonato sódico (1,5-ANS) y 2-amino-1-naftalenosulfonato sódico (2,1-ANS) se obtiene una señal fosforescente intensa y estable usando  $\text{TlNO}_3$  como átomo pesado y sulfito sódico como desoxigenante. Para los tres derivados es necesario irradiar las disoluciones durante un corto periodo de tiempo, siendo los

- 
12. R.J. Hurtubise. "Phosphorimetry: Theory, instrumentation and applications", VCH, New York (1990).
  13. G.W. Ewing. "Analytical instrumentation handbook", 2<sup>nd</sup> edn. M. Dekker, New York (1997).
  14. L. Mou, X.K. Chen, L.D. Li. *Chem. J. Chinese U.*, 20 (1999) 214.
  15. L. Mou, X.L. Chen, L.D. Li. *Chinese J. Anal. Chem.*, 27 (1999) 509.

límites de detección obtenidos  $3.8 \times 10^{-9}$ ,  $1.4 \times 10^{-7}$  y  $2.8 \times 10^{-8}$  M para 1,4-ANS, 1,5-ANS y 2,1-ANS, respectivamente. Bajo estas mismas condiciones, los derivados 1-amino-2-naftalenosulfonato sódico y 2-amino-8-naftalenosulfonato sódico no emiten señal fosforescente, pudiendo concluir que la posición de los sustituyentes tiene un importante efecto sobre la emisión fosforescente, cuando no se usan medios organizados.

Un método simple y rápido para la determinación de  $\alpha$ -naftaleneacetamida ha sido propuesto por el nuestro grupo [16]. En él se estudiaron el efecto de 15 sales de átomo pesado (KI, KBr, NaBr, NaI, RbCl, CsCl, KCl,  $\text{Cr}(\text{NO}_3)_3$ ,  $\text{CeCl}_3$ ,  $\text{InCl}_3$ ,  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ ,  $\text{La}(\text{NO}_3)_3$ ,  $\text{TlNO}_3$ ,  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  y  $\text{AgNO}_3$ ) concluyendo que sólo con KI se obtienen señales fosforescentes analíticamente útiles de la  $\alpha$ -naftaleneacetamida. También se estableció la concentración de sulfito sódico en  $1.5 \times 10^{-3}$  M como valor óptimo que hace posible obtener señales instantáneas. De esta forma, se desarrolla un método de determinación de este derivado naftalénico que presenta un límite de detección de 7.8 ng/mL.

Hasta ahora los métodos fosforimétricos desarrollados por el grupo de investigación de la Universidad de Tsing Hua habían utilizado exclusivamente  $\text{TlNO}_3$  como átomo pesado [2,6,14,15]. No obstante, y tal como se ha recogido previamente, es posible utilizar otros tipos de sales de átomo pesado para favorecer el cruzamiento entre sistemas [5,16-18]. Así, estos autores estudiaron la influencia de diferentes sales de átomo pesado y diferentes disolventes orgánicos sobre la emisión fosforescente del ácido  $\alpha$ -naftaleniloxiacético, concluyendo que era posible obtener señales fosforescentes de este compuesto usando  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  en presencia de KI o  $\text{TlNO}_3$  como átomos pesados y hablando, por primera vez, de elección de átomo pesado [19]. Observaron que se producían diferencias significativas entre las longitudes de onda (sobre todo de excitación) dependiendo del tipo de átomo pesado utilizado, 287 nm cuando se utilizó KI y 297 nm cuando se utilizó  $\text{TlNO}_3$ . Aunque la señal fosforescente es más baja para KI, las mejores características analíticas se obtuvieron usando esta sal como átomo pesado. Como en trabajos anteriores, la conclusión sobre la adición de disolventes orgánicos es que afectan tanto a la intensidad de la señal como al tiempo

- 
16. C. Cruces Blanco, A. Segura Carretero, M.I. Ramírez García, A. Fernández Gutiérrez. *Inter. J. Environ. Anal. Chem.*, 75 (1999) 377.
  17. A. Segura Carretero, C. Cruces Blanco, A. Fernández Gutiérrez. *J. Agric. Food Chem.*, 46 (1998) 3683.
  18. A. Fernández Gutiérrez, A. Segura Carretero, B. Cañabate Díaz, C. Cruces Blanco. *Applied Spectrosc.*, 53 (1999) 741.
  19. X.K. Chem, L. Mou, L.D. Li. *Chem. J. Chinese U.*, 20 (1999) 1052.

de estabilización de la misma.

Hasta este momento, el número de compuestos que presentaban emisión fosforescente en las condiciones experimentales de esta metodología, estaba reducido a derivados del naftaleno, de hecho se pensaba que esta propiedad era exclusiva de estructuras naftalénicas. En Julio del año 2000 el nuestro grupo, publicó un trabajo donde se amplió considerablemente el campo de aplicación de esta metodología estudiando no sólo nuevos naftalenos sustituidos sino diferentes heterociclos nitrogenados de las familias de los benzimidazoles, carbazoles, indoles y acridinas y el hidrocarburo aromático policíclico, fluoreno, observando que también emitían señales fosforescentes en las condiciones de la fosforescencia a temperatura ambiente inducida por átomos pesados [20].

En este trabajo se discutieron las características fosforescentes a temperatura ambiente de compuestos orgánicos mediante la metodología HAI-RTP (longitudes de onda máximas de excitación y emisión y tiempos de vida), así como las condiciones de obtención de dichas señales fosforescentes (tipo y concentración de átomo pesado y concentración de desoxigenante) y las posibilidades de desarrollo de métodos analíticos (Tabla 1).

Los autores también establecieron una serie de consideraciones generales sobre el efecto del tipo y concentración de átomo pesado sobre la emisión fosforescente de los distintos fosforóforos, así como de la influencia del sulfito sódico sobre el tiempo de estabilización de la señal y la intensidad de la misma [20].

En el año 2000 un nuevo grupo de investigación español (Universidad de Castilla La Mancha) propuso un método para la determinación del ácido 1-naftoxiláctico [21] que se basa en la obtención de señales fosforescentes ( $\lambda_{exc/em}$  295/491,527 nm) de este metabolito del propranolol en presencia de una concentración  $6.5 \times 10^{-2}$  M de  $TiNO_3$  como átomo pesado y de  $1.5 \times 10^{-2}$  M de  $Na_2SO_3$  como desoxigenante sin la utilización de medios protectores y ajustando el pH a 7.5 mediante el empleo de una disolución reguladora de dihidrógeno fosfato sódico e hidrógeno fosfato sódico. En las condiciones optimizadas se consigue un límite de detección de 9.6 ng/mL.

---

20. A. Segura Carretero, C. Cruces Blanco, B. Cañabate Díaz, J.F. Fernández Sánchez, A. Fernández Gutiérrez. *Anal. Chim. Acta*, 417 (2000) 19.

21. J.A. Murillo Pulgarín, A.A. Molina. *Fresenius J. Anal. Chem.*, 368 (2000) 505.

Con objeto de ampliar el campo de aplicación de la metodología, Li *et al.* han realizado estudios sobre diferentes hidrocarburos aromáticos policíclicos [22]. Estos autores han descrito que es posible obtener una señal fosforescente intensa y estable de fluoreno y acenafteno en disolución acuosa al 1% de acetonitrilo, usando exclusivamente sulfito sódico como desoxigenante y KI como átomo pesado. Han establecido dos métodos analíticos para ambos hidrocarburos con unos límites de detección de  $8.6 \times 10^{-8}$  y  $9.0 \times 10^{-8}$  M para fluoreno y acenafteno, con una desviación estándar relativa de 2.4 y 3.5 % respectivamente, para una concentración de  $1.2 \times 10^{-5}$  M.

Para establecer las diferencias en las propiedades fosforescentes de dos isómeros de posición (1 y 2) derivados del naftaleno, estos mismos autores han realizado una comparación entre las señales fosforescentes de los ácidos  $\alpha$ - y  $\beta$ -naftiloxiacético [23]. Ambos ácidos,  $\alpha$ - y  $\beta$ -, emiten señales intensas de fosforescencia en ausencia de medios organizados y en presencia de KI o  $\text{TINO}_3$  y  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  como desoxigenante lo cual permite proponer dos métodos analíticos en función del tipo de átomo pesado para cada compuesto, presentando unos límites de detección de  $1.0 \times 10^{-8}$  y  $1.0 \times 10^{-8}$  M para el  $\alpha$ - y  $1.2 \times 10^{-8}$  y  $1.1 \times 10^{-8}$  M para el  $\beta$ -naftiloxiacético, respectivamente. El tipo y cantidad de disolvente orgánico no sólo afecta a la intensidad y estabilización de la señal sino también a la selección del átomo pesado. En ambos casos, la intensidad de fosforescencia de los sistemas utilizando  $\text{TINO}_3$  es más intensa que con KI pero los límites de detección son comparables y además, aunque la emisión fosforescente del  $\beta$ -naftiloxiacético es más baja que la del  $\alpha$ -naftiloxiacético, la influencia de los disolventes orgánicos sobre ésta es también menor.

Este grupo de investigación ha investigado también la emisión fosforescente del pireno en disoluciones no protegidas y de un excímero con fluorescencia retrasada estableciendo las longitudes de onda de emisión a 596 y 475 nm respectivamente, a una longitud de onda de excitación de 330 nm y estudiando la influencia de la presencia de KI o  $\text{TINO}_3$  en el proceso fotofísico [24]. También han establecido un método analítico para la determinación de pireno usando como concentraciones óptimas de trabajo 0.01 M para  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  y 0.0951 M para  $\text{TINO}_3$ , consiguiendo un límite de detección de  $2 \times 10^{-8}$  M.

---

22. L.D. Li, L. Mou, X.K. Chen. *Chem. J. Chinese U.*, 21 (2000) 1040.

23. L.D. Li, X.K. Chen, L. Mou, W.Q. Long, A.J. Tong. *Anal. Chim. Acta*, 424 (2000) 177.

24. L.D. Li, Z.X. Zhang, W.Q. Long, A.J. Tong. *Spectrochim. Acta A*, 57 (2001) 385.



Murillo y col. han publicado la determinación directa de naftopidilo (4-2-metoxifenil)- $\alpha$ -[1-naftaleniloxi)metil]-1-piperazinaetanol) mediante esta metodología [25]. El método está basado en la obtención de señal fosforescente de este compuesto antihipertensivo usando  $\text{TlNO}_3$  (0.085 M) como átomo pesado y  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  (0.05 M) como desoxigentante. Bajo estas condiciones y excitando a 296 nm aparece una señal fosforescente tres minutos después de comenzar a irradiar a 526 nm. La optimización de estas condiciones experimentales permiten establecer un método que presenta un límite de detección de 21 ng/mL.

Las características fosforescentes de la fenantrina han sido investigadas por Chen y col. [26], los cuales describen la emisión fosforescente de este compuesto a 482 y 504 nm excitando a 283 nm, en presencia exclusivamente de sulfito sódico como desoxigentante y KI como átomo pesado, estableciendo un método cuyo límite de detección es de  $2.6 \times 10^{-8}$  M.

Basándose en un trabajo anterior donde los autores describieron la fosforescencia de diversos derivados del naftaleno [6], se establecen las constantes de velocidad fotofísicas fosforescentes de varios de estos derivados ya que la determinación de los parámetros cinéticos de los procesos luminiscentes son importante para conocer el fenómeno fosforescente y la influencia del tipo y concentración de átomo pesado [27]. Así, establecen el valor del parámetro vida media y de diferentes constantes de velocidad ( $k_p$ ) a diferentes valores de concentración de KI y  $\text{TlNO}_3$ , estudiando la relación entre ambas variables.

HAI-RTP ha sido aplicada también para la determinación del naftopidilo en fluidos biológicos [28]. Utilizando como átomo pesado el KI en una concentración de 1.4 M, y 0.005 M de  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  a un pH de 6.5. El método fue aplicado con éxito al análisis del naftopidilo en muestras de orina y suero humano, con unas recuperaciones del  $104.0 \pm 0.6\%$  y  $106.0 \pm 1.0\%$  respectivamente.

Un método directo y simple para la determinación de propanolol fue propuesto por Long y col., quienes utilizaron KI como átomo pesado y sulfito sódico como desoxigenante. Estudiaron el efecto de la concentración de KI en el tiempo de vida y calcularon los parámetros cinéticos. El método fue aplicado satisfactoriamente a la

---

25. J.A. Murillo Pulgarín, A.A. Molina, M.T.A. Pardo. *Analyst*, 126 (2001) 234.

26. X.K. Chen, L. Mou, L.D. Li. *Spectroscopy and Spectral Anal.*, 21 (2001) 215.

27. L.D. Li, W.Q. Long, A.J. Tong. *Spectrochim. Acta A*, 57 (2001) 1261.

28. J.A. Murillo Pulgarín, A.A. Molina, M.A.T. Pardo. *Fresenius J. Anal. Chem.*, 371 (2001) 903.

determinación de esta droga en orina y producto comercial, con unas recuperaciones bastante buenas [29].

Chen y col. [30] estudiaron las propiedades fluorescentes, NP-RTP y reconocimiento de cationes del ácido diacético 1-naftilamina con  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$  y  $\text{Tl}^+$ . Los máximos de excitación y emisión fosforescentes se establecen en 321/571 nm, usando  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  como desoxigenante y  $\text{TlNO}_3$  como átomo pesado.

El método simplex modificado ha sido aplicado a la determinación de las variables que afectan a la emisión fosforescente, determinando el naftopidilo en orina y suero [31]. Las condiciones óptimas fueron 1.4 M de KI como átomo pesado, 0.0075 M de  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  como desoxigenante y 0.05 M de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$  como disolución reguladora. Las recuperaciones fueron de  $103.8 \pm 0.8\%$  en orina y de  $99.5 \pm 0.5\%$  en suero, mejores resultados que los obtenidos aplicando el método HAI-RTP con una optimización univariante clásica. Este mismo grupo estudio las condiciones experimentales para la determinación de la 4-metilpropranolol en fluido cerebrospinal, suero y orina [32]. El límite de detección acorde con la teoría de propagación fue de 6.2 ng/mL.

Un método para la determinación de carbaril fue desarrollado utilizando KI como átomo pesado y sulfito sódico como desoxigenante, estudiando como influye la concentración de KI en el tiempo de vida. Obteniendo un límite de detección de 0.9 ng/mL. El método fue aplicado satisfactoriamente a muestras de suelo [33].

Un método para la determinación de propranolol fue propuesto por nuestro grupo [34]. Utilizando como longitudes de onda de excitación y emisión de 294 y 492 nm respectivamente, utilizando KI como átomo pesado y sulfito sódico como desoxigenante, el límite de detección del método es 14.4 ng/mL, y fue aplicado con éxito a la determinación en un producto farmacéutico y validado mediante el método de adición de patrón.

---

29. W.Q. Long, Z.X. Zhang, L.D. Li. *Spectrochim. Acta A*, 58 (2002) 2185.

30. X.K. Chen, L.D. Li. *Chinese J. Anal. Chem.*, 30 (2002) 897.

31. J.A. Murillo Pulgarín, A.A Molina, M.A.T. Pardo. *Talanta*, 57 (2002) 795.

32. J.A. Murillo Pulgarín, A.A Molina, M.A.T. Pardo. *Anal. Biochem.*, 306 (2002) 270.

33. W.P. Long, L.D. Li, A.J. Tong. *Chinese J. Anal. Chem.*, 30 (2002) 1201.

34. B. Cañabate Díaz, C. Cruces Blanco, A. Segura Carretero, A. Fernández Gutiérrez. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 30 (2002) 987.

La determinación del aminoácido triptófano y la amina biogénica triptamina se ha llevado a cabo en matrices reales complejas [35]. El método fue aplicado con éxito a la determinación de triptófano en yogures naturales y de triptamina en muestras de cerveza.

También este mismo grupo estudió el efecto de distintos sustituyentes en la emisión fosforescente del fluoreno [36].

Recientemente se ha publicado una comparativa entre la utilización de la metodología HAI-RTP para la determinación de la nafcilina y el acoplamiento de esta a un sistema automatizado de inyección en flujo [37]. Obteniendo unos límites de detección de  $7.7 \times 10^{-8}$  M para el método HAI-RTP y de  $3.6 \times 10^{-7}$  M para el método automatizado, con una DER de 2.1% para ambos métodos.

Se ha llevado a cabo una determinación simultánea de dos pesticidas como son el carbaril y el tiabendazol, con la ayuda de la derivada del espectro de fosforescencia total y un espectro sincrónico, obteniendo unos límites de detección de 1.4 ng/mL y 1.7 ng/mL para carbaril y tiabendazol respectivamente [38].

Recientemente se ha realizado una aplicación de esta metodología a la determinación de carbazol en muestras de antraceno, utilizando como átomo pesado KI y desoxigenando con sulfito sódico [39].

El último artículo publicado ha sido el estudio de los disolventes orgánicos sobre la emisión fosforescente del 2-naftalensulfónico sódico [40].

- 
35. B. Cañabate Díaz, A. Segura Carretero, C. Cruces Blanco, A. Fernández Gutiérrez. *Analyst*, 128 (2003) 411.
  36. B. Cañabate Díaz, S.G. Schulman, A. Segura Carretero, A. Fernández Gutiérrez. *Anal. Chim. Acta*, 489 (2003) 165.
  37. A. Fernández Gonzalez, R. Badía, M.E. Díaz García. *Anal. Chim. Acta*, 498 (2003) 69.
  38. B. Cañabate Díaz, A. Segura Carretero, C. Cruces Blanco, A. Fernández Gutiérrez. *Appl. Spectrosc.*, 57 (2003) 1585.
  39. B. Cañabate Díaz, S.G. Schulman, A. Segura Carretero, C. Cruces Blanco, A. Fernández Gutiérrez. *Polycycl. Aromat. Compd.*, 24 (2004) 65.
  40. W.Q. Long. *Chin. J. Anal. Chem.*, 32 (2004) 693.

## 5. VENTAJAS Y LIMITACIONES FRENTE A OTRAS METODOLOGÍAS EN DISOLUCIÓN

El empleo de esta nueva metodología supone una simplificación frente a las otras metodologías fosforescentes en disolución, ya que la tríada compuesta por el medio organizado, átomo pesado y sulfito sódico, ha quedado minimizada al uso exclusivamente de átomo pesado y sulfito sódico. La metodología HAI-RTP presenta una amplia serie de ventajas frente a la MS, ME o CD-RTP que se pueden resumir en los siguientes apartados:

- ✓ Supone una simplificación metodológica de la técnica, con las consiguientes mejoras en la calidad de parámetros analíticos tales como límite de detección, precisión y sensibilidad. De hecho la fosforimetría frente a la fluorimetría mejora en varios aspectos como precisión y sencillez si se tiene en cuenta a esta nueva metodología.
- ✓ Asimismo, esta simplificación supone un menor coste económico y de tiempo (tiempos de análisis más cortos).
- ✓ Las cinéticas de desoxigenación en disoluciones acuosas basadas en la utilización del sulfito sódico son prácticamente instantáneas a concentraciones de sulfito sódico muy bajas (del orden 4-10 mM). En las otras metodologías basadas en el uso de micelas, microemulsiones y sobre todo ciclodextrinas es necesario un determinado tiempo para que el oxígeno difunda desde el interior del agregado hasta la disolución para reaccionar con el desoxigenante. En cambio, con la metodología HAI-RTP la desaparición del oxígeno es instantánea a concentraciones de  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  óptimas, ya que el oxígeno de la disolución acuosa sin ningún tipo de protección, reacciona de forma prácticamente instantánea con el sulfito sódico.
- ✓ Es posible adicionar pequeños porcentajes de disolventes orgánicos (etanol, metanol, acetonitrilo...), sin perturbar demasiado las características analíticas de los métodos y ampliando el campo de aplicación de la metodología, aunque ello obliga a un pequeño tiempo de pre-irradiación de las muestras para su desoxigenación.
- ✓ Permite trabajar a bajas temperaturas, cercanas a 0 °C ya que no existen problemas de solubilidad y precipitación de medios organizados, siendo las disoluciones transparentes y estables.

Esta metodología convierte a la fosforimetría en una poderosa herramienta como técnica de detección en cromatografía líquida, análisis por inyección en flujo y electroforesis capilar ya que los sistemas son transparentes y estables, lo que hace posible asociar la HAI-RTP con estas técnicas analíticas y llevar a cabo procesos de análisis en línea.

No obstante, la metodología HAI-RTP también presenta una serie de desventajas frente a otras metodologías:

- A pesar de trabajar a concentraciones muy bajas (del orden de los ng/mL), el hecho de trabajar en medio acuoso limita la aplicabilidad a compuestos totalmente apolares.
- Aunque el campo de aplicación, cada día es mayor, hasta este momento, éste es bastante reducido.

Tabla A.1. Nombre (abreviatura), características espectroscópicas, condiciones experimentales y límites de detección de métodos propuestos para diferentes compuestos orgánicos estudiados

Compuesto	Características espectroscópicas		Condiciones experimentales			Límite de detección (ng/mL)	Referencia
			Átomo pesado perturbador		[Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> ] (M)		
	Longitudes de onda (nm)	Vida media (μs)	Tipo	Concentración (M)			
Acenafteno	290/500	307	TiNO <sub>3</sub>	0.050	0.0100	65.0 <sup>(1)</sup>	[6]
	286/493,520	-	KI	-	-	13.9 <sup>(2)</sup>	[22]
Ácido diacético 1-naftilamina	321/571	-	TiNO <sub>3</sub>	-	-	1.2×10 <sup>-8</sup> M	[30]
Ácido 1-hidroxi-2-naftanoico	340/510	240	TiNO <sub>3</sub>	0.050	0.0100	28.2 <sup>(2)</sup>	[6]
Ácido 3-indol butírico (IBA)	288/458	145	KI	1.6	0.0015	24.9 <sup>(1)</sup>	[20]
Ácido α-naftilacético (NAA)	290/495,523	418	TiNO <sub>3</sub>	0.050	0.0100	109.9 <sup>(2)</sup>	[6]
	292/490,520	236	TiNO <sub>3</sub>	0.025	0.0015	14.6 <sup>(1)</sup>	[20]
Ácido α-naftoxiacético (α-NOA)	312/499,525	324	TiNO <sub>3</sub>	0.050	0.0100	-	[6]
	287/495,521	-	KI	-	-	-	[19]
	297/494,521	-	TiNO <sub>3</sub>	-	-	-	[19]
	287/524	350	KI	0.3	0.0100	2.0 <sup>(2)</sup>	[23]
Ácido β-naftoxiacético (β-NOA)	297/494,522	340	TiNO <sub>3</sub>	0.040	0.0100	2.0 <sup>(2)</sup>	[23]
	336/500	307	TiNO <sub>3</sub>	0.250	0.0100	167.0 <sup>(1)</sup>	[5]
	286,323/505,534	332	TiNO <sub>3</sub>	0.050	0.0100	-	[6]

**Tabla A.1. Nombre (abreviatura), características espectroscópicas, condiciones experimentales y límites de detección de métodos propuestos para diferentes compuestos orgánicos estudiados (continuación)**

Ácido $\beta$ -naftoxiacético ( $\beta$ -NOA)	277,320/503,530	670	KI	0.4	0.0100	2.4 <sup>(2)</sup>	[23]
	284,322/503,529	1230	TINO <sub>3</sub>	0.050	0.0100	2.2 <sup>(2)</sup>	[23]
Ácido 1-naftoxiláctico (NA)	295/491,527	-	TINO <sub>3</sub>	0.065	0.0150	9.6 <sup>(2)</sup>	[21]
1-Amino-4-naftalenosulfonato sódico (1,4-ANS)	-	-	TINO <sub>3</sub>	-	-	0.8 <sup>(2)</sup>	[25]
1-Amino-5-naftalenosulfonato sódico (1,5-ANS)	331/534	464	TINO <sub>3</sub>	0.050	0.0100	9.3 <sup>(2)</sup>	[6]
	-	-	TINO <sub>3</sub>	-	-	31.3 <sup>(2)</sup>	[15]
1-Amino-7-naftalenosulfonato sódico (1,7-ANS)	-	-	TINO <sub>3</sub>	-	-	-	[15]
2-Amino-1-naftalenosulfonato sódico (2,1-ANS)	-	-	TINO <sub>3</sub>	-	-	6.3 <sup>(2)</sup>	[15]
2-Amino-8-naftalenosulfonato sódico (2,8-ANS)	-	-	TINO <sub>3</sub>	-	-	-	[15]
Antraceno	-	-	TINO <sub>3</sub>	0.050	0.0100	-	[6]
$\alpha$ -Bromo naftaleno (alfa-BrN)	299/523,540	446	TINO <sub>3</sub>	0.050	0.0100	-	[6]
$\beta$ -Bromonaftaleno (beta-BrN)	275/494,518	-	TINO <sub>3</sub>	0.050	0.0100	9.7 <sup>(2)</sup>	[14]
Carbaril (CBL)	285/495,523	520	KI	1.4	0.0015	0.9 <sup>(1)</sup>	[33]
	288/488,526	180	KI	1.4	0.0015	1.4 <sup>(1)</sup>	[20,38]
Carbazol (CBZ)	290/440	255	KI	0.6	0.0020	3.8 <sup>(1)</sup>	[20,39]
Clorhidrato de 1-naftilamina	325/545	279	TINO <sub>3</sub>	0.050	0.0100	-	[6]
$\alpha$ -Cloro naftaleno	300/525	398	TINO <sub>3</sub>	0.050	0.0100	-	[6]
Cloruro de dansilo	326/574	-	TINO <sub>3</sub>	0.050	0.0100	5.1 <sup>(2)</sup>	[3]
	328/574	541	TINO <sub>3</sub>	0.050	0.0100	-	[6]

**Tabla A.1. Nombre (abreviatura), características espectroscópicas, condiciones experimentales y límites de detección de métodos propuestos para diferentes compuestos orgánicos estudiados (continuación)**

Cloruro de dansilo hidroxilado (DNS-OH)	330/579	-	TiNO <sub>3</sub>	0.050	0.0100	-	[3]
Dansilamida (DNSD)	334/620	222	TiNO <sub>3</sub>	0.200	0.0100	85.7 <sup>(1)</sup>	[20]
Dansil amida	331/591	778	TiNO <sub>3</sub>	0.050	0.0100	-	[6]
Derivado dansilado de ácido aspártico (DNS-Asp)	331/590	364	TiNO <sub>3</sub>	0.050	0.0100	-	[3]
Derivado dansilado de alanina (DNS-Ala)	330/593	409	TiNO <sub>3</sub>	0.050	0.0100	-	[3]
Derivado dansilado de arginina (DNS-Arg)	330/589	60	TiNO <sub>3</sub>	0.050	0.0100	-	[3]
Derivado dansilado de asparagina (DNS-Asn)	329/587	500	TiNO <sub>3</sub>	0.050	0.0100	-	[3]
Derivado dansilado de fenilalanina (DNS-Phe)	330/590	435	TiNO <sub>3</sub>	0.050	0.0100	-	[3]
Derivado dansilado de glutamina (DNS-Gln)	330/590	532	TiNO <sub>3</sub>	0.050	0.0100	-	[3]
Derivado dansilado de histidina (DNS-His)	331/594	455	TiNO <sub>3</sub>	0.050	0.0100	-	[3]
Derivado dansilado de leucina (DNS-Leu)	332/593	489	TiNO <sub>3</sub>	0.050	0.0100	-	[3]
Derivado dansilado de lisina (DNS-Lys)	332/596	608	TiNO <sub>3</sub>	0.050	0.0100	-	[3]
Derivado dansilado de metionina (DNS-Met)	333/596	548	TiNO <sub>3</sub>	0.050	0.0100	-	[3]
Derivado dansilado de serina (DNS-Ser)	330/593	383	TiNO <sub>3</sub>	0.050	0.0100	-	[3]
Derivado dansilado de treonina (DNS-Thr)	330/588	470	TiNO <sub>3</sub>	0.050	0.0100	-	[3]
Derivado dansilado de triptófano (DNS-Trp)	329/584	263	TiNO <sub>3</sub>	0.050	0.0100	-	[3]
Derivado dansilado de valina (DNS-Val)	333/591	498	TiNO <sub>3</sub>	0.050	0.0100	-	[3]
Fenantreno (FEN)	292/477	-	TiNO <sub>3</sub>	0.050	0.0100	-	[6]
Fenantrina	283/482,504	-	KI	-	-	2.6×10 <sup>-8</sup> M <sup>(2)*</sup>	[26]
Fluoreno (FLU)	295/450	130	TiNO <sub>3</sub>	0.050	0.0015	14.6 <sup>(1)</sup>	[20]



**Tabla A.1. Nombre (abreviatura), características espectroscópicas, condiciones experimentales y límites de detección de métodos propuestos para diferentes compuestos orgánicos estudiados (continuación)**

	285/467	-	KI	-	-	14.3 <sup>(2)</sup>	[22]
Ácido carboxílico-1-fluoreno	302/466	476	KI	1.4	0.0050	0.88 <sup>(1)</sup>	[36]
1-Aminofluoreno	287/460	286	KI	1.0	0.0020	1.41 <sup>(1)</sup>	[36]
2-Aminofluoreno	295/472	393	KI	1.4	0.0020	6.71 <sup>(1)</sup>	[36]
N,N-Dimetil 2-aminofluoreno	313/400	188	KI	0.6	0.0040	3.88 <sup>(1)</sup>	[36]
2-Acetilaminofluoreno	302/474	681	KI	1.8	0.0020	7.79 <sup>(1)</sup>	[36]
2,7-Diacetilaminofluoreno	321/486	1397	KI	1.8	0.0010	7.56 <sup>(1)</sup>	[36]
2,5-Diacetilaminofluoreno	308/492	1168	KI	1.8	0.0020	18.00 <sup>(1)</sup>	[36]
1-Hidroxifluoreno	285/459	667	KI	1.4	0.0020	1.78 <sup>(1)</sup>	[36]
Sal dipotásica del ácido disulfónico fluoreno 2,7	293/480	348	KI	0.6	0.0010	62.44 <sup>(1)</sup>	[36]
9-Hidroxi-4-metoxiacridina (HMA)	402/584	91	KI	1.0	0.0005	20.6 <sup>(1)</sup>	[20]
4-Metilpropranolol	300/537	-	KI	3.2	0.007	6.2	[32]
Nafazolina (NPZ)	288/488	632	KI	1.0	0.0100	44.0 <sup>(1)</sup>	[5,18]
Nafcilina	283/505	120	KI	1.0	0.0100	7.7×10 <sup>-8</sup> M	[37]
Nafronil (NFL)	292/492,524	156	KI	1.6	0.0020	11.7 <sup>(1)</sup>	[20]
Naftaleno (N)	296/482,512	-	TINO <sub>3</sub>	0.050	0.0100	-	[6]
α-Naftaleneacetamida (NAD)	292/492,540	251	KI	1.2	0.0015	7.8 <sup>(1)</sup>	[16]
	292/492,540	251	KI	1.2	0.0015	7.8 <sup>(1)</sup>	[20]
β-Naftalenosulfonato sódico	284/500,528	223	TINO <sub>3</sub>	0.050	0.0100	-	[6]
2-Naftalensufónico sódico	-	-	-	-	-	-	[40]

**Tabla A.1. Nombre (abreviatura), características espectroscópicas, condiciones experimentales y límites de detección de métodos propuestos para diferentes compuestos orgánicos estudiados (continuación)**

1-Naftilamina	326/546	352	TINO <sub>3</sub>	0.050	0.0100	-	[6]
Naftopidilo	296/494,526	475	TINO <sub>3</sub>	0.085	0.0085	21.0 <sup>(2)</sup>	[25]
			KI	1.4	0.0075		[28,31]
β-Naftol etil eter	324/507	408	TINO <sub>3</sub>	0.050	0.0100	-	[6]
Naproxeno (NAP)	334/510,540	1028	TINO <sub>3</sub>	0.200	0.0040	17.6 <sup>(1)</sup>	[20]
Pireno	334/600	-	TINO <sub>3</sub>	0.050	0.0100	-	[6]
	330/596	1330	KI	2.0	0.0100	-	[24]
	330/596	2230	TINO <sub>3</sub>	0.095	0.0100	4.0 <sup>(2)</sup>	[24]
Propranolol	288/494,522	-	KI	1.5	0.001	3×10 <sup>-8</sup> M	[29]
	294/492,526	1290	KI	3.6	0.005	14.4 <sup>(1)</sup>	[34]
Tiabendazol (TBZ)	300/488	89	KI	0.8	0.0010	1.7 <sup>(1)</sup>	[20,38]
Triptamina (TRYP)	284/452	90	KI	0.8	0.0030	19.7 <sup>(1)</sup>	[20,35]
Triptófano (TRP)	288/446	166	KI	1.0	0.0020	11.2 <sup>(1)</sup>	[20,35]

(1) Calculado por el método de calibración.

(2) Calculado por el método IUPAC.

## **CAPÍTULO A.1**

# **Determinación de principios activos de interés farmacológico mediante fosforescencia a temperatura ambiente inducida por átomos pesados**

El trabajo derivado del presente Capítulo han sido publicado en la revista "Analytical and Bioanalytical Chemistry 371 (2003) 1111" (ver ANEXO II).



## CAPÍTULO A.1

### DETERMINACIÓN DE PRINCIPIOS ACTIVOS DE INTERÉS FARMACOLÓGICO MEDIANTE FOSFORESCENCIA A TEMPERATURA AMBIENTE INDUCIDA POR ÁTOMOS PESADOS EN DISOLUCIÓN

<b>1. GENERALIDADES DEL DIPIRIDAMOL Y LA NAFCILINA .....</b>	<b>111</b>
1.1. Dipiridamol.....	111
1.1.1. Nomenclatura y estructura molecular .....	111
1.1.1. Propiedades y uso .....	111
1.1.1. Métodos de determinación del dipiridamol .....	112
1.2. Nafcilina.....	116
1.2.1. Nomenclatura y estructura molecular .....	116
1.2.2. Uso .....	116
1.2.3. Métodos de determinación de la nafcilina .....	117
<b>2. ESTUDIOS PRELIMINARES DE VARIABLES EXPERIMENTALES DEL DIPIRIDAMOL Y LA NAFCILINA .....</b>	<b>118</b>
<b>3. CARACTERÍSTICAS ESPECTROSCÓPICAS DEL DIPIRIDAMOL Y LA NAFCILINA .....</b>	<b>119</b>
3.1. Espectros de fosforescencia .....	119
3.2. Curva de decaimiento .....	121
<b>4. SELECCIÓN DE LOS PARÁMETROS INSTRUMENTALES DE MEDIDA DEL DIPIRIDAMOL Y LA NAFCILINA .....</b>	<b>122</b>
4.1. Optimización del voltaje del detector .....	122
4.2. Optimización del tiempo de demora e integración.....	123
4.3. Optimización del ancho de rendijas .....	124
<b>5. SELECCIÓN DE VARIABLES EXPERIMENTALES DEL DIPIRIDAMOL Y LA NAFCILINA.....</b>	<b>125</b>
5.1. Átomo pesado perturbador.....	125
5.2. Sistema de desoxigenación .....	126
5.3. Influencia de disolventes orgánicos .....	127
5.4. Influencia del pH .....	129
5.5. Estabilidad con el tiempo .....	130
<b>6. ESTABLECIMIENTO DE LOS MÉTODOS ANALÍTICOS.....</b>	<b>130</b>
6.1. Procedimiento operatorio .....	131
6.2. Recta de calibrado .....	131
6.3. Parámetros de fiabilidad .....	132

<b>7. APLICACIONES DEL MÉTODO PROPUESTO A LA DETERMINACIÓN DE DIPIRIDAMOL EN PREPARADOS FARMACÉUTICOS.....</b>	<b>132</b>
7.1. Método de adición de patrón .....	134

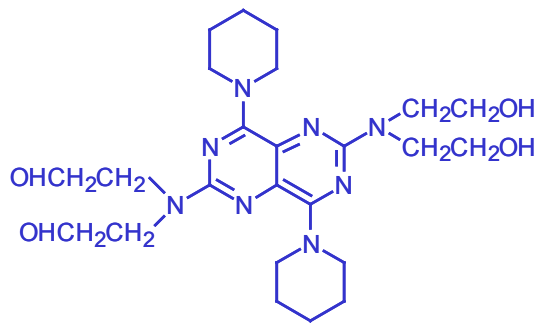
## 1. GENERALIDADES DEL DIPIRIDAMOL Y LA NAFCILINA

### 1.1. Dipiridamol

#### 1.1.1. Nomenclatura y estructura molecular

El dipiridamol, cuyo nombre IUPAC es 2,2'2'',2'''-[(4,8-dipiperinopirimido[5,4-d]pirimidino-2,6-diil)dinitrilo] tetraenol, es un vasodilatador coronario.

La fórmula molecular de este compuesto es  $C_{24}H_{40}N_8O_4$  tal y como se observa en la Figura A.1-1, posee un peso molecular de 504.62 g/mol.



**Figura A.1-1. Estructura molecular del dipiridamol**

#### 1.1.2. Propiedades y uso

Es un polvo cristalino intensamente amarillo, soluble en disoluciones ácidas cercanas a pH 3.3, metanol, etanol, acetona y cloroformo, y ligeramente soluble en, acetato de etilo, benceno y poco soluble en agua. Cristaliza en acetato de etilo con un punto de ebullición de 163 °C.

Este compuesto impide a las plaquetas (sustancias presentes en la sangre necesarias para su coagulación) adherirse juntas o pegarse a las superficies de la válvula protésica del corazón. Es capaz de disminuir el consumo de oxígeno miocárdico favoreciendo la supervivencia del corazón en situaciones de hipoxia. Otras acciones son: disminución moderada de las cifras plasmáticas de colesterol; antiagregante plaquetario; isótero de las metilxantinas e inhibe la fosfodiesterasa. Es un fármaco bien tolerado que únicamente produce trastornos digestivos y fotosensibilización. Se ha empleado en el tratamiento de sostenimiento de la insuficiencia coronaria y, actualmente, se emplea como antiagregante plaquetario solo asociado al ácido acetilsalicílico (parece incrementar la síntesis de prostaciclina).

Su posología oscila entre 100 y 400 mg/día vía oral. Este vasodilatador es rápidamente absorbido, eliminándose principalmente en las heces. Tras una dosis oral de 100 mg la concentración en el plasma varía de 1526 ng/mL transcurrida una hora desde la ingestión a 116 ng/mL tras doce horas [1].

### 1.1.3. Métodos de determinación del dipiridamol

En 1986 se describió un método espectrofotométrico y una valoración conductimétrica [2] para la determinación de dipiridamol en productos farmacéuticos.

El dipiridamol se ha determinado en mezclas con ácido acetilsalicílico y oxazepam [3] por espectrofotometría de espectros de cocientes y utilizando la técnica de medida en el punto de corte, habiéndose aplicado al análisis de productos farmacéuticos con éxito.

El producto coloreado que se obtiene con 2,3-dicloro-5,6-diciano-p-benzoquinona y algunos compuestos con propiedades cardiovasculares han sido usados para la determinación de dipiridamol [4]. El proceso es tedioso y lento porque aplicándose a productos farmacéuticos en disolución acuosa, es necesario realizar extracción en cloroformo, llevar a sequedad y disolver en acetonitrilo antes de proceder a la reacción. Además, el color no se desarrolla inmediatamente sino que es necesario esperar al menos 15 minutos antes de medir la absorbancia. Los mismos autores utilizan un procedimiento similar, pero con ácido p-cloroanilínico como reactivo [5]. Mucho más sencilla es la determinación espectrofotométrica directa aplicada a productos farmacéuticos midiendo a 283 nm, pero sólo es posible determinar hasta 6 mg/L [6]. También han sido descritos otros métodos espectrofotométricos de determinación de dipiridamol de menor interés [7-9].

Se ha estudiado el efecto del agua [10] en la valoración en un medio no acuoso con ácido perclórico de compuestos que contienen nitrógeno entre los que se incluye

- 
1. A.C. Moffat, Clarke's Isolation and Identification of drug, The pharmaceutical Press, Londres, 1986.
  2. M.S. Bahbouh, A.A. Salem e Y.M. Issa. *Mikrochim. Acta*, 128 (1998) 57.
  3. F.A. El Yazbi, H.H. Advine y R.A. Salan. *Spectr. Lett.*, 31 (1998) 1403.
  4. A.S. Issa, M.S. Mahrous, M. Abdel Salam, N. Soliman, *Talanta*, 34, (1987) 670.
  5. M.S. Mahrous, A.S. Issa, M. Abdel Salam, N. Soliman. *Anal. Lett.*, 19 (1986) 901.
  6. J. Hu, H. Sun, Y. Xu. *Huaxue Shijie*, 28 (1987) 19.
  7. R.T. Sane, V.G. Nayak, N.R. Naik, D.D. Gupte. *Indian Drugs*, 20 (1983) 334.
  8. R. Tawa, S. Hirose, K. Adachi. *Chem. Oharm. Bull*, 30 (1982) 1872.
  9. M.A. Korany, R. Haller. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 65 (1982) 144.
  10. X.S. Qi, R.B. Miller, Y.H. Namiki, J. Zhang, R. Jacobus. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 16 (1997) 413.



el dipiridamol. Lógicamente este método carece de selectividad y sólo es aplicable a muestras de dipiridamol donde se encuentre aislado. Ganescu y col. [11,12] proponen una valoración indirecta para la determinación de dipiridamol mediante una permanganimetría, después de disolver el precipitado que se forma con la sal amónica del complejo sulfocianuro-Cr(III) que, posteriormente, es descompuesto en medio básico y el sulfocianuro liberado es el que interviene en la valoración redox.

La espectrofotometría de primera y segunda derivada se ha utilizado para eliminar la interferencia de productos de oxidación del dipiridamol [13] en su determinación y la determinación de éste en mezclas [14,15].

La absorbancia que presenta el dipiridamol a 276 nm ha servido como método de detección en HPLC [16,17,18], aunque sólo se aplica el método a inyecciones de dipiridamol. Los resultados no son muy relevantes ya que, se propone el método para el control de la estabilidad del dipiridamol. De mayor interés es el método de Barberi y col. [19] que determina dipiridamol libre y unido a proteínas en plasma, si bien es necesario un proceso de extracción previa [20].

Otros métodos cromatográficos han detectado fotométricamente el dipiridamol en mezclas [21,22] o en sangre [23, 24].

La detección electroquímica (columbimétrica) se ha aplicado a la determinación en suero [25] pero requiere un complejo proceso de tratamiento de muestra que incluye una desprotenización, una ultracentrifugación y una posterior evaporación a sequedad mediante paso de nitrógeno para, después de disolver el residuo en metanol, inyectar la muestra. Se utiliza detección amperométrica para la

- 
11. I. Ganescu, M. Prenda, I. Papa, A. Vladoianu. *Zentralbl Pharm.*, 127 (1988) 577.
  12. I. Ganescu, M. Prenda, I. Papa. *Arch. Pharm.*, 324 (1991) 321.
  13. M.H. Baray, M.A.H. El Sayed, M.H. Abdel Hay, S.M. Mohamed. *Anal. Lett.*, 22 (1989) 1643.
  14. F.A. El Yazbi, H.H. Abdine, R.A. Shaalan. *Spectros. Lett.*, 31 (1998) 1403.
  15. A.F. Shoukry, N.T.A. Chani, Y.M. Issa, O.A. Wahdan. *Anal. Lett.*, 34 (2001) 1689.
  16. J. Zhang, R.B. Miller, S. Russell, R. Jacobus. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.*, 20 (1997) 2109.
  17. J. Zhang, R.B. Miller, R. Jacobus. *Chromatographia*, 44 (1997) 247.
  18. J.H. Bridle, M.T. Brimble, *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 19 (1993) 371.
  19. M. Barbei, J.L. Merlín, B. Weber. *J. Chromatogr. Biomed. Appl.*, 103 (1991) 511.
  20. P.J. Stevenson, M.A.F. Hamelijncck, P.K. Kabada, A. Damani. *J. Chromatogr. Biomed. Appl.*, 101 (1991) 419.
  21. R.T. Sane, J.K. Ghadge, A.B. Jani, A.J. Vaidya, S.S. Kotwal. *Indian Drugs*, 29 (1992) 240.
  22. F. Fontani, G.P. Finardi, G. Targa, G.P. Besana, M. Ligorati. *J. Chromatogr A*, 280 (1983) 181.
  23. J. Rosenfeld, D. Devereaux, M.R. Buchaman, A.G.G. Turpie. *J. Chromatogr. Biomed. Appl.*, 20 (1982) 216.
  24. C.I.I. Willians, C.S. Huang, R. Erb, M.A. González. *J. Chromatogr. Biomed. Appl.*, 14 (1981) 225.

determinación por HPLC [26] en comprimidos pero cuando éstos presentan colorantes deben ser separados previamente al proceso cromatográfico.

La quimioluminiscencia producida por la reacción con el peroxioxalato [27] se ha aprovechado como reacción de derivatización post-columna para la determinación simultánea de dipiridamol y el derivado dansilado de la vanilina, basado en la reacción estudiada por Imai y col. [28]. Anteriormente este mismo método se había aplicado a plasma de ratas [29]. La característica más importante del método basado en la reacción quimioluminiscente con oxalato de bis-[4-nitro-2(3,6,9-trioxadecilcarbonil)fenil] es su bajo límite de detección [30,31].

La quimioluminiscencia que produce el dipiridamol en su reacción con hipoclorito sódico en presencia de Triton X-100 [32] se ha utilizado como base para la detección en un método FIA. No presenta un límite de detección muy bajo en comparación con las determinaciones quimiolumiscentes y, además, la repetitividad es un 2.7 % teniendo en cuenta que se aplica a un producto que sólo contiene este compuesto.

Por FIA también se ha utilizado la quimioluminiscencia generada por reacción con peroxioxalato [28] que se ha detectado fotográficamente por Nkashima y col. [33]. Y más recientemente Zhang y col. mediante la reacción con  $\text{KMnO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}_2$  [34].

Recientemente se ha publicado una determinación quimioluminiscente mediante la utilización de permangano potásico y rodamina B, obteniéndose un método muy sensible y selectivo [35].

La polarografía clásica y diferencial de pulso [36] se han aplicado al análisis de dipiridamol en comprimidos proponiendo métodos rápidos, sensibles y selectivos.

- 
25. M. Barberi, Heyob, J.L. Merlín, L. Pons, M. Calco, B. Weber. *J. Liq. Chromatogr.*, 17 (1994) 1837.
  26. C. Deballon, M. Guernet. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 6 (1988) 1045.
  27. R. Gohda, K. Kimoto, T. Santa, T. Fukushima, H. Homma, K. Imai. *Anal. Sci.*, 12 (1997) 713.
  28. K. Imai, A. Nishitani, Y. Tsukamoto, W.H. Wang, S. Kanda, K. Hayakawa, M. Miyazaki. *Biomed. Chromatogr.*, 4 (1990) 100.
  29. A. Nishitani, Y. Tsukamoto, S. Kanda, K. Imai. *Anal. Chim. Acta*, 251 (1991) 247.
  30. M. Sugiura, S. Kanda, K. Imai. *Anal. Chim. Acta*, 266 (1992) 225.
  31. M. Sugiura, S. Kanda, K. Imai., *Biomed. Chromatogr.*, 7 (1993) 149.
  32. F. Nie, L.D. Zhang, M.L. Feng, J.R. Lu. *Fénix-Huaxue*, 25 (1997) 879.
  33. K. Nakashima, S. Kawaguchi, R.S. Givens, S. Akiyama. *Anal. Sci.*, 6 (1990) 833.
  34. M.L. Yang, L.Q. Li, M.L. Feng, J.R. Lu, Z.J. Zhang. *Chinese J. Anal. Chem.*, 28 (2000) 161.
  35. Z.M. Rao, W.H. Zhang, Q.H. Li, G.P. Xie, H.Q. Yang. *Spectrosc. Spect. Anal.*, 24 (2004) 278.

Se ha desarrollado un electrodo de membrana plástica basada en un cambiador iónico de fosfovanadato de dipiridilamonio y tetrafenil borato [37].

Otro método potenciométrico se basa en una determinación por voltametría de redisolución anódica usando un electrodo de carbono vítreo modificado [38]. En este caso se aplica a muestras complejas como es el suero humano, aunque hay que someterlo a un tratamiento previo para la desproteización con ácido tricloroacético y posterior centrifugación. La voltametría de redisolución también ha sido aplicada con electrodo de gota de mercurio [39].

Se ha empleado un método desitométrico [40] para la determinación simultánea de dipiridamol y aspirina después de realizar una cromatografía en placa fina. Mezclas de estos dos compuestos también han sido resueltas por espectrometría de IR [41] y, los espectros de absorción en el IR por transformada de Fourier se utilizaron para la determinación de dipiridamol [42].

Se han descrito métodos espectrofluorimétricos [43,44] para la determinación simultánea de dipiridamol y aspirina en productos farmacéuticos, pero presentan el inconveniente de que hay que separar los analitos entre ellos y, en uno de los casos, incluso de la matriz. Para determinar fluoriméricamente el dipiridamol en plasma [45] es necesario realizar una extracción previa con cloroformo y proceder a una centrifugación para proceder a excitar a 415 nm y medir la emisión fluorescente a 465 nm.

Un optosensor fluorimétrico [46], basado en una célula de flujo empaquetada con gel de sílice en la cual se inmoviliza 2,6-o-dietil- $\beta$ -ciclodextrina que forma un complejo con dipiridamol, es capaz de medir la emisión a 468 nm excitando a 414 nm.

Y más recientemente se ha desarrollado un método para la determinación en preparados farmacéuticos y fluidos biológicos mediante su retención en la resina

- 
36. M. Tuncel, Y. Yazan, D. Dogrukol, Z. Atkosar. *Anal. Lett.*, 24 (1991) 1837.
  37. Y.M. Issa, M.S. Rizk, A.F. Shourkry, R.M. El Nashar, *Electroanal.*, 9 (1997) 74.
  38. Z.H. Wang, H.Z. Zhang, S.P. Zhou. *Talanta*, 44 (1997) 621.
  39. X.Q. Zeng, S.C. Lin, N.H. Hu. *Talanta*, 40 (1993) 621.
  40. A.P. Argekar, S.S. Kunjir. *J. Planar. Chromatogr. Mod. TLC*, 9 (1996) 65.
  41. P. Umapathi, P. Parimoo, S.K. Thomas. *Indian Drugs*, 31 (1994) 489.
  42. J.P. Huvenne, B. Lacroix. *Spectrochim. Acta*, 44 (1988) 109.
  43. Z. Shao, Z. Pan, Z. Gan. *Zhongguo Yaoxue Zazhi*, 26 (1991) 222.
  44. P. Umapathi, P. parimoo, S.K. Thomas, V. Agarwal. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 15 (1997) 1703.
  45. J.M. Steyn, *J. Chromatogr. Biomed. Appl.*, 6 (1979) 487.
  46. Z.L. Gong, Z.J. Zhang. *Fressenius'J. Anal. Chem.*, 360 (1998) 138.

Sephadex QAE-25 [47]. Otro sensor es el de ondas acústicas [48] que es muy complejo de obtener y, además, se ha aplicado a comprimidos después de una extracción con cloroformo.

Pulgarín y col. proponen la determinación de dipiridamol mediante fosforescencia a temperatura ambiente en medios micelares [49] y en flujo parado (stopped-flow) [50].

## 1.2. Nafcilina

### 1.2.1. Nomenclatura y estructura molecular

Su nombre IUPAC es 6-(2-etoxi-1-naftamida)penicilina, se trata de un antibiótico que se encuentra dentro del grupo de una clase de drogas llamadas penicilinas.

La fórmula molecular de este compuesto es  $C_{21}H_{22}N_2O_5S$  tal y como se observa en la Figura A.1-2, posee un peso molecular de 415.5 g/mol

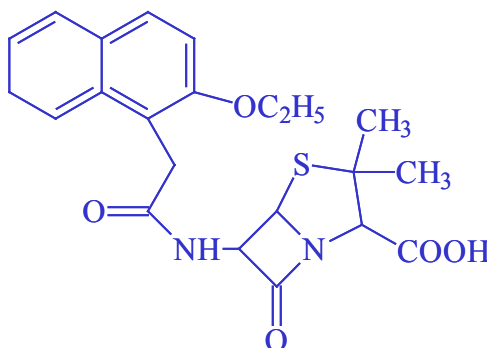


Figura A.1-2. Estructura molecular de la nafcilina

### 1.2.2. Uso

Se trata de un antibiótico semisintético. Es resistente a las penicilinazas ( $\beta$ -lactamasas) de estafilococos, por lo que se usa ampliamente en el tratamiento de

- 
47. A. Ruiz Medina, M.L. Fernández de Cordoba, A. Molina Diaz. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 13 (2001) 385.
  48. D.Z. Liu, R.H. Wang, L.H. Nie, S.Z. Yao. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 14 (1996) 1471.
  49. J.A.M. Pulgarín, A.A. Molina, P.F. López. *Analyst*, 122 (1997) 253.
  50. A.M. del a Peña, A.E. Mansilla, J.A.M. Pulgarín, A.A. Molina, P.F. López. *Talanta*, 48 (1999) 1061.

infecciones producidas por estos gérmenes, fundamentalmente contra *Staphylococcus aureus*. La nafcilina presenta efectos sinérgicos bactericidas con la rifampicina y los aminoglicósidos frente a dicho microbio, así como también se ha descrito sinergia con la ampicilina contra cepas de *Haemophilus influenzae*  $\beta$ -lactamasa-negativas resistentes a la ampicilina. Clínicamente está particularmente recomendada para el tratamiento de la meningitis estafilococia, aunque también hay referencias para la osteomielitis.

Se absorbe poco e irregularmente a través de administración oral, incluso con el estomago vacío, y la absorción es aún menor si se ingiere con comida. Puede llegarse a un nivel plasmático medio de 8 mg/L una hora después de la inyección de un gramo por vía intramuscular. Las concentraciones plasmáticas son relativamente bajas por la alta distribución y porque entre el 60 y el 70% se inactiva en el hígado. La excreción se produce principalmente por la orina, llegando al 11% a las doce horas de la administración oral, o al 30% en administración intramuscular. La coadministración de probenecida reduce la excreción por orina y aumenta y prolonga el nivel en plasma.

### 1.2.3. Métodos de determinación de la nafcilina

Ya en 1979 se desarrollo un método fluorimétrico para la determinación de esta penicilina [51], y posteriormente se han desarrollado algunos métodos fluorimétricos [52-54].

Pero son sin duda las técnicas separativas las usada para la determinación de este analito. Dentro de las técnicas separativas la más utilizada es la cromatografía líquida. Siendo destacada la cromatografía líquida de alta resolución con detección UV para su determinación junto a otras drogas en suero [55-65]. Muy recientemente se

- 
51. D.M. Lichtenwalner, B. Suh, B. Lorber, A.M. Sugar. *Antimicrob. Agents Ch.*, 16 (1979) 210.
  52. J.M. Murillo, A. Alañon. *Anal. Lett.*, 26 (1993) 2409.
  53. J.A.M Pulgarín, A.A. Molina. *Talanta*, 41 (1994) 21.
  54. J.A. Murillo, A. Alañon, P. Fernández, A.M. de la Peña, A. Espinosa Mansilla. *Analyst*, 123 (1998) 1073.
  55. S.J. Soldin, A.M. Tesoro, S.M. Macleod. *Ther. Drug Monit.*, 2 (1980) 417.
  56. P. AFNA Vard, M.C. Nahata. *Ther. Drug Monit.*, 11 (1989) 105.
  57. E. Mendez Alvarez, R. Soto Otero, G. Sierra Paredes, E. Aguilar Veiga. *Biomed. Chromatogr.*, 5 (1991) 78.
  58. R. Himei, K. Koide, S. Suzuki, H. Nakazawa. *J. Food Hyg. Soc. Jap.*, 34 (1993) 392.
  59. K. Takeba, K. Fujinuma, T. Miyazaki, H. Nakazawa. *J Chromatography A*, 812 (1998) 205.
  60. Y.Ito, Y. ICAI, H. Oka, T. Kagami, k. Takeba. *J. Chromatography A*, 855 (1999) 247.
  61. E. Verdon, P. Couedor. *J. AOAC International*, 82 (1999) 1083.
  62. S. Taguchi, S. Yoshida, Y. Tanaka, S. Hori. *J. Food Hyg. Soc. Jap.*, 40 (1999) 375.
  63. L.K. Sorensen, L.K. Snor, T. Elkaer, H. Hansen. *J. Chromatography A*, 734 (1999) 307.
  64. Y. Ito, Y. ICAI, H. Oka, H. Matsumoto, T. Kagami, K. Takeba. *J. Chromatography A*, 880 (2000) 85.
  65. L.K. Sorensen, L.K. Snor. *Chromatographia*, 53 (2001) 367.

ha publicado un método de HPLC con detección por diodo array [66] con un límite de detección de 0.04 ppm.

La cromatografía líquida de alta resolución con detección fluorescente también se ha utilizado para determinar este analito en leche [67]. En los últimos años esta proliferando el uso de una técnica muy potente como es el acoplamiento de la cromatografía líquida con la espectrometría de masas [68-71].

Dentro de las técnicas luminiscentes, además de los métodos fluorimétricos mencionados anteriormente, también se han descrito métodos fosforimétricos, un método mediante la utilización de la fosforescencia a temperatura ambiente inducida por átomos pesados [72] y muy recientemente la realización de un optosensor mediante la utilización de un sol-gel impreso [73].

## 2. ESTUDIOS PRELIMINARES DE VARIABLES EXPERIMENTALES DEL DIPIRIDAMOL Y LA NAFCILINA

Se han realizado estudios preliminares de las variables experimentales mas importantes que pueden afectar a la emisión fosforescente (disolvente orgánico, átomo pesado y desoxigenante) para los dos principios activos objeto de estudio usando unas condiciones instrumentales de partida (Tabla A.1-1), para establecer unas condiciones de partida a las cuales los dos compuestos presenten fosforescencia en disolución y a temperatura ambiente.

**Tabla A.1-1. Parámetros instrumentales preliminares**

Parámetros instrumentales	Valor seleccionado
Voltaje del detector (V)	950
Tiempo de demora/integración (ms)	0.12/5.00
Ancho de las rendija <sub>S<sub>exc/em</sub></sub> (nm)	20/20

66. T. Nagata, E. Ashizawa, H. Hashimoto. *J. Food Hyg. Soc. Jap.*, 45 (2004) 161.  
 67. K. berger, M. Petz. *Deutsche Lebensmittel rundschau*, 87 (1991) 137.  
 68. Y. Ito, Y. ICAI, H. Oka, H. Matsumoto, Y. Miyazaki, K. Takeba, H. Nagase. *J. Chromatography A*, 911 (2001) 217.  
 69. F. Bruno, R. Curini, A. Di Corcia, M. Nazzari, R. Samperi. *J. Agric. Food Chen.*, 49 (2001) 3463.  
 70. Y. Ito, T. Goto, H. Oka, H. Matsumoto, K. Takeba. *J. Chromatogr. A*, 1042 (2004) 107.  
 71. M. Becker, E. Zittlau, M. Petz. *Anal. Chim. Acta*, 520 (2004) 19.  
 72. A. Fernández González, R. Badia, M.E. Díaz García. *Anal. Chim. Acta*, 489 (2003) 69.  
 73. Fernández González, R.B. Latino, M.E. Díaz García, L. Guardia, A. Viale. *J. Chromatogr. B*, 804 (2004) 247.

Una variable experimental de vital importancia es el disolvente orgánico utilizado. Para el dipiridamol debido a su baja solubilidad en agua se realizaron madres de 50 ng/mL en distintos disolventes orgánicos miscibles con agua (acetona, acetonitrilo, metanol, etanol y dimetilformamida) y también se comprobó como afectaba la adición de pequeñas cantidades de disolvente a la emisión fosforescente. Mientras que en el caso de la nafcilina la disolución madre se efectuó en agua, comprobándose como le afectaba a la emisión fosforescente la adición de pequeñas cantidades de disolvente orgánico que pudiera favorecer la solubilización del analito.

De estos estudios previos se ha podido concluir que para el caso del dipiridamol presenta fosforescencia nativa en disolución usando como disolvente orgánico la acetona (sin necesidad de adicionar disolvente adicional, simplemente el que contiene la cantidad de muestra necesaria), 0.075 M de  $\text{TINO}_3$  y 7 mM de  $\text{Na}_2\text{SO}_3$ . Mientras que la nafcilina sólo fue necesario la presencia de átomo pesado, 1 M de KI en este caso y 4 mM de  $\text{Na}_2\text{SO}_3$ .

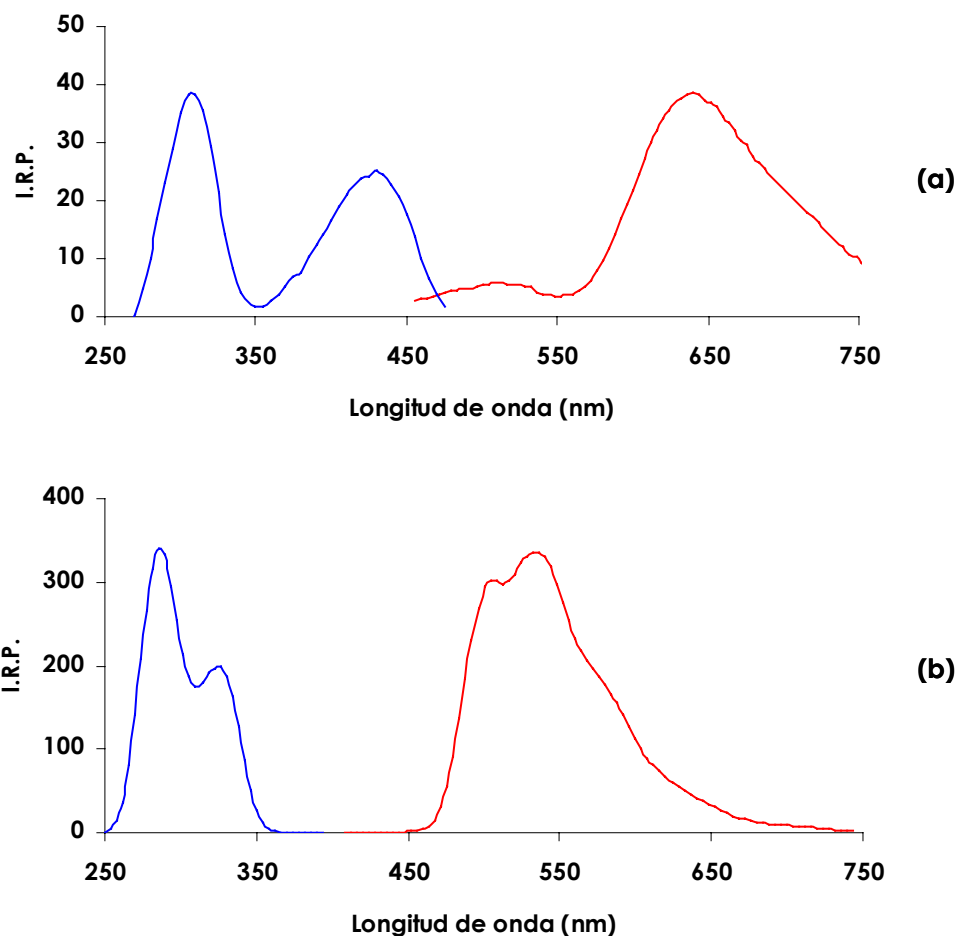
A partir de estos valores se comenzó la optimización de las distintas variables instrumentales y experimentales para cada uno de los principios farmacológicos en estudio.

### **3. CARACTERÍSTICAS ESPECTROSCÓPICAS DEL DIPIRIDAMOL Y LA NAFCILINA**

#### **3.1. Espectros de fosforescencia**

En primer lugar se llevó a cabo un estudio sobre las características fosforescentes a temperatura ambiente en disolución del dipiridamol en presencia de  $\text{TINO}_3$  y de la nafcilina en presencia de KI. Para ello, se tomaron 10  $\mu\text{L}$  de una disolución de 50  $\mu\text{g/mL}$  de cada analito en estudio, añadiéndole 4 mL de  $\text{TINO}_3$  de 0.25 M, 700  $\mu\text{L}$  de  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  0.1 M para el dipiridamol y 5.0 mL de KI 2.0 M, 400  $\mu\text{L}$  de  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  0.1 M en el caso de la nafcilina, enrasando hasta 10 mL con agua bidestilada. Se registraron los espectros de excitación y emisión fijando unas condiciones instrumentales que en ambos casos fueron de 950 V para el voltaje del detector, ancho de rendijas<sub>exc/em</sub> de 20/20 nm, tiempo de demora de 0.12 ms y un tiempo de integración de 5.00 ms.

Los espectros de excitación y emisión fosforescentes obtenidos en estas condiciones se muestran en la Figura A.1-3.



**Figura A.1-3. Espectros de excitación (—) y emisión (—) fosforescentes del dipiridamol (a) y de la nafcilina (b).**

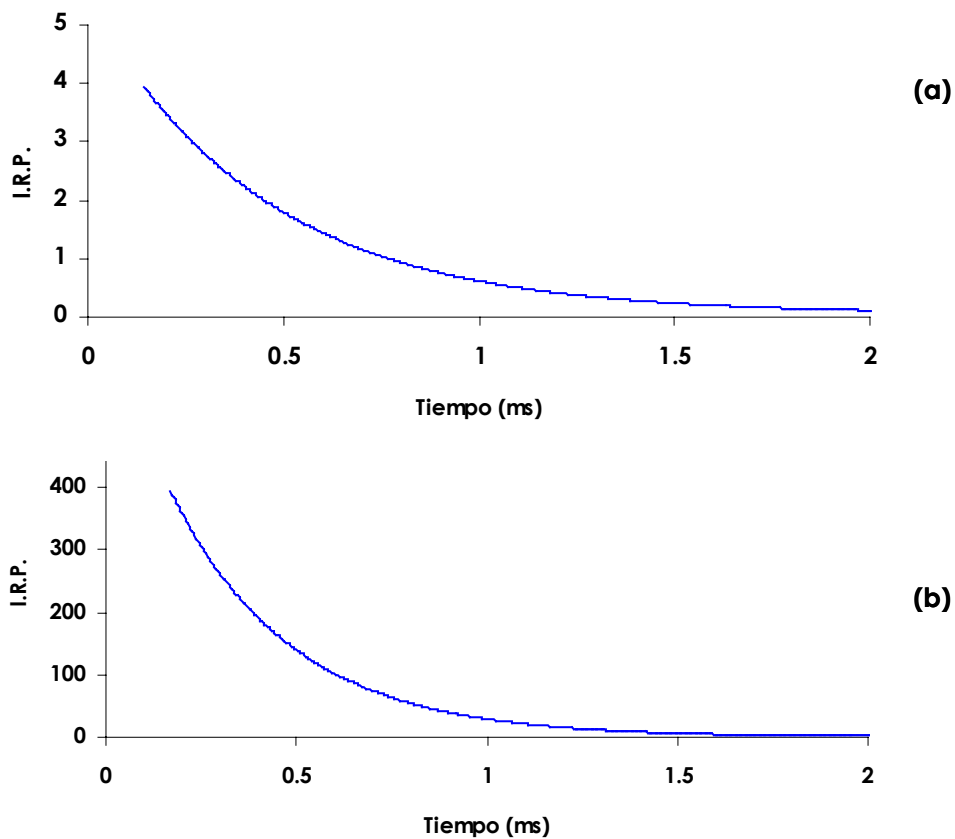
Como se puede comprobar el dipiridamol presenta dos máximos de excitación en 305 y 435 nm y un solo máximo de emisión en 635 nm, mientras que la nafcilina presenta también dos máximos de excitación en 285 y 335 nm y dos máximos de emisión en 495 y 535 nm.

Por tanto, las longitudes de onda de medida de la señal fosforescente para el resto del trabajo experimental seleccionadas fueron:  $\lambda_{exc/em}$  305/635 nm y  $\lambda_{exc/em}$  285/535 nm para dipiridamol y nafcilina respectivamente.



### 3.2. Curva de decaimiento

Para el cálculo del tiempo de vida de los dos principios activos se registró la curva de decaimiento de la intensidad de fosforescencia con el tiempo de una muestra preparada siguiendo la metodología previamente descrita. Las condiciones instrumentales empleadas fueron:  $\lambda_{exc/em}$  305/635 nm y  $\lambda_{exc/em}$  285/535 nm para dipiridamol y nafcilina respectivamente, voltaje de 950 V, ancho de rendija  $\lambda_{exc/em}$  20/20 nm y un  $t_{d/g}$  0.12/5.00 ms para ambos compuestos. Las curvas de decaimiento se presentan en la Figura A.1-4.



**Figura A.1-4. Curvas de decaimiento del dipiridamol (a) y de la nafcilina (b).**

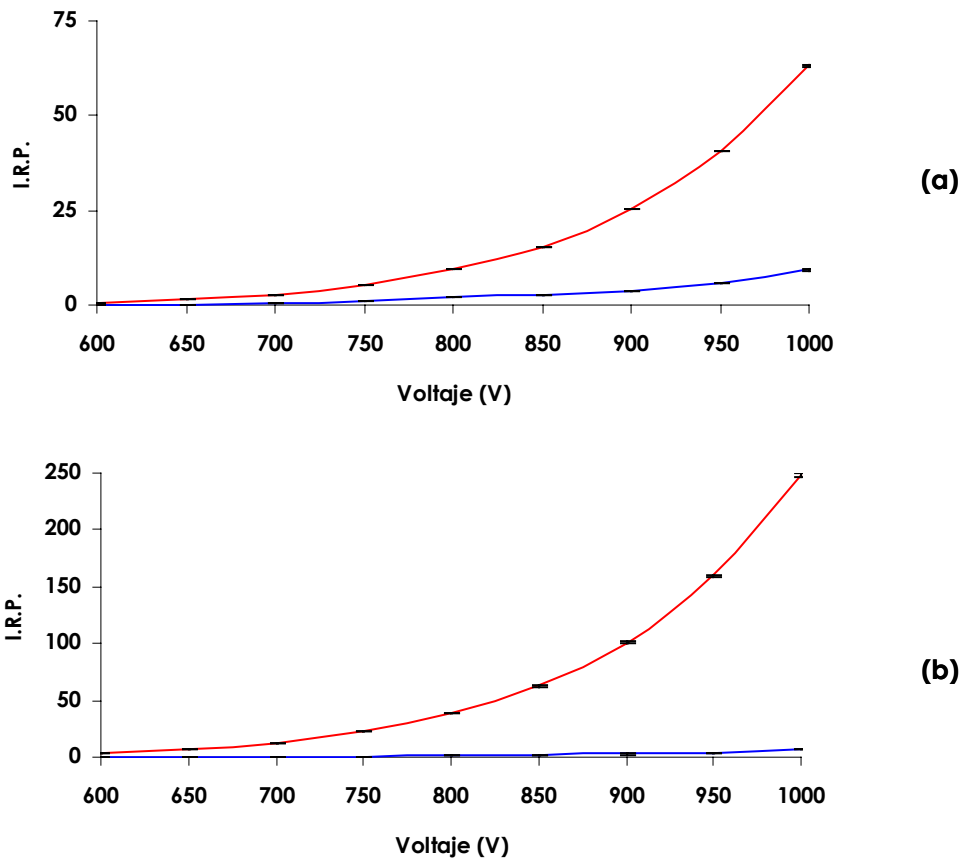
Al ajustar dicha curva de decaimiento a una función exponencial se calcula el tiempo de vida. Se concluye que, en estas condiciones experimentales los tiempos de vida fueron: 446  $\mu$ s para el dipiridamol y 362  $\mu$ s para la nafcilina.

## 4. SELECCIÓN DE LOS PARÁMETROS INSTRUMENTALES PARA DIPIRIDAMOL Y NAFCILINA

### 4.1. Optimización del voltaje del detector

El voltaje del detector afecta tanto al valor de la señal analítica como a la reproducibilidad de la misma. Para optimizar este parámetro, se preparó disoluciones individuales de cada analito en estudio, añadiéndole 4 mL de  $\text{TINO}_3$  de 0.25 M y 700  $\mu\text{L}$  de  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  0.1 M para el dipiridamol y 5.0 mL de KI 2.0 M y 400  $\mu\text{L}$  de  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  0.1 M en el caso de la nafcilina, enrasando hasta 10 mL con agua bidestilada y un blanco preparado de igual forma pero sin contener los analitos. Las disoluciones se introdujeron en la cubeta de medida, se registró la señal analítica y la desviación estándar de las medidas conforme se variaba el voltaje del detector mediante un registro de 20 réplicas a las siguientes condiciones instrumentales:  $\lambda_{\text{exc/em}}$  305/635 nm y  $\lambda_{\text{exc/em}}$  285/535 nm para dipiridamol y nafcilina respectivamente, ancho de rendijas $_{\text{exc/em}}$  20/20 nm y un  $t_{\text{d/g}}$  0.12/5.00 ms para ambos casos. Los resultados obtenidos se muestran en las Figuras A.1-5.

El valor óptimo de voltaje elegido debe de ser el valor al cual las D.E.R. de la muestra y del blanco son mínimas y la relación entre la señal de la muestra y el blanco es máxima. Basándose en estas deducciones se seleccionó como valor del voltaje del detector óptimo para ambos analitos 950 V.



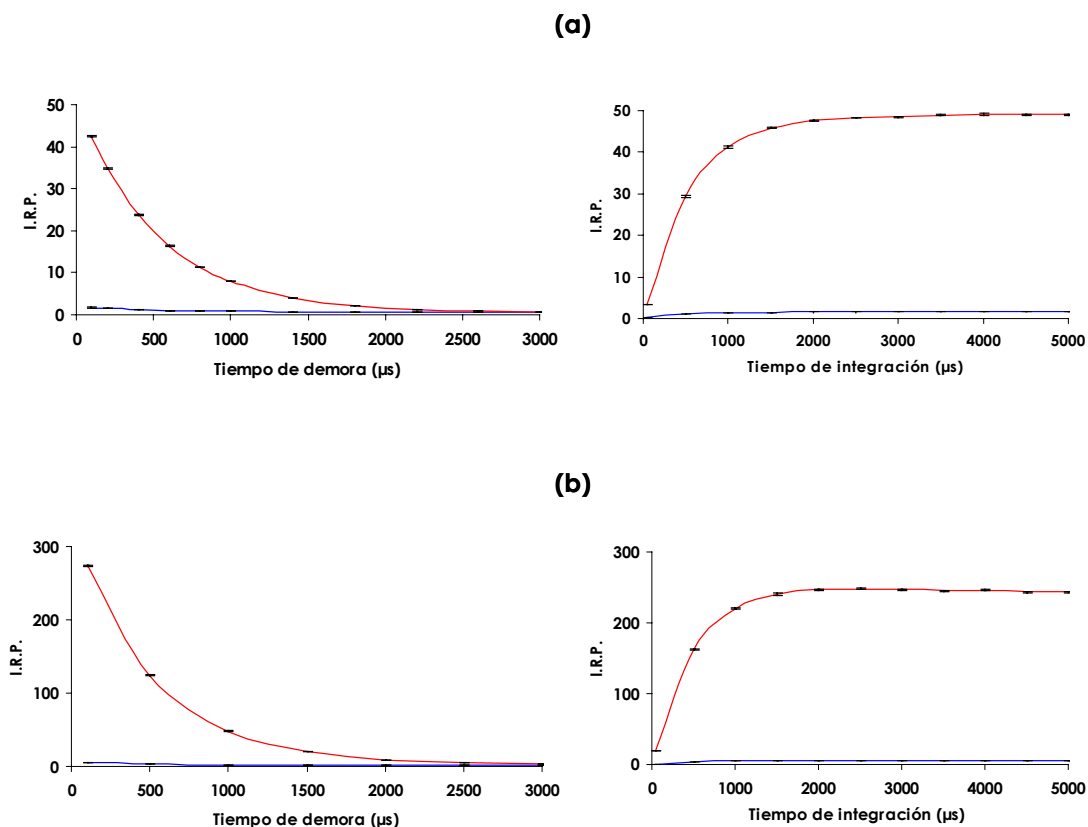
**Figura A.1-5. Influencia del voltaje del detector sobre la intensidad de fosforescencia del analito (—) y de su blanco (—) para el dipiridamol (a) y la nafcilina (b).**

#### 4.2. Optimización del tiempo de demora e integración

Sobre la curva de decaimiento se definen dos importantes parámetros instrumentales: tiempo de demora ( $t_d$ ) y tiempo de integración ( $t_g$ ). Tanto la intensidad de fosforescencia como la reproducibilidad de las medidas van a depender de estos parámetros.

Se optimizaron dichos parámetros y para ello se preparó una muestra siguiendo el procedimiento descrito hasta ahora y un blanco de igual forma pero sin contener a los analitos.

Se registró la intensidad de fosforescencia y la desviación estándar relativa a distintos  $t_d$  y  $t_g$  llevando a cabo 20 réplicas. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura A.1-6.



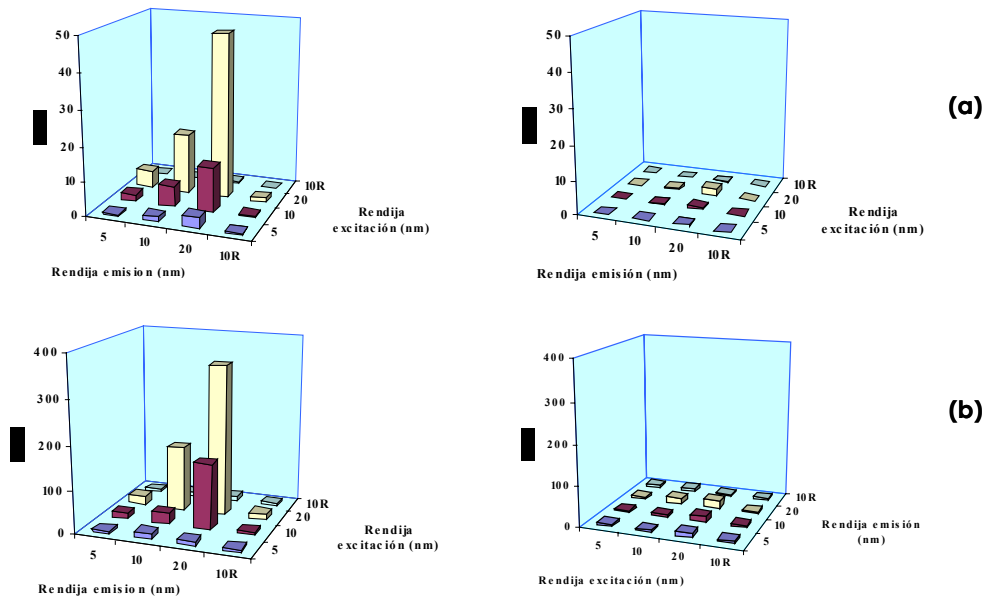
**Figura A.1-6. Influencia del tiempo de demora y de integración sobre la intensidad de fosforescencia del analito (→) y de su blanco (←) para dipiridamol (a) y la nafcilina (b).**

A la vista de los resultados se escogieron unos valores para los cuales la relación de intensidades fuese máxima. Los valores seleccionados para ambos analitos han sido un tiempo de demora de 0.12 ms y un tiempo de integración de 5.00 ms.

### 4.3. Optimización del ancho de rendijas

La apertura del ancho de rendija de excitación influye sobre la cantidad de luz que incide sobre la muestra y por tanto sobre la luz que ésta emite. La apertura del rendija de emisión influye sobre la cantidad de luz que llega al detector. Sus valores se variaron entre 5 y 20 nm (5, 10, 20, 10R).

Para ver el efecto que produce la anchura de estas rendijas sobre la señal analítica se preparó una muestra y un blanco, de igual forma que en el apartado anterior, y se fijaron los parámetros instrumentales óptimos, hasta ahora estudiados, variando la anchura de las rendijas. Este estudio se ve reflejado en la Figura A.1-7.



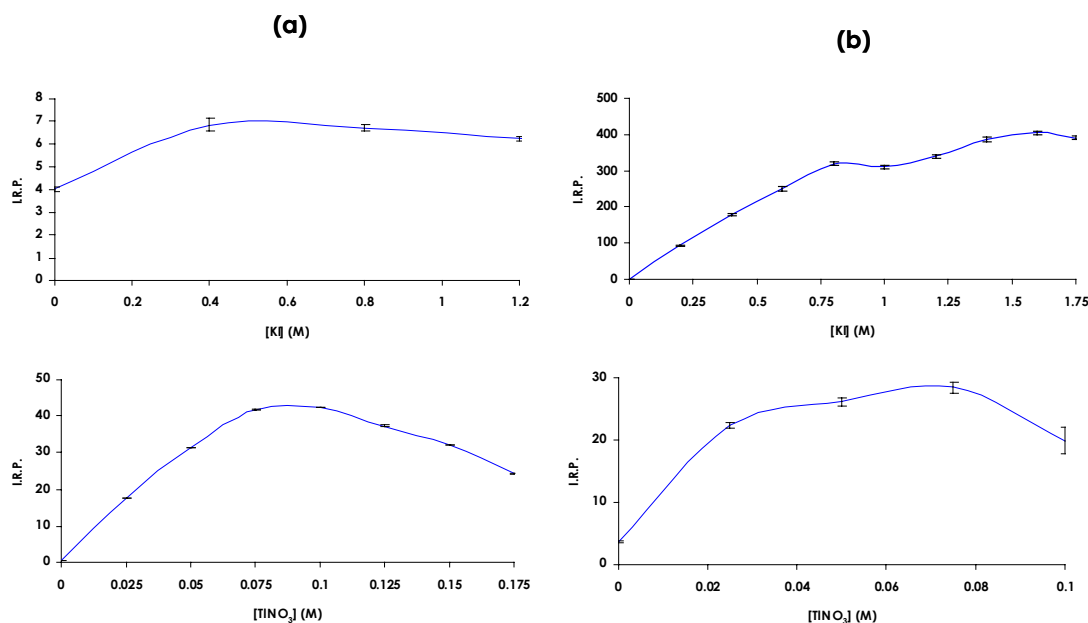
**Figura A.1-7. Influencia del ancho de rendija sobre la intensidad de fosforescencia de una muestra y de su blanco para los analitos (a) Dipiridamol y (b) Nafcilina.**

Como se observa en las gráficas, un aumento de la anchura de las rendijas produce un aumento en la emisión fosforescente, mientras que el ruido no se ve afectado por este factor. Por tanto, la relación señal/ruido depende prácticamente de la señal analítica pues el ruido es constante. La mayor señal analítica se tiene cuando se usa la mayor apertura posible de las rendijas. Por ello, para el resto del trabajo experimental se ha seleccionado como óptimo para los dos analitos en estudio un ancho de rendijas<sub>exc/em</sub> de 20/20 nm.

## 5. SELECCIÓN DE LAS VARIABLES EXPERIMENTALES PARA DIPIRIDAMOL Y NAFCILINA

### 5.1. Átomo pesado perturbador

Como se ha mencionado anteriormente, es imprescindible la presencia de átomo pesado perturbador que favorezca el cruce entre sistemas para que se produzca señal fosforescente. Para trabajar con esta metodología (HAI-RTP), las dos únicas sales hasta la actualidad que ofrecen señales analíticamente útiles son KI y TINO<sub>3</sub>. Esto supone una novedad frente a las metodologías MS-RTP y ME-RTP en las que habitualmente sólo se ha hecho uso de TINO<sub>3</sub>.

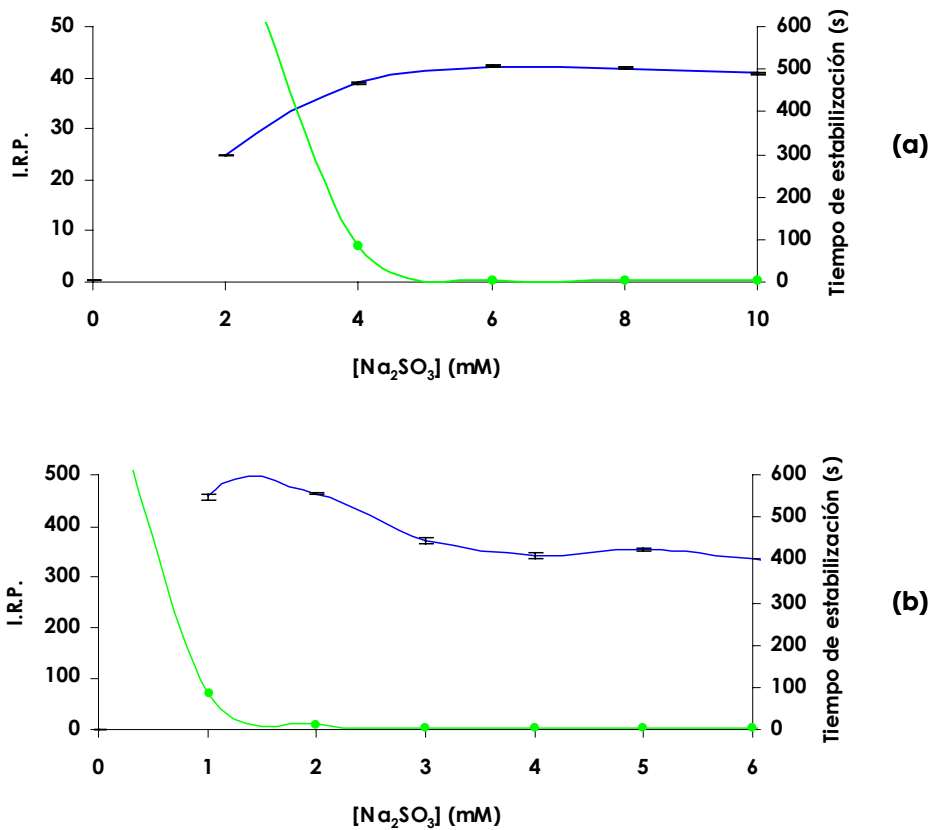


**Figura A.1-8. Influencia del tipo y la concentración de átomo pesado sobre la intensidad de fosforescencia para el dipiridamol (a) y la nafcilina (b). [Análito] = 50 ng/mL,  $\lambda_{exc/em}$  305/635 nm y  $\lambda_{exc/em}$  285/535 nm para dipiridamol y nafcilina respectivamente, voltaje de 950 V, ancho de rendijas  $_{exc/em}$  20/20 nm y un  $t_{dij}$  0.12/5.00 ms para ambos análisis.**

En la Figura A.1-8 se puede observar como afectan la presencia estos dos átomos pesados a los dos analitos objeto de estudio, pudiendo concluir claramente que para el caso del dipiridamol los mejores resultados se obtienen utilizando TINO<sub>3</sub> como átomo pesado, pudiéndose observar que la curva presenta claramente un máximo entre las concentraciones de 0.075 M y 0.1 M, escogiendo como óptimo para este caso la concentración de TINO<sub>3</sub> de 0.075 M. En el caso de la nafcilina el mejor átomo pesado fue el KI, en este caso la curva es característica, a medida que aumenta la concentración de la sal aumenta la señal fosforescente hasta que llega a una meseta o zona de saturación en la que la señal se estabiliza, escogiendo como óptimo para este caso una concentración de 1.4 M de KI.

## 5.2. Sistema de desoxigenación

Se ha visto que un factor importante que afecta tanto a la intensidad de fosforescencia como al tiempo de estabilización de la señal fosforescente es la concentración de agente desoxigenante. La concentración de Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> se optimizó midiendo la señal fosforescente y el tiempo de estabilización de la misma en las disoluciones que contenían cantidades variables de Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> 0.1 M a las condiciones instrumentales óptimas, obteniendo los datos mostrados en la Figura A.1-9.



**Figura A.1-9. Intensidad (—) y tiempo de estabilización (—) de la señal fosforescente en función de la concentración de  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  para el dipiridamol (a) y la nafcilina (b).**

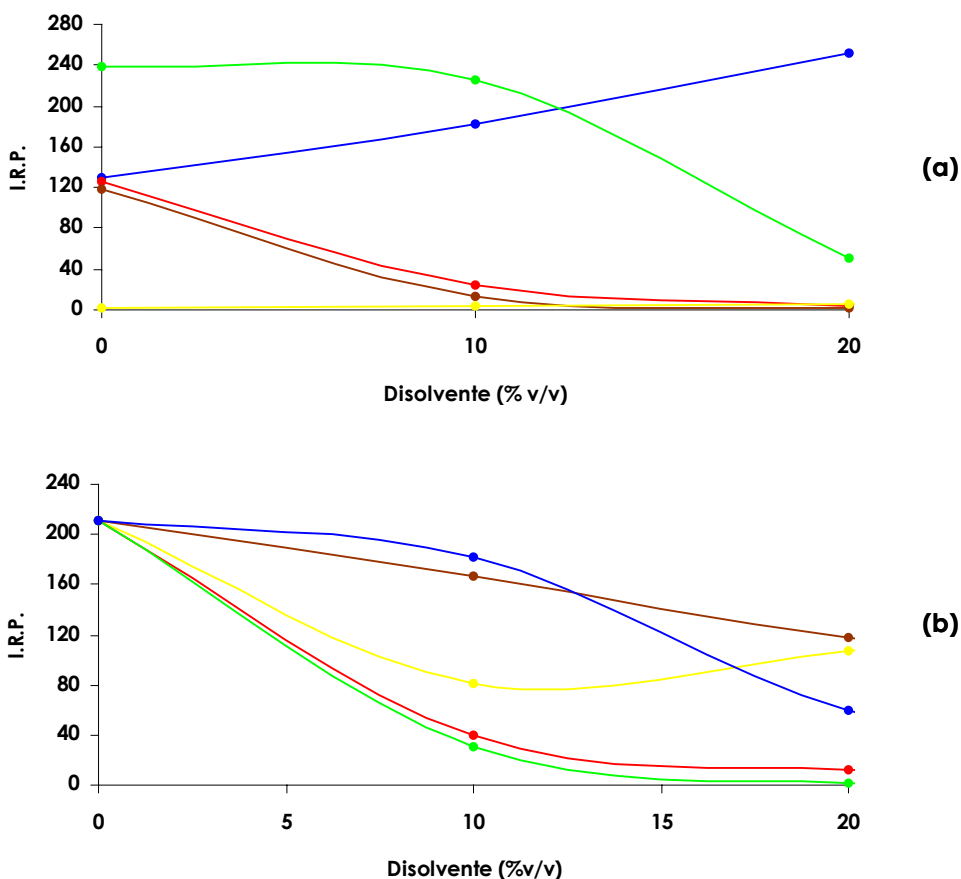
De la figura podemos deducir que para el caso del dipiridamol a partir de una concentración de 4 mM se produce una estabilización de la señal fosforescente y la señal aparece instantáneamente, por lo que para el resto de la optimización elegimos 8 mM como concentración óptima. En el caso de la nafcilina vemos claramente que a partir de 1 mM conseguimos obtener la señal instantáneamente y a partir de 2 mM la señal decrece un poco, por lo que se toma como óptimo para el resto de trabajo una concentración de 2 mM.

### 5.3. Influencia de disolventes orgánicos

La limitación de la HAI-RTP al estudio de analitos solubles en agua, nos lleva a estudiar la influencia de la utilización y presencia de pequeños porcentajes de disolventes orgánicos, miscibles con ella, con el fin de mejorar la solubilización en medio acuoso, y mejorar la reproducibilidad de los métodos. Así, se han estudiado distintos disolventes orgánicos miscibles con agua y de distinta constante dieléctrica, midiendo a las condiciones instrumentales óptimas la señal fosforescente en presencia

de diferentes porcentajes de disolvente orgánico. Se llevo a cabo la elección del disolvente en que se tenía que realizar la madre para el caso del dipiridamol, debido a su baja solubilidad en agua.

En la Figura A.1-10 se muestran los resultados del efecto de la presencia de pequeñas cantidades de disolvente orgánico a la emisión fosforescente de los analitos en estudio.



**Figura A.1-10. Efecto de disolventes orgánicos sobre la señal de fosforescencia para el dipiridamol (a) y la nafcilina (b). Etanol (—), metanol (—), acetonitrilo (—), dimetilformamida (—) y acetona (—).**

Podemos observar como en el caso del dipiridamol la mejor señal se obtiene realizando la madre del analito en acetona y sin la adición de disolvente orgánico adicional, admitiendo hasta un 10% de acetona (%v/v) sin modificar mucho su señal fosforescente, mientras que con la adición de acetonitrilo la señal aumenta levemente, con el resto de los disolventes se produce una disminución de la señal de la señal fosforescente, luego llegamos a la conclusión que la mejor condición es simplemente con el pequeño porcentaje de la alícuota de la disolución del analito en acetona (% comprendidos entre 0.01 y 0.5).



En el caso de la nafcilina podemos observar que no es necesaria la utilización de ningún disolvente orgánico, con la adición de etanol, dimetilformamida y acetona se produce una fuerte disminución de la señal fosforescente, pudiendo utilizar si fuera necesario hasta un 10 %v/v de acetonitrilo o de metanol, al producir solo un leve descenso de la señal fosforescente en estos %.

#### 5.4. Influencia del pH

La influencia del pH en el sistema propuesto para la determinación de los analitos, viene impuesta por el uso del sulfito sódico como desoxigenante, ya que el pH del medio afecta a la capacidad de dicho reactivo de eliminar el oxígeno. Se realizó un estudio de cómo afecta el pH a la señal fosforescente variando su valor entre 4 y 12 (ver Figura A.1-11), observándose como a pH superiores a 8 la señal es totalmente estable, lógico si tenemos en cuenta el rango de trabajo de nuestro agente desoxigenante.

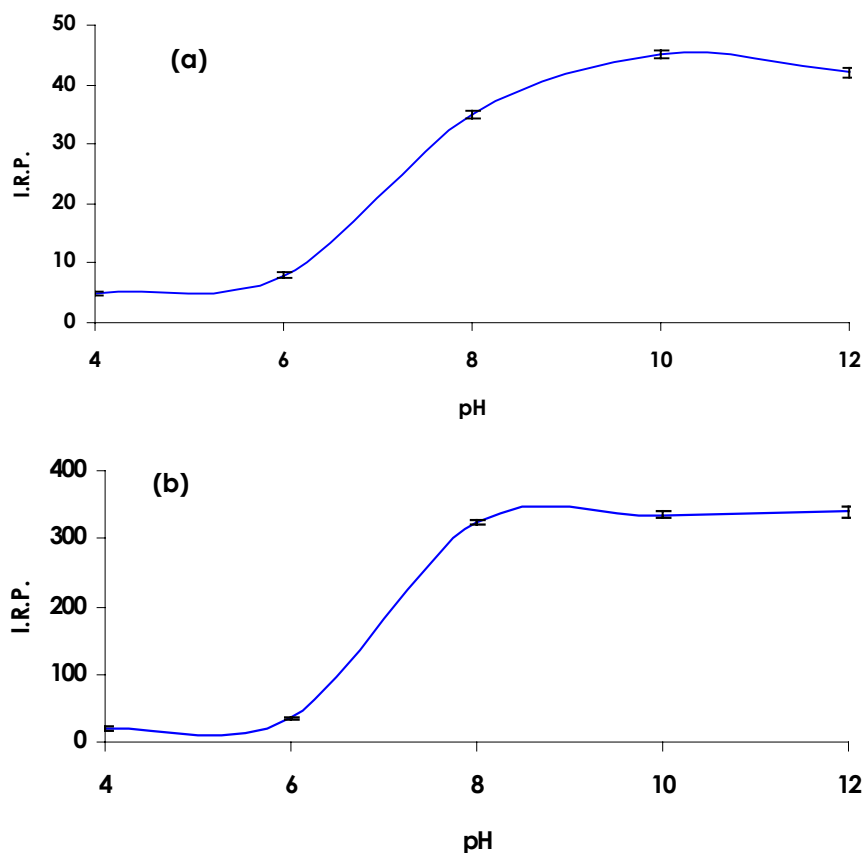


Figura A.1-11. Efecto del pH sobre la señal de fosforescencia para el dipiridamol (a) y la nafcilina (b).

Por lo tanto podemos concluir que como en nuestra metodología de trabajo el pH oscila entre 8-9, no es necesario ajustar el pH del medio, aunque estas experiencias indican la posibilidad de su uso en caso de ser necesarias, sin que se vea afectada la señal fosforescente.

### 5.5. Estabilidad con el tiempo

En un matraz de 10 mL se colocan alícuotas de una disolución de cada analito en estudio de 50 µg/mL, según la concentración requerida, a continuación se adiciona 4 mL de  $\text{TINO}_3$  de 0.25 M, 800 µL de  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  0.1 M para el dipiridamol y 7.0 mL de KI 2.0 M, 200 µL de  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  0.1 M en el caso de la nafcilina, enrasando hasta 10 mL con agua bidestilada. Estas muestras se introducen dentro de la cubeta de medida y se registra la emisión fosforescente con las condiciones instrumentales optimizadas, registrando la intensidad de fosforescencia durante 1 hora. Se comprobó que la señal analítica es instantánea y permanece prácticamente estable al menos durante una hora

## 6. ESTABLECIMIENTO DE LOS MÉTODOS ANALÍTICO PARA DIPIRIDAMOL Y NAFCILINA

Se procedió al establecimiento del método analítico una vez optimizadas las variables experimentales e instrumentales que intervienen en cada uno de los métodos (ver Tabla A.1-2).

**Tabla A.1-2. Resumen de condiciones instrumentales y experimentales óptimas**

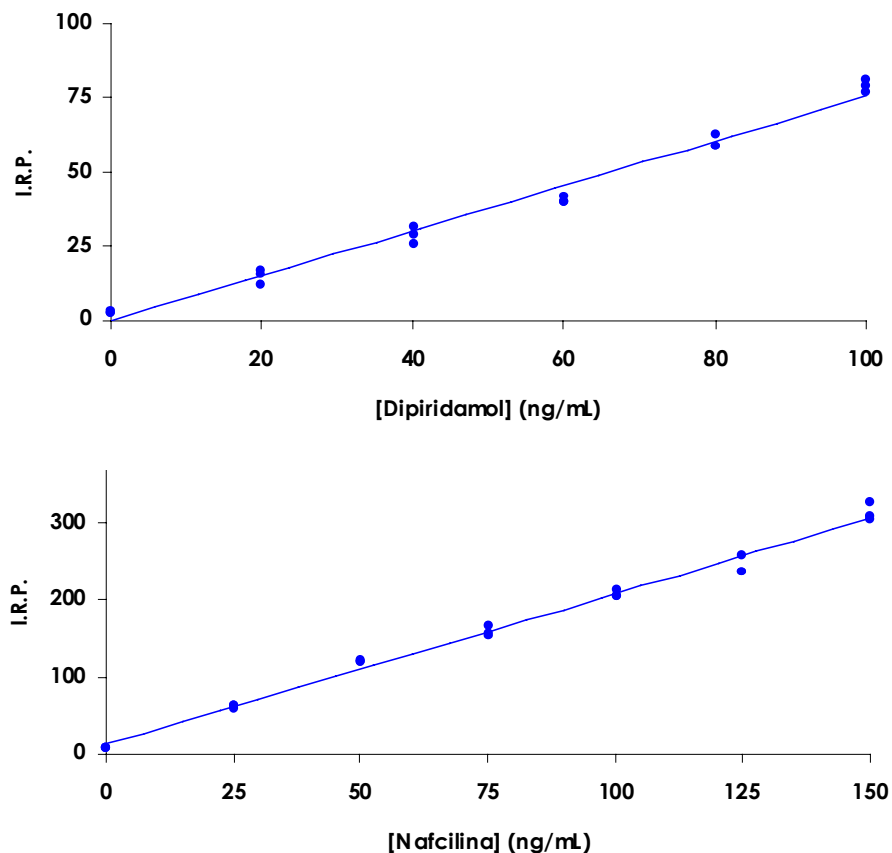
	Dipiridamol	Nafcilina
$\lambda_{\text{exc/em}}$ (nm)	305/635	285/535
Voltaje del detector (V)	950	950
$t_{d/g}$ (ms)	0.12/5.00	0.12/5.00
Ancho de rendijas <sub>exc/em</sub> (nm)	20/20	20/20
[Átomo pesado] (M)	0.25 de $\text{TINO}_3$	1.00 de KI
[ $\text{Na}_2\text{SO}_3$ ] (mM)	8	2

### 6.1. Procedimiento operatorio

En un matraz de 10 mL se colocan alícuotas de una disolución de cada analito en estudio de 50 µg/mL, según la concentración requerida, a continuación se adiciona 4 mL de  $\text{TINO}_3$  de 0.25 M, 800 µL de  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  0.1 M para el dipiridamol y 7.0 mL de KI 2.0 M, 200 µL de  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  0.1 M en el caso de la nafcilina, enrasando hasta 10 mL con agua bidestilada. Estas muestras se introducen dentro de la cubeta de medida y se registra la emisión fosforescente con las condiciones instrumentales optimizadas Tabla A.1-2, registrando de igual forma un blanco preparado en las mismas condiciones pero sin contener los principios farmacológicos en estudio.

### 6.2. Rectas de calibrado

Se estableció la recta de calibrado para cada uno de los métodos propuestos variando la concentración de dipiridamol y nafcilina, registrándose tres réplicas a cada nivel de concentración.



**Figura A.1-12. Rectas de calibrado de los principios activos estudiados.**

En la Figura A.1-12 se muestra la influencia de la concentración sobre la señal fosforescente y en la Tabla A.1-3 se muestran los parámetros más importantes de las rectas de calibrado de cada analito.

**Tabla A.1-3. Parámetros estadísticos de las rectas**

	Dipiridamol	Nafcilina
<b>Ordenada en el origen (a)</b>	2.410	11.951
<b>Pendiente (b)</b>	0.752	1.957
<b>Coefficiente de correlación (r)</b>	0.998	0.995
<b>Coefficiente de determinación (r<sup>2</sup>)</b>	0.996	0.990

### 6.3. Parámetros de fiabilidad

Para calcular el límite de detección (L.D.) y el límite de cuantificación (L.C.) según el criterio de la IUPAC, se calculó la desviación estándar de un blanco ( $s_0$ ) para ello se registraron la desviación estándar de 7 blancos y a partir de ella se calcula el L.D. y L.C..

La estimación de los parámetros característicos del método se reflejan en la Tabla A.1-4.

**Tabla A.1-4. Parámetros analíticos**

	Dipiridamol	Nafcilina
<b>Intervalo Dinámico Lineal (ng/mL)</b>	0.94-100	10.59-150
<b>Límite de Detección (ng/mL)</b>	0.94	10.59
<b>Límite de Cuantificación (ng/mL)</b>	3.20	35.30
<b>D.E.R. (%) (*ng/mL)</b>	2.7	4.1

\* 60 ng/mL para el dipiridamol y 75 ng/mL para la nafcilina

## 7. APLICACIÓN DEL MÉTODO PROPUESTO A LA DETERMINACIÓN DE DIPIRIDAMOL EN PREPARADOS FARMACÉUTICOS

El dipiridamol es un principio activo presente en medicamentos con propiedades como inhibidor de la agregación plaquetaria, solo se comercializa un medicamento en España que lo contiene como principio activo y cuyo nombre es Persantin 100 mg.

El Persantin 100 mg es un medicamento de los laboratorios Boehringer Ingelheim que se presenta en un envase de 50 o 500 grageas y pertenece a un grupo de

medicamentos que impiden la agregación de las plaquetas. Se utiliza para la prevención del trombo embolismo, en combinación con anticoagulantes orales en pacientes con implantes de válvulas cardíacas mecánicas. La composición especificada por el fabricante por cápsula es: dipiridamol (D.C.I.) 100 mg y como excipientes: fosfato de monocalcio anhidro, almidón de maíz, sílice coloidal anhidra, estearato de magnesio, sacarosa, talco, goma arábiga, dióxido de titanio (E 171), macrogol 6000, cera blanqueada y cera carnauba.

Para comprobar la aplicabilidad del método propuesto se ha realizado un estudio de recuperación en preparados farmacéuticos. Dicho estudio se llevó a cabo a una concentración de dipiridamol dentro del intervalo lineal del método propuesto.

Se preparó la muestra de fármaco de forma que tuviera la concentración de dipiridamol deseada. Persantin 100, con 100 mg de principio activo por comprimido, requiere el siguiente protocolo para preparar una disolución madre de 50 µg/mL en dipiridamol. Se tomaron 5 comprimidos, se pesaron (siendo el peso medio por comprimido de 0.299 g), se trituraron y homogeneizaron y de aquí se tomaron 0.299 g de polvo de comprimido (peso equivalente a un comprimido) que se diluyeron a 100 mL con acetona. Se tomaron 10 µL de la disolución muestra de 50 µg/mL y se les adicionaron 4 mL de TINO<sub>3</sub> de 0.25 M y 800 µL de Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> 0.1 M, enrasando hasta 10 mL con agua destilada. Se realizaron 7 réplicas llevando a cabo el registro de la intensidad de fosforescencia a las condiciones instrumentales óptimas:  $\lambda_{exc/em}$  305/635 nm, voltaje de 950 V, ancho de rendijas<sub>exc/em</sub> 20/20 nm y un td/g 0.12/2.50 ms. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla A.1-5.

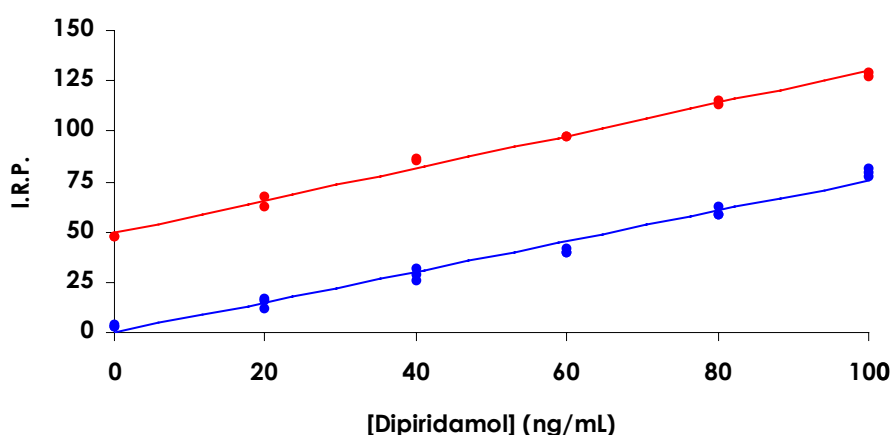
**Tabla A.1-5. Datos de réplicas en aplicación**

<b>Muestra</b>	<b>Valor nominal declarado (mg/comprimido)</b>	<b>Valor encontrado (mg/comprimido)</b>	<b>% Recuperación</b>
<b>1</b>	100	107.2	107.3
<b>2</b>	100	99.0	99.0
<b>3</b>	100	105.8	105.8
<b>4</b>	100	92.6	92.6
<b>5</b>	100	104.2	104.2
<b>6</b>	100	101.5	101.5
<b>7</b>	100	100.9	100.9
<b>Media</b>	100	101.6	101.6
<b>D.E.R. (%)</b>	-	-	6.5

### 7.1. Método de adición de patrón

Además, para comprobar que el contenido en dipiridamol en Persantin 100 es el indicado por el fabricante, se llevó a cabo el método de adición de patrón.

Para ello, en matraces de 10 mL, se colocaron 10  $\mu\text{L}$  de la disolución madre de muestra de 50  $\mu\text{g/mL}$  en dipiridamol y se le añadieron alícuotas de una disolución patrón de dipiridamol de 50  $\mu\text{g/mL}$ , de forma que la concentración variara entre 0 y 00  $\text{ng/mL}$ ; se le adicionaron 4 mL de  $\text{TINO}_3$  de 0.25 M, 800  $\mu\text{L}$  de  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  0.1 M y se



**Figura A.1-13. Recta de calibrado(—) y adición de patrón (—) del Persantin.**

enrasaron con agua bidestilada. A estas disoluciones se le midió la intensidad de fosforescencia y se obtuvo así la recta de adición de patrón (figura A.1-14).

La recta de adición de patrón obtenida de esta forma tiene una pendiente de 0.834 y una ordenada en el origen de 47.016.

Para comprobar que las pendientes del calibrado y de la recta de adición de patrón son significativamente iguales se llevó a cabo el estudio de validación propuesto por Cuadros Rodríguez y col. [74], según el cual, la  $t$  estadística de las pendientes debe ser menor que la  $t$  de Student tabulada para un  $\alpha$  de 0.01 y  $n_s + n_A - 4$  grados de libertad.

74. L. Cuadros Rodríguez, A. García Campaña, F. Alés Barrero, C. Jiménez Linares, M. Román Ceba, *J. AOAC Int.*, 78, 471 (1995).

Realizados los cálculos, los resultados obtenidos fueron:

$$S_p = 2.372$$

$$t_{tab} = 2.845$$

$$t_{cal} = 2.250$$

Por lo que se concluye que las pendientes no son significativamente distintas, ya que  $t_{tab} \geq t_{cal}$ .

Haciendo uso de la recta de adición de patrón se puede calcular la concentración de dipiridamol en el preparado farmacéutico obteniendo que ésta es de 109.9 ng/comprimido.

Se podría concluir de estos resultados que la determinación de dipiridamol en preparados farmacéuticos comerciales como Persantin 100 puede llevarse a cabo de forma rápida, simple, selectiva y sensible mediante fosforimetría a temperatura ambiente inducida por átomo pesado.







## **CAPÍTULO A.2**

# **Determinación de pesticidas mediante fosforescencia a temperatura ambiente inducida por átomos pesados en disolución**

Los trabajos derivados del presente Capítulo han sido publicados en las revistas "International Journal of Environmental and Analytical Chemistry (en prensa, 2005)" (ver ANEXO III) y en "Pest Management Science (en prensa, 2005)" (ver ANEXO IV).



## CAPÍTULO A.2

### DETERMINACIÓN DE PESTICIDAS MEDIANTE FOSFORESCENCIA A TEMPERATURA AMBIENTE INDUCIDA POR ÁTOMOS PESADOS EN DISOLUCIÓN

<b>1. GENERALIDADES DEL FUBERIDAZOL Y LA NAPROPAMIDA .....</b>	<b>141</b>
1.1. Fuberidazol .....	141
1.1.1. Nomenclatura y estructura molecular .....	141
1.1.1. Propiedades y uso .....	141
1.1.1. Métodos de determinación del fuberidazol .....	142
1.2. Napropamida .....	143
1.2.1. Nomenclatura y estructura molecular .....	143
1.2.2. Propiedades y uso .....	143
1.2.3. Métodos de determinación de la napropamida .....	144
<b>2. ESTUDIOS PRELIMINARES DE VARIABLES EXPERIMENTALES DEL FUBERIDAZOL Y LA     NAPROPAMIDA.....</b>	<b>145</b>
<b>3. CARACTERÍSTICAS ESPECTROSCÓPICAS FUBERIDAZOL Y LA NAPROPAMIDA .....</b>	<b>146</b>
3.1. Espectros de fosforescencia .....	146
3.2. Curva de decaimiento .....	147
<b>4. SELECCIÓN DE LOS PARÁMETROS INSTRUMENTALES DE MEDIDA FUBERIDAZOL Y LA     NAPROPAMIDA.....</b>	<b>148</b>
4.1. Optimización del voltaje del detector .....	148
4.2. Optimización del tiempo de demora e integración.....	149
4.3. Optimización del ancho de rendijas .....	150
<b>5. SELECCIÓN DE VARIABLES EXPERIMENTALES FUBERIDAZOL Y LA NAPROPAMIDA .....</b>	<b>151</b>
5.1. Átomo pesado perturbador.....	151
5.2. Sistema de desoxigenación .....	153
5.3. Influencia de disolventes orgánicos .....	154
5.4. Influencia del pH .....	155
5.5. Estabilidad con el tiempo .....	156
<b>6. ESTABLECIMIENTO DE LOS MÉTODOS ANALÍTICOS PARA FUBERIDAZOL Y NAPROPAMIDA ..</b>	<b>157</b>
6.1. Procedimiento operatorio .....	157
6.2. Recta de calibrado .....	158
6.3. Parámetros de fiabilidad .....	159
<b>7. ESTUDIO DE INTERFERENTES PARA FUBERIDAZOL Y NAPROPAMIDA.....</b>	<b>159</b>

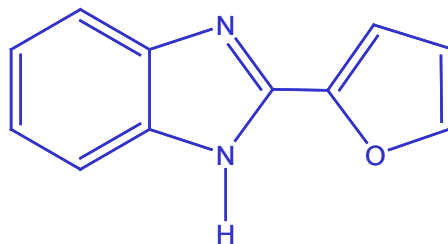
<b>8. APLICACIONES DE LOS MÉTODOS PROPUESTOS .....</b>	<b>160</b>
8.1. Determinación de fuberidazol en agua.....	160
8.2. Determinación de napropamida en agua y suelo.....	161

## 1. GENERALIDADES DEL FUBERIDAZOL Y LA NAPROPAMIDA

### 1.1. Fuberidazol

#### 1.1.1. Nomenclatura y estructura molecular

El fuberidazol es un fungicida cuyo nombre IUPAC es 2-(2-furil)benzimidazol. Su fórmula molecular es  $C_{11}H_8N_2O$  (posee un peso molecular de 184.2 g/mol) y su estructura se muestra en la Figura A.2-1.



**Figura A.2-1. Estructura molecular del fuberidazol.**

#### 1.1.2. Propiedades y uso

En condiciones ambientales normales es un sólido de finos cristales de color marrón y presenta un punto de fusión de 292 °C. Su solubilidad en agua es de 200 mg/L a pH 4 y de 71 mg/L a pH 7, mientras que en isopropanol es de 31 mg/L y en tolueno de 0.35 mg/L.



Se trata de un fungicida sistemático utilizado específicamente contra la acción de un hongo muy común como es el *Fusarium spp*, el cual ataca a todas las partes de la planta.

### 1.1.3. Métodos de determinación del fuberidazol

Numerosos métodos fluorimétricos han sido desarrollados para la determinación del fuberidazol tanto individualmente como en mezclas. En 1994, Sánchez y col. propusieron un método sencillo para la determinación de este compuesto en agua de riego con la medida directa de fluorescencia, con límites de detección del orden de las pocas  $\mu\text{g/mL}$  [1], o con la utilización de técnicas previas de preconcentración la resolución de mezclas complejas [2-4]. También se han desarrollado métodos con la utilización de los tridimensionales de fluorescencia [5], así como la utilización de sincrónicos para la resolución de mezclas [6-8].

También se han propuesto métodos fluorescentes acoplados a sistemas automáticos de inyección en flujo para la determinación conjunta de fuberidazol y tiabendazol en agua [9], y con la ayuda de la calibración multivariante para la determinación conjunta de tres pesticidas [10].

Las ciclodextrinas se han utilizado para la determinación del fuberidazol junto con otros funguicidas, midiendo la fluorescencia de los complejos de inclusión formados [11].

Recientemente se han publicado varios trabajos mediante el desarrollo de optosensores fluorescentes utilizando como resina una C-18 para la determinación de este analito en mezclas, tanto en aguas como en productos comerciales, obteniendo muy buenos resultados [12, 13].

- 
1. F.G. Sánchez, A.A. Gallardo. *Microchem. J.*, 50 (1994) 161.
  2. A.G. Frenich, D.P. Zamora, J.L.M. Vidal, M.M. Galera. *Anal. Chim. Acta*, 477 (2003) 211.
  3. M.M. Galera, D.P. Zamora, J.L.M. Vidal, A.G. Frenich, A. Espinosa-Mansilla, A.M. de la Peña, F.S. López. *Talanta*, 59 (2003) 1107.
  4. D.P. Zamora, J.L.M. Vidal, M.M. Galera, A.G. Frenich, J.L.L. González, M.R. Arahal. *Talanta*, 60 (2003) 335.
  5. D.P. Zamora, M.M. Galera, A.G. Frenich, J.L.M. Vidal. *Analyst*, 125 (2000) 1167.
  6. G. de Armas, E. Becerra, A. Cladera, J.M. Estela, V. Cerdá. *Anal. Chim. Acta*, 125 (2000) 1167.
  7. M.J. Rodríguez-Cuesta, R. Bosque, F.X. Rius, D.P. Zamora, M.M. Galera, A.G. Frenich. *Anal. Chim. Acta*, 491 (2003) 47.
  8. A.G. Frenich, D.P. Zamora, M.M. Galera, J.L.M. Vidal. *Anal. Bioanal. Chem.*, 375 (2003) 974.
  9. L.F. García, J.J. Aarón. *Mikrochim. Acta*, 126 (1997) 289.
  10. G de Armas, M. Miró, J.M. Estela, V. Cerdá. *Anal. Chim. Acta*, 471 (2002) 173.
  11. M. Lezcano, W. Al-Soufi, M. Novo, E. Rodríguez-Nuñez, J.V. Tato. *J. Agric. Food Chem.*, 50 (2002) 108.
  12. J.F.G. Reyes, P.O. Barrales, A.M. Díaz. *J. Agric. Food Chem.*, 52 (2004) 2197.
  13. J.F.G. Reyes, E.J.L. Martínez, P.O. Barrales, A.M. Díaz. *Talanta*, 64 (2004) 742.

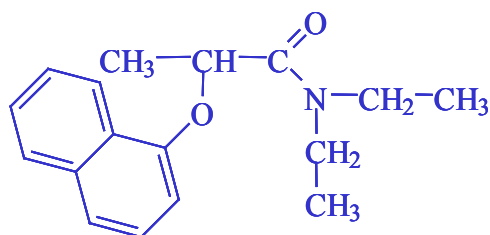
Recientemente ha sido publicado un método de HPLC con detección fluorescente para la determinación de un grupo de fungicidas entre los que se encuentra el fuberidazol, realizando una extracción previa con micelas, obteniendo un LD para el fuberidazol de 0.15 µg/L [14].

## 1.2. Napropamida

### 1.2.1. Nomenclatura y estructura molecular

La napropamida es un herbicida cuyo nombre IUPAC es (RS)-N,N-dietil-2-(1-naftaleniloxi)propamida.

La fórmula molecular de este compuesto es  $C_{17}H_{21}NO_2$  tal y como se observa en la Figura A.2-1, posee un peso molecular de 271.4 g/mol.



**Figura A.2-2. Estructura molecular de la napropamida.**

### 1.2.2. Propiedades y uso

Compuesto de punto de fusión de unos 75 °C, cuya solubilidad en agua es de 73 mg/L, mientras que en acetona y etanol es >1000 g/L, en keroseno de 62 g/L y de 15 g/L en hexano.

Se trata de un herbicida selectivo usado para el tratamiento de la maleza en cultivos de tomates, fresas, cítricos, patatas...etc.

---

14. R. Halko, C.P. Sanz, Z.S. Ferrera, J.J.S. Rodríguez. *Chromatographia*, 60 (2004) 151.

### 1.2.3. Métodos de determinación de la napropamida

Han sido descritos numerosos métodos cromatográficos para la determinación de este herbicida. Baez y col. Llevaron a cabo un método de cromatografía de gases con una extracción en fase sólida previa, obteniendo unos límites de detección bastante buenos para su aplicación a aguas [15,16]. Pero han sido más numerosos los métodos de cromatografía líquida de alta resolución publicados para llevar a cabo la determinación de la napropamida [17-20]. Recientemente Trajkovska y col. han llevado a cabo un método con extracción en fase sólida y detección por diodo array para la determinación de este herbicida en vino, con unos límites de detección del orden de los 4 ng/mL [21].

También ha sido utilizada la fluorescencia para la determinación de la napropamida en todo tipo de matrices. Pulgarín y col. propusieron un método mediante fluorescencia sensibilizada para su determinación en productos comerciales, suelo y vegetales (pepinos y tomates), obteniendo muy buenos resultados [22].

Tang y col. han aprovechado la interacción de la napropamida con la  $\beta$ -ciclodextrina, para su determinación mediante fluorescencia en agua de río, con unos límites de detección de 1.1 ng/mL [23].

Ha sido desarrollado un método mediante fosforescencia a temperatura ambiente en medios miscelares para la determinación en suelo, pepinos y tomates, utilizando SDS como agente miscelar y TINO<sub>3</sub> como átomo pesado. Obteniendo un límite de detección de 16 ng/mL, y una recuperación en todas las matrices analizadas del orden del 100% [24].

- 
15. M. Baez, M. Rodríguez, O. Lastra. *Bol. Soc. Chilena Quim.*, 42 (1997) 457.
  16. M.E. Baez, M. Rodríguez, O. Lastra, P. Contreras. *HRC-J. High Resolut. Chromatogr.*, 20 (1997) 591.
  17. H. Uemori, K. Yoshida, S. Matsuura. *Bunseki Kagaku*, 44 (1995) 443.
  18. L. Toribio, M.J. del Nozal, J.L. Bernal, J.J. Jiménez, M.L. Serna. *J. Chromatogr. A*, 823 (1998) 163.
  19. C.F. Cao, Z. Wang, L. Urruty, J.J. Pommier, M. Montury. *J. Agric. Food Chem.*, 49 (2001) 5092.
  20. R. Halko, M. Hutta. *Fresenius Environ. Bull.*, 11 (2002) 22.
  21. V. Trajkovska, S. Petrovska-Jovanovi, M. Cvetkovski. *Anal. Lett.*, 36 (2003) 2291.
  22. J.A.M. Pulgarín, L.F.G. Bermejo. *Anal. Chim. Acta*, 491 (2003) 37.
  23. B. Tang, W.L. Liu, Y. Wang, Z.Z. Chen. *Anal. Chim. Acta*, 509 (2004) 145.
  24. J.A.M. Pulgarín, L.F.G. Bermejo. *J. Agric. Food Chem.*, 50 (2002) 1002.



## 2. ESTUDIOS PRELIMINARES DE VARIABLES EXPERIMENTALES DEL FUBERIDAZOL Y LA NAPROPAMIDA

Se han realizado estudios preliminares de las variables experimentales más importantes (disolvente orgánico, átomo pesado y desoxigenante) que pueden afectar a la emisión fosforescente para los dos pesticidas objeto de estudio usando unas condiciones instrumentales preliminares (Tabla A.2-1), para establecer unas condiciones de partida a las cuales los dos compuestos presenten fosforescencia en disolución y a temperatura ambiente.

**Tabla A.2-1. Parámetros instrumentales preliminares**

<b>Parámetros instrumentales</b>	<b>Valor seleccionado</b>
Voltaje del detector	950 V
Tiempo de demora/integración	0.12/5.00 ms
Ancho de rendijas <sub>exc/em</sub>	20/20 nm

Una variable experimental de vital importancia es el disolvente orgánico utilizado. La madre de ambos analitos se preparó en agua, y a continuación se comprobó como afectaba a la emisión fosforescente la adición de pequeñas cantidades de disolvente orgánico que pudiera favorecer la solubilización del analito.

Se probaron igualmente dos átomos pesados (KI y TINO<sub>3</sub>) y se realizó un estudio preliminar del efecto sobre la emisión fosforescente de la concentración de Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>.

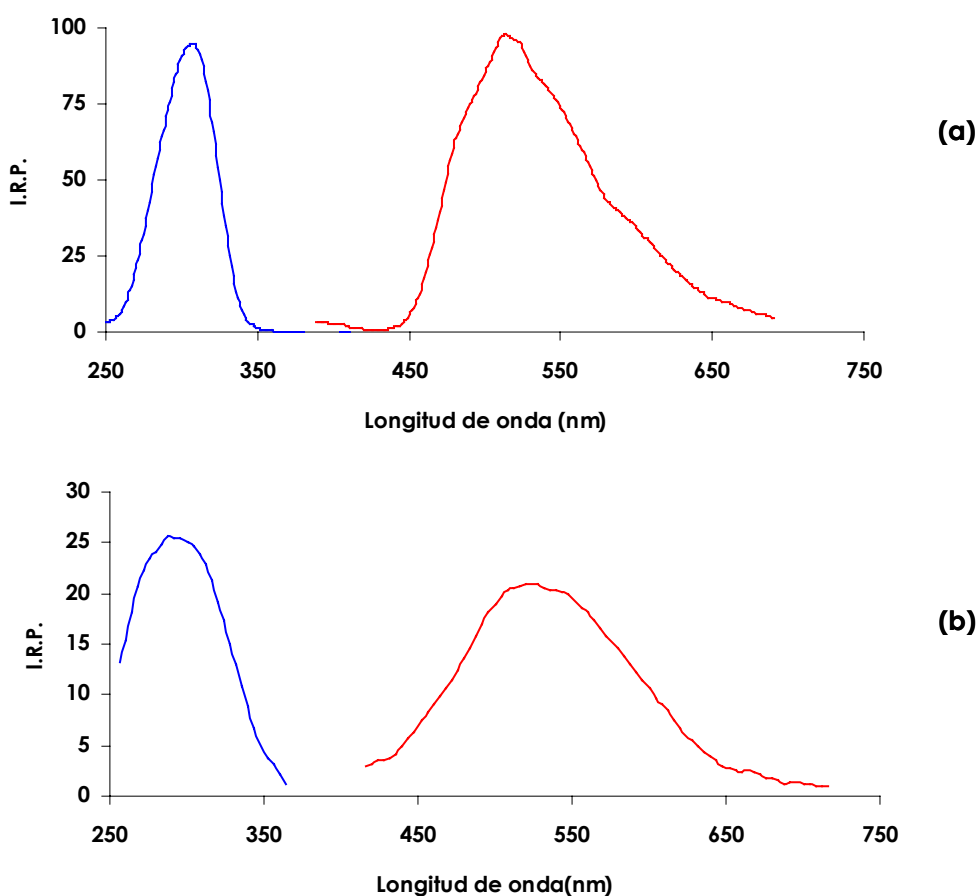
De estos estudios previos se pudo concluir que para ambos analitos los mejores resultados se obtenían con la adición de un 30% de acetonitrilo y utilizando como átomo pesado el KI, con una concentración de 0.8 M, mientras que como desoxigenante fue necesaria una concentración de 10 mM para el caso del fuberidazol y de 4 mM para la napropamida.

A partir de estos valores se comenzó la optimización individual de las distintas variables instrumentales y experimentales para cada uno de los pesticidas independientemente.

### 3. CARACTERÍSTICAS ESPECTROSCÓPICAS DEL FUBERIDAZOL Y LA NAPROPAMIDA

#### 3.1. Espectros de fosforescencia.

Se llevó a cabo un estudio sobre las características fosforescentes a temperatura ambiente en disolución del fuberidazol y de la napropamida en presencia de KI. Para ello, se tomaron 4  $\mu\text{L}$  para el fuberidazole y 60  $\mu\text{L}$  para el caso de la napropamida de una disolución de 50  $\mu\text{g/mL}$  de cada analito en estudio, añadiéndoles 3 mL de acetonitrilo y 4 mL de KI de 2.0 M, 1 mL de  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  0.1 M para el fuberidazol y 4.0 mL de KI 2.0 M, 400  $\mu\text{L}$  de  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  0.1 M en el caso de la napropamida, enrasando hasta 10 mL con agua bidestilada. Se registraron los espectros de excitación y de emisión fijando unas condiciones experimentales que en ambos casos fueron de 950 V para el voltaje del detector, ancho de rendijas<sub>exc/em</sub> de 20/20 nm, un tiempo de demora de 0.12 ms y un tiempo de integración de 5.00 ms. Los espectros de excitación y emisión fosforescentes obtenidos en estas condiciones se muestran en la Figura A.2-3.



**Figura A.2-3. Espectros de excitación (—) y emisión (—) fosforescentes del fuberidazol (a) y de la napropamida (b).**

Por tanto, las longitudes de onda de medida de la señal fosforescente para el resto del trabajo seleccionadas fueron:  $\lambda_{exc/em}$  308/515 nm y  $\lambda_{exc/em}$  290/520 nm para fuberidazol y napropamida respectivamente.

### 3.2. Curva de decaimiento.

Para el cálculo del tiempo de vida de los dos principios activos se registró la curva de decaimiento de la intensidad de fosforescencia con el tiempo de una muestra preparada siguiendo la metodología previamente descrita. Las condiciones instrumentales empleadas fueron:  $\lambda_{exc/em}$  308/515 nm y  $\lambda_{exc/em}$  290/520 nm para fuberidazol y napropamida respectivamente, voltaje de 950 V, ancho de rendija $_{S_{exc/em}}$  20/20 nm y un  $t_{d/g}$  0.12/5.00 ms para ambos compuestos. Las curvas de decaimiento obtenidas se presentan en la Figura A.2-4.

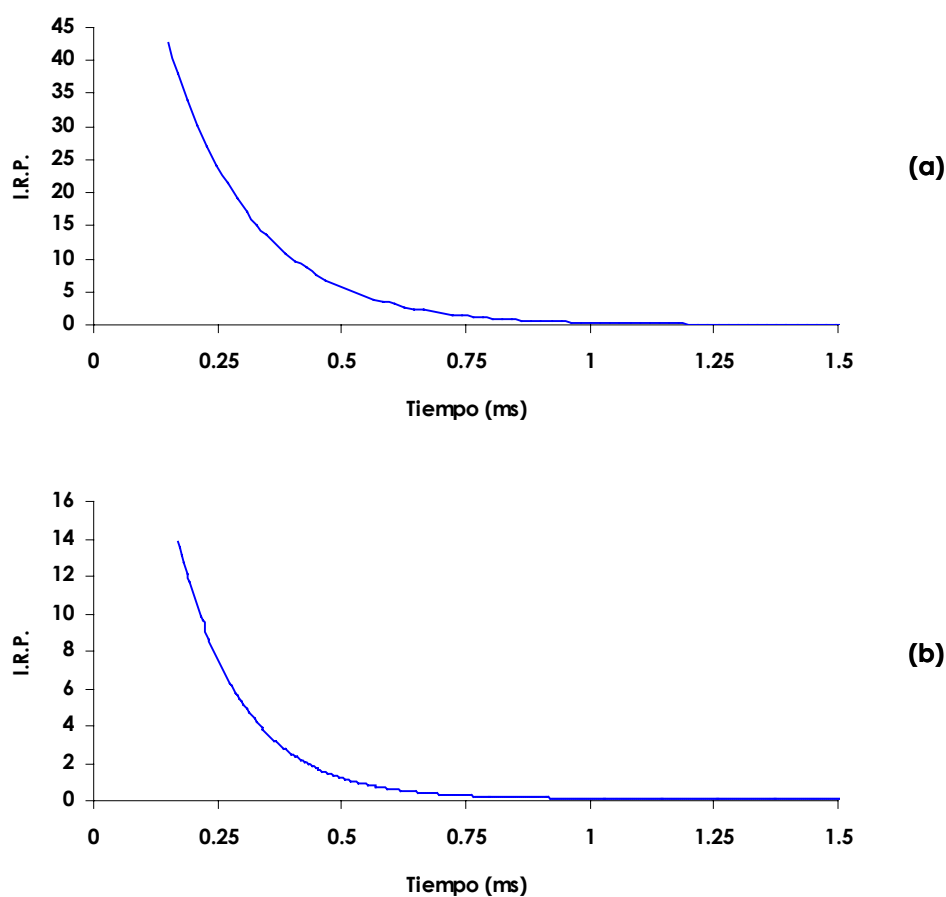


Figura A.2-4. Curvas de decaimiento del fuberidazol (a) y de la napropamida (b).

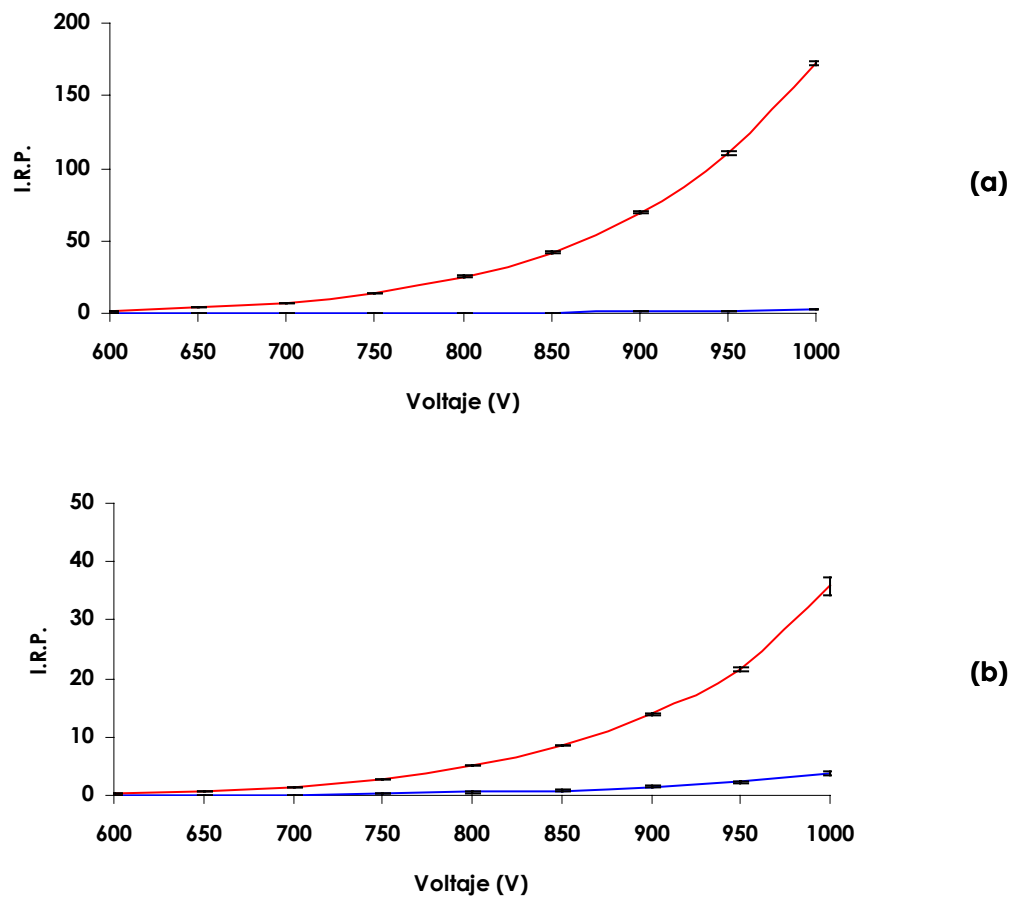
Se concluye que, en estas condiciones experimentales los tiempos de vida son 172  $\mu$ s para el fuberidazole y de 150  $\mu$ s para la napropamida.

#### **4. SELECCIÓN DE LOS PARÁMETROS INSTRUMENTALES PARA EL FUBERIDAZOL Y LA NAPROPAMIDA**

##### **4.1. Optimización del voltaje del detector**

Para optimizar este parámetro, se prepararon disoluciones individuales de cada analito en estudio, añadiéndoles 3 mL de acetonitrilo y 4 mL de KI de 2.0 M, 1 mL de Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> 0.1 M para el fuberidazol y 4.0 mL de KI 2.0 M, 400  $\mu$ L de Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> 0.1 M en el caso de la napropamida, enrasando hasta 10 mL con agua bidestilada. Igualmente se preparó un blanco sin contener los analitos. Las disoluciones se introdujeron en la cubeta de medida, se registró la señal analítica y la desviación estándar de las medidas conforme se variaba el voltaje del detector mediante un registro de 20 réplicas a las siguientes condiciones instrumentales:  $\lambda_{exc/em}$  308/515 nm y 290/520 nm para fuberidazol y napropamida respectivamente, ancho de rendijas<sub>exc/em</sub> 20/20 nm y un  $t_{d/g}$  0.12/5.00 ms para ambos casos. Los resultados se muestran en la Figura A.2-5.

Se seleccionó como valor óptimo de voltaje para el fuberidazole 950 V, mientras que el caso de la napropamida el valor escogido fue de 1000 V.



**Figura A.2-5. Influencia del voltaje del detector sobre la intensidad de fosforescencia del analito (—) y de su blanco (—) para el fuberidazol (a) y la napropamida (b).**

#### 4.2. Optimización del tiempo de demora e integración

Se optimizaron dichos parámetros y para ello se preparó una muestra siguiendo el procedimiento descrito hasta ahora y un blanco de igual forma pero sin contener a los pesticidas.

Se registró la intensidad de fosforescencia y la desviación estándar relativa a distintos  $t_d$  y  $t_g$  llevando a cabo 20 réplicas. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura A.2-6.

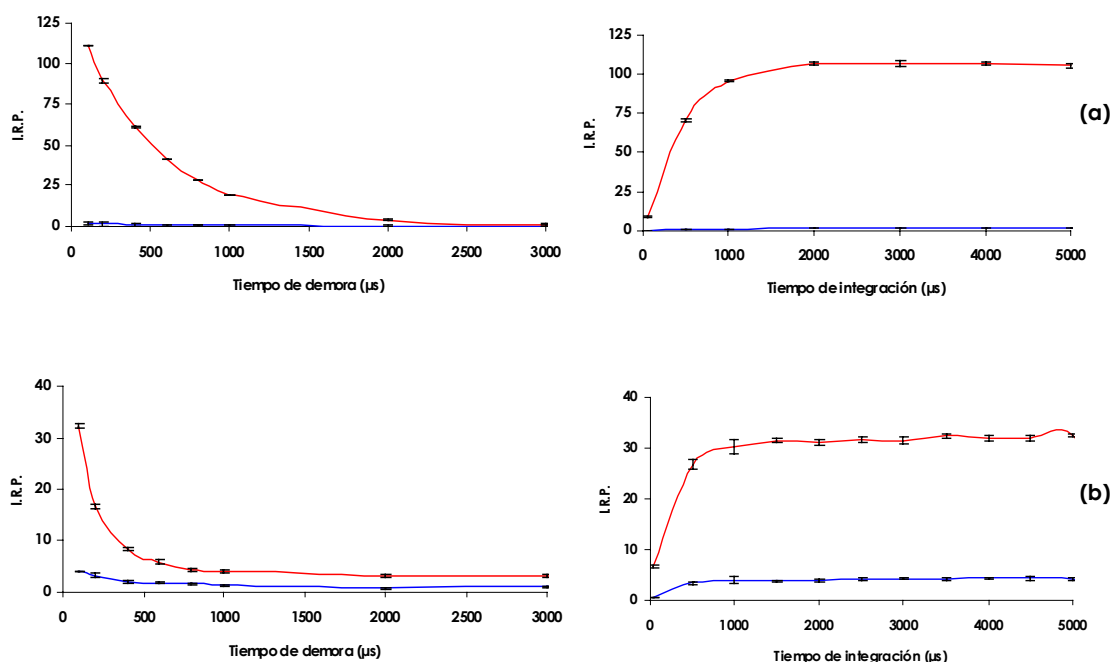
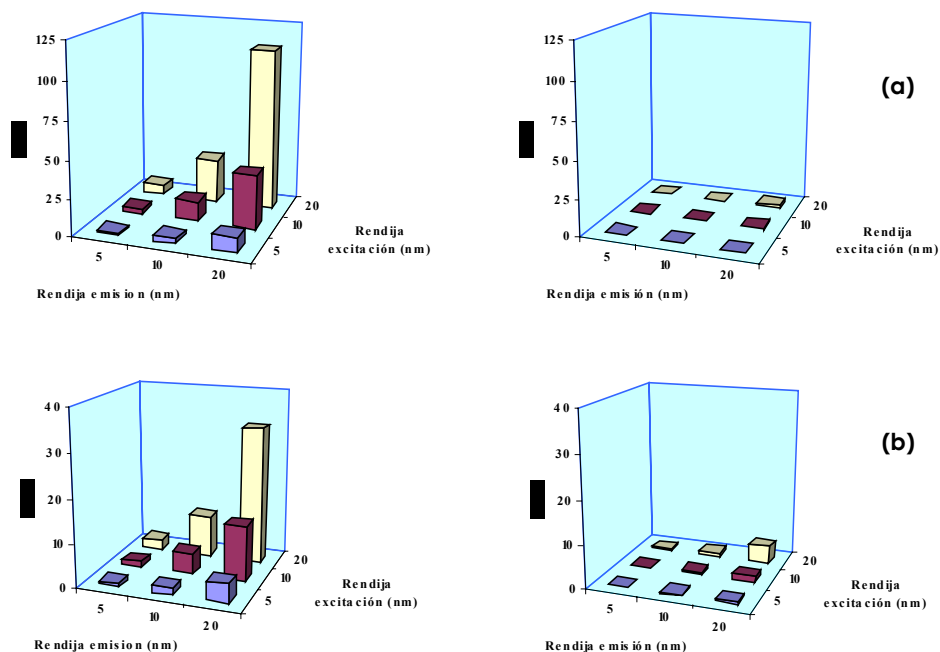


Figura A.2-6. Influencia del tiempo de demora y de integración sobre la intensidad de fosforescencia del analito (—) y de su blanco (—) para fuberidazol (a) y la napropamida (b).

A la vista de los resultados se escogieron unos valores para los cuales la relación de intensidades fuese máxima. Los valores seleccionados han sido para ambos pesticidas: tiempo de demora de 0.1 ms y un tiempo de integración de 5.0 ms.

### 4.3. Optimización del ancho de rendija

Para ver el efecto que produce la anchura de estas rendijas sobre la señal analítica se preparó una muestra y un blanco, de igual forma que en el apartado anterior, y se fijaron los parámetros instrumentales óptimos, hasta ahora estudiados, variando la anchura de las rendijas. Este estudio se ve reflejado en la Figura A.2-7.



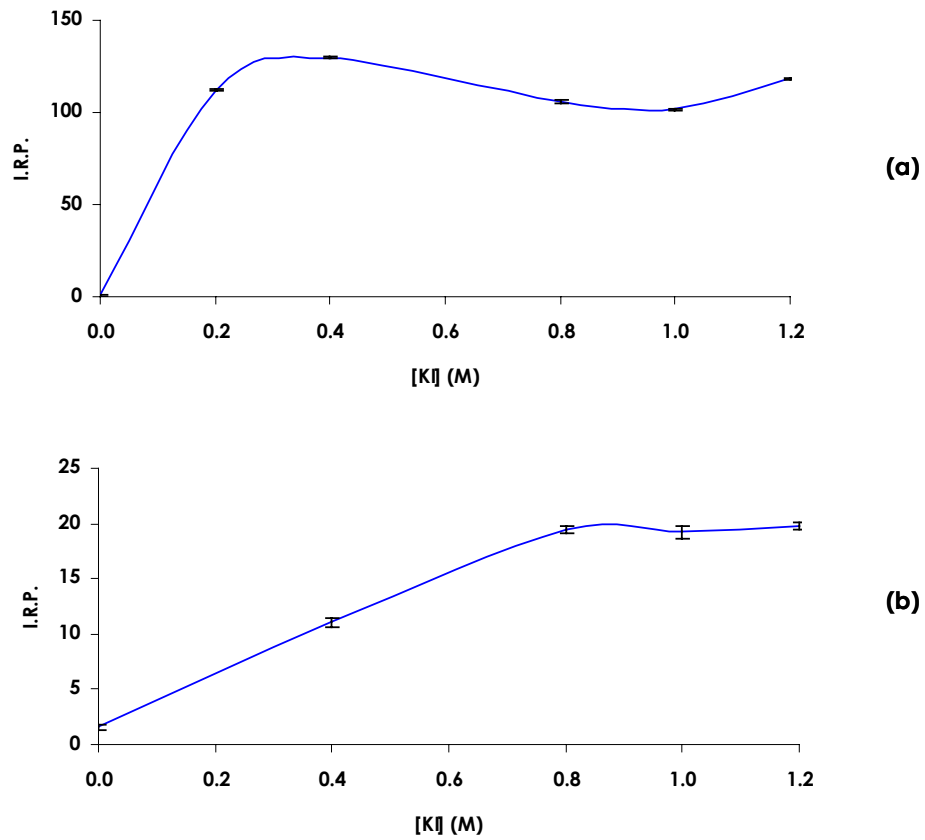
**Figura A.2-7. Influencia del ancho de rendija sobre la intensidad de fosforescencia de una muestra y de su blanco para los analitos (a) fuberidazol y (b) napropamida.**

Como podemos observar, un aumento de la anchura de las rendijas produce un aumento en la emisión fosforescente, mientras que el ruido prácticamente no se ve afectado por este factor. La mayor señal analítica se tiene cuando se usa la mayor apertura posible de las rendijas. Por ello, para el resto del trabajo experimental se ha seleccionado como óptimo para los dos analitos en estudio un ancho de rendija $_{S_{exc/em}}$  de 20/20 nm.

## 5. SELECCIÓN DE LAS VARIABLES EXPERIMENTALES PARA EL FUBERIDAZOL Y LA NAPROPAMIDA

### 5.1. Átomo pesado perturbador

Como se ha mencionado anteriormente, es imprescindible la presencia de átomo pesado perturbador que favorezca el cruce entre sistemas para que se produzca señal fosforescente. Recordamos que en los trabajos previos ya escogimos como átomo pesado óptimo el KI.



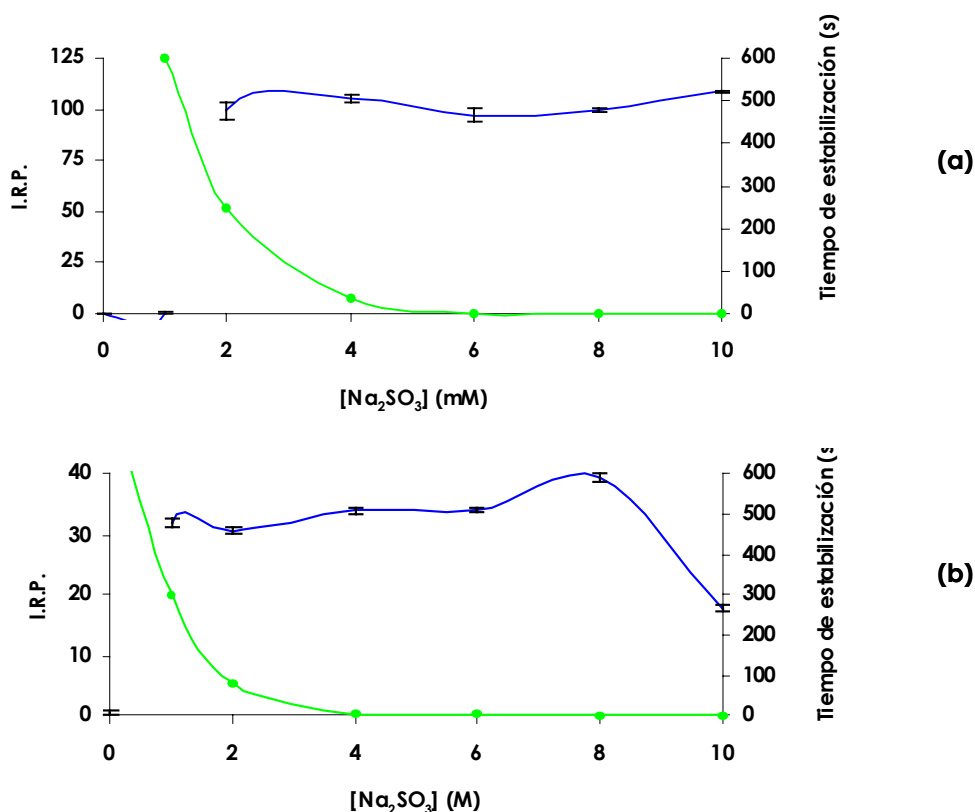
**Figura A.2-8. Influencia del tipo y la concentración de átomo pesado sobre la intensidad de fosforescencia para el fuberidazol (a) y la napropamida (b). [Fuberidazol] = 15 ng/mL y [napropamida] = 300 ng/mL,  $\lambda_{exc/em}$  305/635 nm y  $\lambda_{exc/em}$  285/535 nm para fuberidazol y napropamida respectivamente, voltaje de 950 V, ancho de rendijas  $_{exc/em}$  20/20 nm y un  $t_{d/g}$  0.12/5.00 ms.**

En la Figura A.2-8 se puede observar como afectan la presencia de este átomo pesado a los pesticidas objeto de estudio, pudiendo observar que para el caso del fuberidazol la respuesta presenta claramente una señal estable a partir de una concentración de 0.2 M, escogiendo como óptimo para este caso la concentración de 0.4 M de KI. En el caso de la napropamida a medida que aumenta la concentración del átomo pesado aumenta la señal fosforescente hasta que llega a una meseta o zona de saturación en la que la señal se estabiliza, escogiendo como óptimo para este caso una concentración de 1.0 M de KI.



## 5.2. Sistema de desoxigenación

La concentración de  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  se optimizó midiendo la señal de fosforescencia y el tiempo de estabilización de disoluciones que contenían cantidades variables de  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  0.1 M a las condiciones instrumentales y experimentales optimizadas hasta el momento, obteniendo de esta forma los resultados mostrados en la Figura A.2-9.



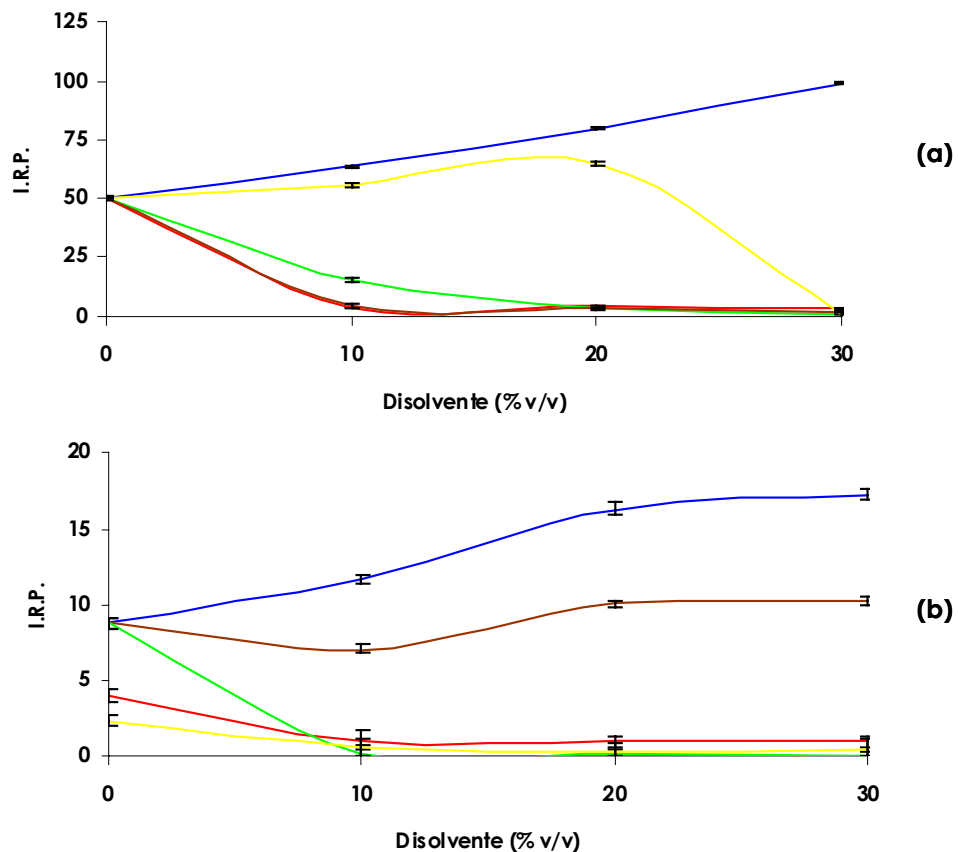
**Figura A.2-9. Intensidad (—) y tiempo de estabilización (—) de la señal fosforescente en función de la concentración de  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  para el fuberidazol (a) y la napropamida (b).**

De la figura se puede deducir que en el caso del fuberidazol a partir de una concentración de 4 mM se produce una estabilización de la señal fosforescente y la señal aparece instantáneamente, por lo que se eligió 8 mM como concentración óptima. Para el caso de la napropamida se observa que a partir de 1 mM la señal fosforescente se estabiliza, pero a partir de 2 mM conseguimos obtener la señal instantáneamente pero que a partir de una concentración de 8 mM la señal decae significativamente, por lo que se eligió como óptimo para el resto de trabajo una concentración de 4 mM.

### 5.3. Influencia de disolventes orgánicos

Se han estudiado distintos disolventes orgánicos miscibles con agua, midiendo a las condiciones instrumentales y experimentales optimizadas hasta ahora la señal fosforescente en presencia de diferentes porcentajes de disolvente orgánico.

En la figura A.2-10 se pueden observar los resultados del efecto de la presencia de disolventes orgánicos en la emisión fosforescente de los pesticidas.



**Figura A.2-10. Efecto del disolvente orgánico sobre la señal fosforescente para el fuberidazol (a) y la napropamida (b). Etanol (—), metanol (—), acetonitrilo (—), dimetilformamida (—) y acetona (—).**

Se puede comprobar que para el caso del fuberidazol la adición de dimetilformamida, acetona y metanol hace que la señal fosforescente disminuya rápidamente, mientras que la adición de etanol hasta un 20 %v/v aumenta la emisión y que a partir de ese valor sufre un gran descenso. La adición de acetonitrilo favorece la señal fosforescente, aumentando la señal conforme aumente la cantidad adicionada hasta un 30 %v/v, máximo porcentaje ensayado por considerarse excesivo utilizar concentraciones superiores al trabajar en disolución acuosa.

Se observa en el estudio realizado a la napropamida que la presencia de etanol, dimetilfosmamida y acetona disminuyen considerablemente la señal fosforescente, mientras que la presencia de metanol prácticamente no afecta a la respuesta, mientras que al adicionar acetonitrilo la señal fosforescente sufre un aumento.

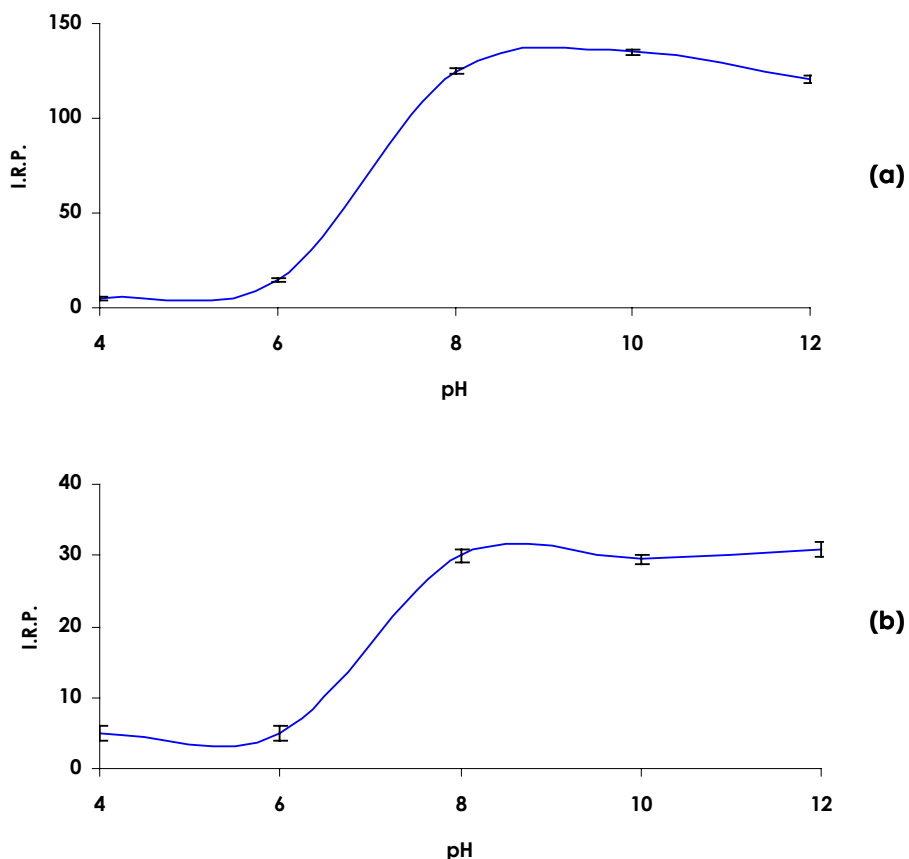
De un estudio tan amplio de una variable tan importante como es el disolvente orgánico se puede obtener gran cantidad de información, se puede observar como con la utilización de etanol como disolvente orgánico tan solo el fuberidazol emite señal fosforescente, mientras que con la utilización de porcentajes superiores al 10 % de dimetilformamida solo podemos observar la napropamida, esta información puede ser muy importante para futuros trabajos.

Para continuar nuestra optimización con la obtención de los mejores condiciones de medida en la metodología HAI-RTP, se escogió como disolvente orgánico para ambos casos la adición de un 30 (% v/v) de acetonitrilo.

#### **5.4. Influencia del pH**

Se realizó un estudio de cómo afecta el pH, variando el pH entre 4 y 12 (ver Figura A.2-11), observándose como a pH superiores a 8 la señal es prácticamente estable, lógico tenemos en cuenta el rango de pH de trabajo del sulfito sódico como desoxigenante.

Por lo tanto se puede concluir que como en nuestra metodología de trabajo el pH oscila entre 8-9, no es necesario ajustar el pH, aunque estas experiencias indican la posibilidad de su uso en caso de ser necesarias.



**Figura A.2-11. Efecto del pH sobre la señal de fosforescencia para el fuberidazol (a) y la napropamida (b).**

### 5.5. Estabilidad con el tiempo

Se comprobó la estabilidad de la intensidad de fosforescencia con el tiempo registrando la intensidad de fosforescencia durante 1 hora. Para ello se prepararon disoluciones de fuberidazol y napropamida siguiendo el siguiente procedimiento operatorio: se prepararon disoluciones individuales de cada analito en estudio, añadiéndoles 3 mL de acetonitrilo y 4 mL de KI de 2.0 M, 1 mL de Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> 0.1 M para el fuberidazol y 4.0 mL de KI 2.0 M, 400 μL de Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> 0.1 M en el caso de la napropamida, enrasando hasta 10 mL con agua bidestilada. Las disoluciones se introdujeron en la cubeta de medida, se registró la señal analítica durante una hora a las siguientes condiciones instrumentales:  $\lambda_{exc/em}$  308/515 nm y 290/520 nm para fuberidazol y napropamida respectivamente, ancho de rendijas<sub>exc/em</sub> 20/20 nm y un  $t_{d/g}$  0.12/5.00 ms para ambos casos.

Se comprobó que la señal analítica es instantánea y que permanece prácticamente estable al menos durante una hora, tiempo más que suficiente para realizar las medidas analíticas oportunas.

## 6. ESTABLECIMIENTO DE LOS MÉTODOS ANALÍTICOS

Se procedió al establecimiento del método analítico una vez optimizadas las variables experimentales e instrumentales que intervienen en cada uno de los métodos (ver Tabla A.2-2). En este apartado se han establecido los procedimientos operatorios, las rectas de calibrado y los parámetros de fiabilidad.

**Tabla A.2-2. Resumen de condiciones instrumentales y experimentales óptimas**

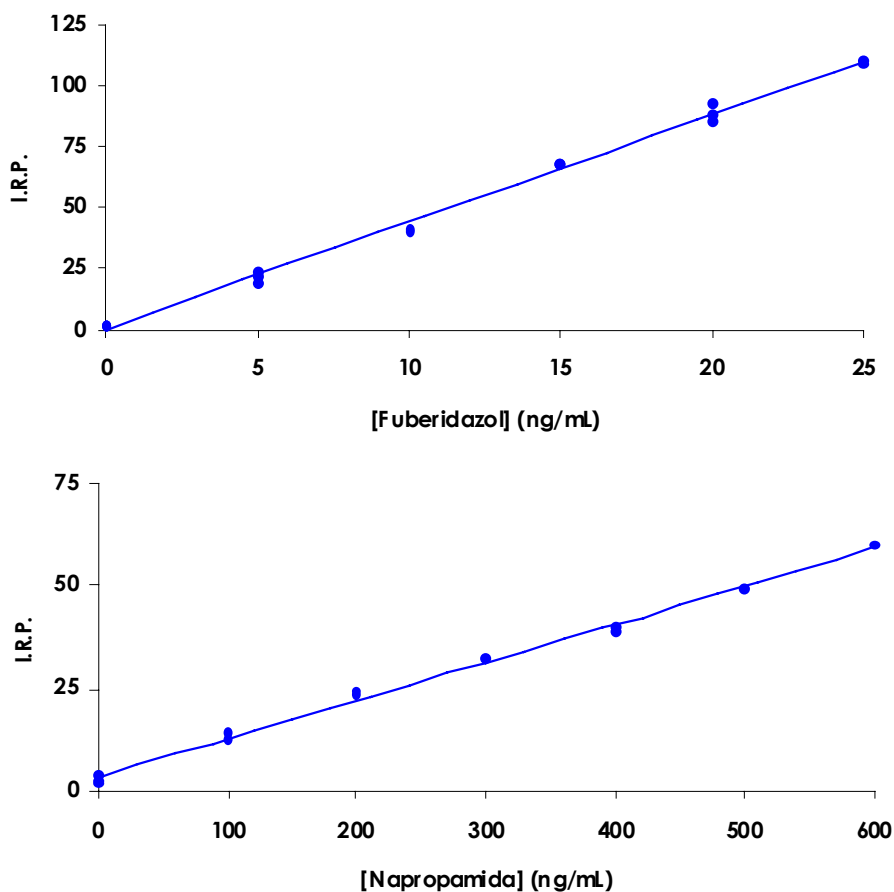
	<b>Fuberidazol</b>	<b>Napropamida</b>
$\lambda_{exc/em}$ (nm)	308/515	290/520
<b>Voltaje del detector (V)</b>	950	1000
$t_{d/g}$ (ms)	0.10/5.00	0.10/5.00
<b>Ancho de rendijas<math>_{exc/em}</math> (nm)</b>	20/20	20/20
<b>Acetonitrilo % (v/v)</b>	30	30
<b>[KI] (M)</b>	0.4	1.0
<b>[Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>] (mM)</b>	8	4

### 6.1. Procedimiento operatorio

En un matraz de 10 mL se colocan alícuotas de una disolución de cada analito en estudio de 50 µg/mL, según la concentración requerida, a continuación se adicionan, 4 mL de KI de 2.0 M y 1 mL de Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> 0.1 M para el fuberidazol y 3 mL de acetonitrilo, 4.0 mL de KI 2.0 M, 400 µL de Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> 0.1 M en el caso de la napropamida, enrasando hasta 10 mL con agua bidestilada. Estas muestras se introducen dentro de la cubeta de medida y se registra la emisión fosforescente con las condiciones instrumentales optimizadas, registrando de igual forma un blanco preparado en las mismas condiciones pero sin contener el analito estudiado.

## 6.2. Recta de calibrado

Se estableció la recta de calibrado para los dos métodos propuestos variando la concentración de fuberidazol y napropamida, registrándose tres réplicas a cada nivel de concentración.



**Figura A.2-12. Rectas de calibrado de los pesticidas estudiados.**

En la Figura A.2-12 se muestra la influencia de la concentración sobre la señal fosforescente y en la Tabla A.2-3 se muestran los parámetros más importantes de las rectas de calibrado de cada analito.

Tabla A.2-3. Parámetros estadísticos de las rectas

	Fuberidazol	Napropamida
Ordenada en el origen (a)	4.37	3.57
Pendiente (b)	0.399	0.093
Coefficiente de correlación (r)	0.996	0.996
Coefficiente de determinación (r <sup>2</sup> )	0.992	0.992

### 6.3. Parámetros de fiabilidad

La estimación de los parámetros característicos del método se reflejan en la Tabla A.2-4.

Tabla A.2-4. Parámetros analíticos

	Fuberidazol	Napropamida
Intervalo dinámico lineal (ng/mL)	0.095-25	3.2-600
Límite de detección (ng/mL)	0.095	3.2
Límite de cuantificación (ng/mL)	0.310	10.7
D.E.R. (%) *	3.1	2.9

\* 20 ng/mL para el fuberidazol y 300 ng/mL para la napropamida

Es de destacar de los parámetros de fiabilidad el límite de detección obtenido para la determinación del fuberidazol de 95 ng/L sin necesidad de preconcentración previa de la muestra, esto da una idea del gran potencial que ofrece esta metodología.

## 7. ESTUDIO DE INTERFERENTES

Los métodos desarrollados se pretenden aplicar al análisis de aguas de consumo humano y suelos. En trabajos previos realizados por nuestro grupo de investigación se comprobó como la presencia de altas concentraciones de aniones y cationes o de sedimentos suspendidos en agua no presentan interferencia en la determinación de pesticidas en la metodología HAI-RTP [25].

25. A. Segura Carretero, C. Cruces Blanco, J.F. Fernández Sánchez, B. Cañabate Díaz, A. Fernández Gutiérrez. *J. Agric. Food Chem.*, 46 (1998) 3683.

Se han probado un gran número de pesticidas, como fueron: carbaril, carbendazina, denoxcar, ditianon, diuron, imazalil, linuron, monolinuron, naptalan, nitralin, quinolaina, quinomerac, simazina y tebutan.

Para llevar a cabo el estudio de la interferencia de pesticidas se prepararon muestras de los pesticidas a estudiar en las mismas condiciones de medida de nuestros analitos, llegando a la conclusión de que de todos ellos los únicos que potencialmente interfieren en la determinación son el tiabendazol y el carbaril, en una relación 1:1.

## 8. APLICACIÓN DE LOS MÉTODOS PROPUESTOS

### 8.1. Determinación de fuberidazol en agua

Para comprobar la aplicabilidad del método propuesto a aguas se ha realizado un estudio de recuperación. Dicho estudio se llevó a cabo para distintas concentraciones del compuesto en estudio en diferentes tipos de aguas, siempre con valores que están dentro del intervalo lineal del método propuesto.

El procedimiento operatorio seguido fue: se tomaron 2 muestras diferentes de agua (agua superficial de consumo humano y agua mineral embotellada, se enriquecieron a distintos niveles de concentración de fuberidazol (véase Tabla A.2-5). Se tomó la cantidad adecuada de disolución de átomo pesado y de sulfito sódico para conseguir una concentración final de 0.4 M de KI y 8 mM de  $\text{Na}_2\text{SO}_3$ , posteriormente se enrasó las muestras de agua a analizar.

Se realizaron tres réplicas para cada una de las muestras analizadas a cada nivel de concentración llevando a cabo el registro de la intensidad de fosforescencia a las condiciones instrumentales óptimas. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla A.2-5.





Tabla A.2-5. Datos de réplicas en aplicación

	Valor añadido (ng/mL)	Valor encontrado (ng/mL)	Porcentaje de recuperación (%)	D.E.R. (%) <sup>a</sup>	
<b>Agua</b>	Grifo 1	20	18.7	93.3	1.7
	Grifo 2	10	9.6	96.0	3.9
	Grifo 3	2.4	2.5	102.7	8.0
	Mineral 1	20	18.1	90.5	3.9
	Mineral 2	10	10.4	104.4	3.3
	Mineral 3	2.4	2.6	108.3	6.8

<sup>a</sup> para tres réplicas

Se podría concluir de estos resultados que el método propuesto puede usarse de forma simple, selectiva y sensible para la determinación de fuberidazol en muestras de agua, consiguiendo buenas características analíticas.

## 8.2. Determinación de napropamida en agua y suelos

### 8.2.1. Aplicación en agua

El método propuesto para la napropamida se aplicó a su determinación en agua a diferentes concentraciones. Dicha aplicación se llevó a cabo realizando un estudio de recuperación a diferentes concentraciones del compuesto en estudio, siempre con valores que están dentro del intervalo lineal del método propuesto.

El procedimiento operatorio seguido fue: se tomaron muestras de agua superficial de consumo humano, se enriquecieron a distintos niveles de concentración de napropamida (véase Tabla A.2-6). Se tomó la cantidad adecuada de disolución de átomo pesado y de sulfito sódico para conseguir una concentración final de 1.0 M de KI y 4 mM de Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>, posteriormente se enrasaron las muestras con el agua a analizar.

Se realizaron tres réplicas para cada una de las muestras analizadas a cada nivel de concentración llevando a cabo el registro de la intensidad de fosforescencia a las condiciones instrumentales óptimas. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla A.2-6.

### 8.2.2. Aplicación en muestras de suelo

En un vaso de precipitados de 100 mL, se colocaron 10 g. de muestra de suelo (jardines de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Granada) fortificada con la cantidad necesaria de napropamida para que la concentración final se encontrara dentro del intervalo dinámico lineal (ver Tabla A.2-6) y se le añadieron 30 mL de acetonitrilo. La muestra fue homogenizada con el disolvente de extracción, introduciéndola en un baño de ultrasonidos durante unos 5 min. La muestra a continuación se decanto y el sobrenadante se filtra con un filtro de porosidad 3. Esta extracción se repitió dos veces y posteriormente el residuo se lavó con 10 mL de acetonitrilo. Los extractos fueron unidos y llevados hasta casi sequedad en un rotavapor a 40 °C. El extracto se reconstituyo en 3 mL de acetonitrilo y se le adiciono la cantidad adecuada de disolución de átomo pesado y de sulfito sódico para conseguir una concentración final de 1.0 M de KI y 4 mM de Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>, posteriormente se enrasaron las muestras con el agua bidestilada hasta 10 mL.

**Tabla A.2-6. Estudio de recuperación en muestras de agua y suelo**

		Valor añadido (ng/mL)	Valor encontrado (ng/mL)	Porcentaje de recuperación (%)	D.E.R. (%) <sup>a</sup>
	Muestra 1	150	142.2	94.8	5.69
<b>Agua</b>	Muestra 2	300	266.4	88.8	3.53
	Muestra 3	450	424.5	94.3	2.35
	Muestra 1	200	180.8	90.4	6.34
<b>Suelo</b>	Muestra 2	300	272.4	90.8	4.25
	Muestra 3	400	373.6	93.4	3.51

<sup>a</sup>Para tres réplicas

Se podría concluir de estos resultados que es posible la determinación en muestra de agua y de suelo de fuberidazol y napropamida con la metodología propuesta de forma rápida, simple y sensible.

## **CAPÍTULO A.3**

# **Caracterización de hidrocarburos aromáticos policíclicos mediante fosforescencia a temperatura ambiente inducida por átomos pesados en disolución**

El trabajo derivado del presente Capítulo ha sido publicado en la revista "Analytica Chimica Acta 516 (2004) 213" (ver ANEXO V).



## CAPÍTULO A.3

### CARACTERIZACIÓN DE HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS MEDIANTE FOSFORESCENCIA A TEMPERATURA AMBIENTE INDUCIDA POR ÁTOMOS PESADOS EN DISOLUCIÓN

<b>1. GENERALIDADES DE LOS HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS.....</b>	<b>167</b>
1.1. Estructura molecular, nomenclatura, historia y propiedades.....	167
1.2. Fuentes de formación y distribución de los HAPs en la naturaleza.....	169
1.3. Carcinogénesis de los HAPs .....	171
1.4. Usos y formulaciones comerciales .....	174
1.4. Métodos analíticos.....	174
<b>2. ESTUDIOS PRELIMINARES DE VARIABLES EXPERIMENTALES DE LOS HAPs .....</b>	<b>180</b>
<b>3. CARACTERÍSTICAS ESPECTROSCÓPICAS DE LOS HAPs .....</b>	<b>181</b>
<b>4. SELECCIÓN DE LOS PARÁMETROS INSTRUMENTALES DE MEDIDA DE LOS HAPs .....</b>	<b>186</b>
4.1. Optimización del voltaje del detector .....	186
4.2. Optimización del tiempo de demora e integración.....	187
4.3. Optimización del ancho de rendijas .....	190
<b>5. SELECCIÓN DE VARIABLES EXPERIMENTALES DE LOS HAPs.....</b>	<b>191</b>
5.1. Optimización del tipo y concentración de átomo pesado .....	191
5.2. Optimización del sistema de desoxigenación.....	194
5.3. Influencia de disolventes orgánicos .....	197
5.4. Estabilidad con el tiempo .....	202
<b>6. ESTABLECIMIENTO DE LOS MÉTODOS ANALÍTICOS DE LOS HAPs .....</b>	<b>204</b>
6.1. Procedimiento operatorio .....	205
6.2. Recta de calibrado .....	205
6.3. Parámetros de fiabilidad .....	208



## 1. GENERALIDADES DE LOS HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS

### 1.1. Estructura molecular, nomenclatura, historia y propiedades

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) son una clase compleja de compuestos constituidos por tres o más anillos aromáticos que pueden estar unidos linealmente, angularmente o bien condensados. En la amplia bibliografía existente acerca de este tipo de compuestos se utilizan otras denominaciones como la de *compuestos aromáticos polinucleares*, *compuestos aromáticos policíclicos*, *materias orgánicas policíclicas* o *compuestos orgánicos policíclicos*, entre otras. En la presente Memoria se ha optado por emplear la más utilizada en la actualidad que es la de hidrocarburos aromáticos policíclicos y como abreviatura HAP.

Los HAPs más simples son los homocíclicos, que sólo contienen carbono e hidrógeno en su estructura, pero son cientos los HAPs que existen con uno o varios grupos sustituyentes tales como alquilo, amino, cloro, ciano, hidroxilo, oxo o tio. En otro subgrupo, se sitúan los derivados heterocíclicos de los HAPs que contienen uno o varios heteroátomos en su estructura aromática, tales como nitrógeno, oxígeno o azufre.




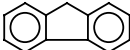
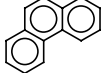
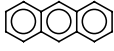
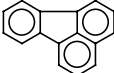

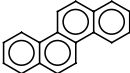
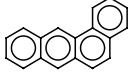
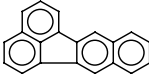
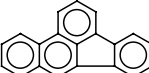
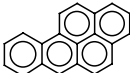
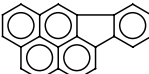
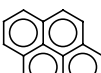
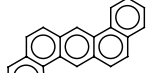
Por tanto, en la actualidad, al hablar de HAPs se engloba a un gran número de compuestos, siendo los más estudiados e interesantes los que fueron seleccionados por la Agencia de Protección Medioambiental Americana (EPA) [1]. Estos HAPs son dieciséis y son los que se han estudiado en la presente Memoria. La Tabla A.3-1 muestra los HAPs seleccionados por la EPA ordenados por orden creciente de peso molecular así como su estructura, nombre, abreviatura y algunas características.

Los HAPs han sido compuestos ampliamente estudiados en los últimos tiempos debido a su potencialidad carcinogénica y/o mutagénica. Así, hace más de dos siglos, se observó cáncer de piel en los deshollinadores y posteriormente en los trabajadores de factorías de alquitrán, por lo que el contacto frecuente con el hollín y alquitrán fue relacionado con la incidencia del cáncer de piel. Investigaciones posteriores indicaron que la actividad cancerígena de estos materiales podía estar relacionada con la presencia de HAPs en su composición y esto fue corroborado mediante experimentación con animales, demostrando que los HAPs son cancerígenos y/o mutagénicos.

---

1. <http://www.epa.egov/>

Tabla A.3-1. Nombre y propiedades de los HAPs de la EPA

Nombre	Estructura química	Abreviatura	Peso molecular	Punto fusión (°C)	Actividad cancerígena
Naftaleno		NAPH	128.2	81	-
Acenaftileno		ACEN	152.2	92-93	-
Acenafteno		ACE	154.2	95	-
Fluoreno		FLU	166.2	115-116	-
Fenantreno		PHE	178.2	100	-
Antraceno		ANT	178.2	216	-
Fluoranteno		FLT	202.3	107	0
Pireno		PYR	202.3	150	0
Criseno		CHRY	228.3	254	+
Benzo(a)antraceno		BaA	228.3	156	+
Benzo(k)fluoranteno		BkF	252.3	217	-
Benzo(b)fluoranteno		BbF	252.3	168	++
Benzo(a)pireno		BaP	252.3	179	++++
Indeno(1,2,3-c,d)pireno		IcdP	276.3	-	+
Benzo(g,h,i)perileno		BghiP	276.3	278	+
Dibenzo(a,h)antraceno		DBahA	278.4	266	+++

- sin determinar; 0, inactivo; +, levemente activo; ++, moderadamente activo; +++, muy activo; +++++, extremadamente activo.



A partir de la publicación de estos resultados, fueron muchos los investigadores que se sumaron al estudio de los HAPs concluyendo en 1930 con la separación del dibenzo[a,h]antraceno como el primer HAP cancerígeno y en 1933 con la separación del benzo[a]pireno del alquitrán como uno de los HAPs con mayor actividad cancerígena [2].

## 1.2. Fuentes de formación y distribución de los HAPs en la naturaleza

Los HAPs se forman generalmente durante la combustión incompleta o pirólisis de materia orgánica a través de la condensación de los radicales etilénicos generados en fase gaseosa, dando lugar a la síntesis de grandes moléculas de HAPs [3,4]. Las condiciones más favorables para la formación de HAPs son durante la pirólisis de materia orgánica en un medio deficiente de aire y en un intervalo de temperaturas entre 650 y 900 °C. Sin embargo, para la aromatización de materia orgánica no se requiere necesariamente una elevada temperatura.

Los HAPs pueden formarse por fuentes naturales o antropogénicas, aunque las últimas son, con diferencia, las que más contribuyen a la mayor presencia de este tipo de compuestos en la naturaleza.

Las fuentes naturales más relevantes de formación de HAPs son: volcanes, incendios forestales, en el proceso de carbonización y a través de síntesis vegetales o bacterianas. Así, la fracción de HAPs encontrados en sedimentos jóvenes marinos se cree que fue originada, en su mayor parte, por fuegos en bosques y praderas y que posteriormente fueron dispersadas por el viento.

Las emisiones, por fuentes antropogénicas, son las más abundantes en términos de emisiones globales anuales. Estas fuentes incluyen la pirólisis o combustión incompleta de combustibles fósiles (carbones, hollín, esquistos, petróleos y derivados) y también por combustión de basuras y maderas. Además de éstas, existen otras fuentes como los derrames de crudos petrolíferos o refinados que contienen de forma natural a estos compuestos y por transformación del petróleo y carbón en sus industrias [5]. Así,

- 
2. T. Vo-Dinh. "Chemical Analysis: Chemical Analysis of Polycyclic Aromatic Compounds". Wiley, 1989, New York.
  3. G.M. Badger, R.W.L. Kimber. *J. Chem. Soc.*, 266 (1960).
  4. G.M. Badger, J. Novotny. *Nature*, 198 (1963) 1086.
  5. W. Funk. *Merck Spectrum*, 2 (1991) 18.

se han detectado concentraciones de 33 ng/L en aire en algunos puestos de trabajo de baterías de hornos de coque [6]. Otras fuentes de contaminación son los alimentos cocinados a la parrilla, fritos, asados o ahumados [7], así como el humo del tabaco [8].

Debido a las bajas tensiones de vapor que presentan los HAPs, al descender la temperatura por debajo de 150°C, o bien condensan como micropartículas o son adsorbidos sobre las partículas existentes en los gases o humos. A temperatura ambiente los HAPs existen principalmente asociados a partículas en aerosoles y de esta manera pueden ser aerotransportados a largas distancias por la acción de los vientos. Así, presentes en los humos y gases de combustión, los HAPs llegan a la superficie terrestre a través de la lluvia, alcanzándose de esta manera las aguas superficiales y subterráneas y, por último, la cadena alimenticia. De este modo se explica que los HAPs sean contaminantes que puedan encontrarse en las partes más remotas de la Tierra, como por ejemplo en Barrow, Alaska, donde la concentración atmosférica media de 11 HAPs en los meses de marzo y agosto de 1979, fue de 1.2 y 0.16 ng/m<sup>3</sup>, respectivamente.

Por tanto, se puede afirmar que los HAPs pueden encontrarse en casi todas las partes: en el aire, en la tierra, en el agua y los alimentos. Los valores de los HAPs en aguas superficiales se encuentran entre 0.1 y 830 ng/L, aunque los valores habituales oscilan entre 2 y 50 ng/L. La concentración en este tipo de aguas es mayor que en aguas de bebida o subterráneas, debido a la presencia de sólidos suspendidos donde se adsorben los HAPs. Las aguas de manantial son filtradas de forma natural al pasar por diversos terrenos quedando allí retenidos los HAPs.

Análogamente, los procesos de tratamiento (decantación y filtración) de las aguas potables retiran partículas, que se encuentran en suspensión, reduciendo las concentraciones de estos hidrocarburos no rebasándose el valor límite de 200 ng/L (véase Tabla A.3-2).

- 
6. Encyclopaedia of Analytical Sciences, Academic Press Limited, 1995, Londres.
  7. N. Kazerouni, R. Sinha, C.H. Hsu, A. Greenberg, N. Rothman. *Food Chem. Toxicol.*, 39 (2001) 423.
  8. C. Johnson, A. Greenberg. *J. Chromatogr. B*, 728 (1999) 209.

**Tabla A.3-2. Concentraciones habituales de los HAPs en aguas**

<b>Tipos de aguas</b>	<b>Concentración media (ng/L)</b>	<b>Intervalo (ng/L)</b>
Agua superficial	8.0	0.1-830
Agua de manantial	1.2	0.2-6.9
Agua potable	2.8	0.1-62

Una propiedad directamente relacionada con su insolubilidad en agua, es su elevado coeficiente octanol/agua. Esto implica que presenta una elevada tendencia a solubilizarse en matrices orgánicas, lo que los hace especialmente nocivos para la salud humana, ya que tienden a preconcentrarse en tejidos y órganos.

### 1.3. Carcinogénesis de los HAPs

En 1775, Pott constató una frecuencia anormal de cáncer en deshollinadores, pero no es hasta principios del s. XX cuando se comprueba que individuos expuestos de manera continuada a productos derivados del alquitrán de hulla tienden a desarrollar años después de la exposición y en porcentajes anormalmente elevados, cáncer de piel.

En 1915, Yamaniwa e Ichikawa pusieron de manifiesto que el cáncer del alquitrán de hulla es originado por el contacto de la piel con determinados productos químicos, pues lograron producir tumores en conejos por aplicación prolongada sobre la piel de un destilado de alquitrán de hulla. Estos trabajos dieron pie a que en 1930, Kennaway y su Grupo de Investigación del Royal Cancer Hospital de Londres, demostraran el carácter carcinogénico del DBahA y que en 1933, se aislara el BaP del alquitrán, demostrándose que es uno de los HAPs con una mayor actividad carcinogénica. Posteriormente, muchos otros HAPs fueron sintetizados y establecido su carácter carcinogénico. También se ha demostrado que todos no tienen la misma actividad cancerígena y no todos han sido igualmente estudiados (véase Tabla 1). Además, entre los no incluidos en la lista de HAPs de la EPA hay muchos de los que se sospecha que son carcinogénicos o mutagénicos.

Entre los años 60 y 70, se estudiaron un gran número de HAPs homocíclicos para establecer su metabolismo tanto in vitro como in vivo. El conocimiento de las rutas metabólicas permite desvelar la formación de enlaces covalentes entre los HAPs, el ADN y proteínas, previo proceso de exposición a éstos. Los HAPs, pues, son productos precarcinogénicos ya que no producen generalmente cáncer en el lugar aplicado sino en tejidos distantes de donde se produce la actividad metabólica.

En la biotransformación de estos carcinógenos se forman compuestos electrófilos muy reactivos capaces de interactuar con el ADN y otras moléculas nucleofílicas [9]. Pullman fue el primero que asoció la carcinogeneidad con la estructura señalando que aquella se relacionaba con la presencia en la molécula de un doble enlace reactivo, situado en la llamada región K, sugiriendo que el proceso primario en la inducción del cáncer es una reacción de adición de compuestos presentes en el medio celular a la región K de la molécula (véase Figura 1).

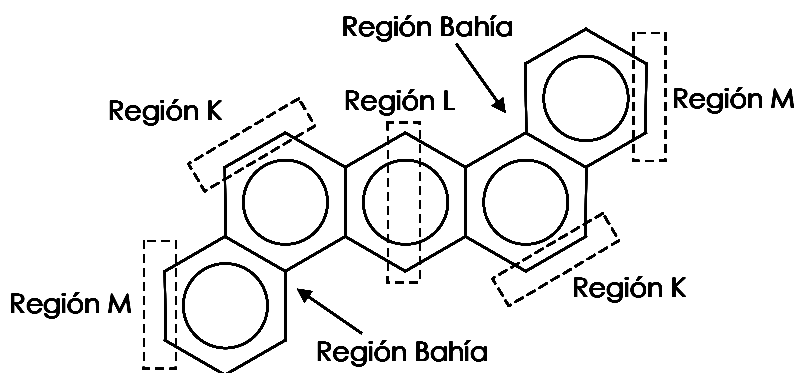
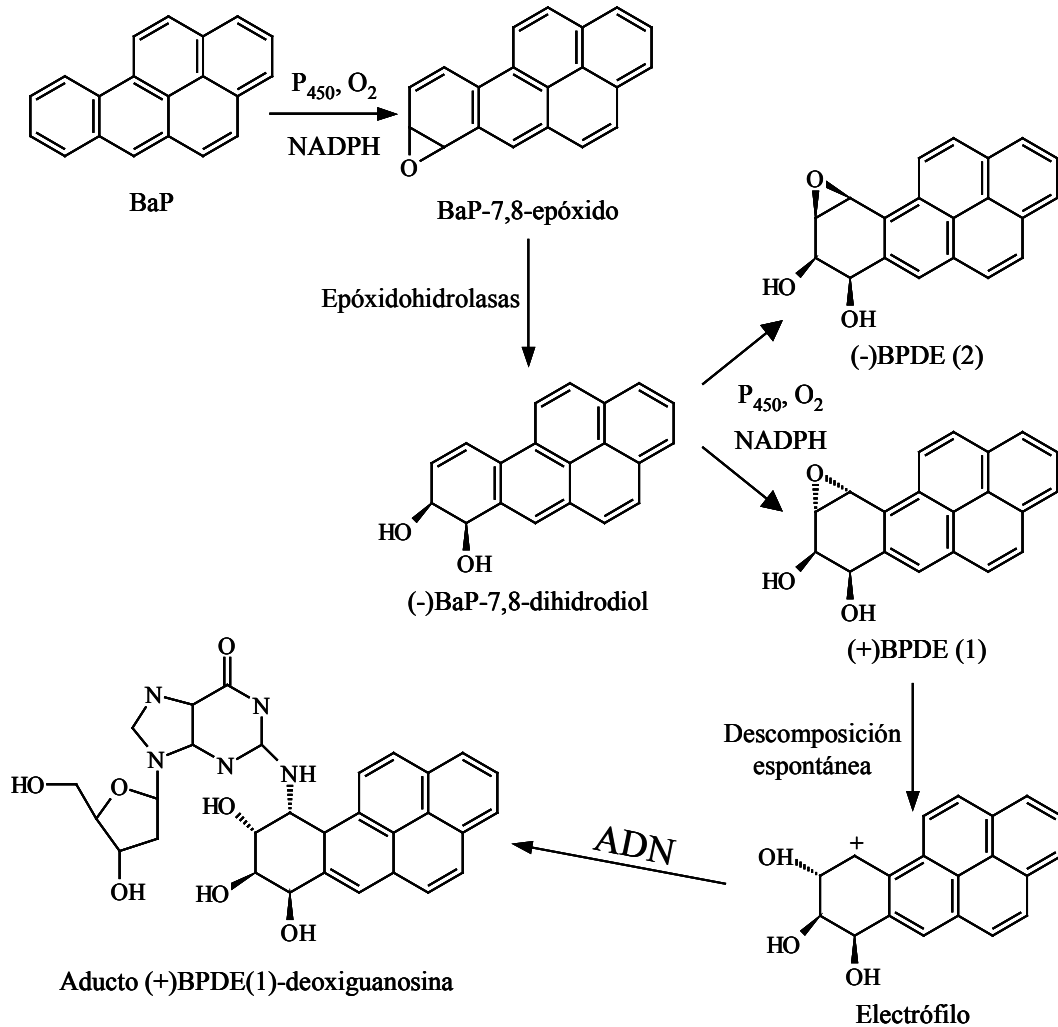


Figura A.3-1. Regiones moleculares del dibenzo(a,h)antraceno

En el caso del BaP y a través de una activación metabólica multietapa mediante enzimas específicas, especialmente el citocromo P450, se origina el 7,8-epóxido correspondiente, quién a su vez mediante epóxido-hidrolasas forma dioles estereoisómeros que, posteriormente, se transforman en 7,8-dihidrodiol-9,10-epóxido (véase Figura A.3-2). Éste puede existir en cuatro posibles estereoisomerías de las que el producto con mayor actividad cancerígena es el (+)benzo[a]pireno-7,8-diol-9,10-epóxido. La reacción entre el carbono bencílico del epóxido y una posición nucleofílica del ADN da lugar a la formación de aductos. Estos aductos de ADN son los de mayor trascendencia, puesto que se cree que estas sustancias provocan reacciones que conducen a la mutación celular y/o transformaciones malignas,

9. V.J. Meléndez Colón, C.A. Smith, A. Seidel, A. Luch, K.L. Platt, W.M. Baird. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94 (1997) 13542.

siendo éste un posible mecanismo que explica los efectos cancerígenos de los HAPs en el cuerpo humano [2].



**Figura A.3-2. Activación enzimática del benzo(a)pireno.**

Existe otra teoría (teoría de la región bahía) que correlaciona carcinogenicidad con las estructura de esta zona de la molécula y con la facilidad de formación de iones carbonio en los epóxidos dioles originados. En cualquier caso, las propiedades carcinogénicas de los HAPs dependen de su estructura; así, el benzo(a)pireno es muy cancerígeno mientras que su isómero, el benzo(e)pireno, no lo es.

#### 1.4. Usos y formulaciones comerciales

Hay pocos usos conocidos para la mayoría de los HAPs, excepto para la investigación. Algunos de ellos se usan en medicamentos y para hacer plásticos, tintes y pesticidas.

#### 1.5. Métodos analíticos

Al considerarse los HAPs como cancerígenos y/o mutagénicos y por actuar a unos niveles muy bajos de concentración, hace que su distribución en los más variados ambientes y productos sea objeto de notable atención por parte tanto de investigadores de diverso tipo, autoridades sanitarias y, cada vez con más fuerza, ciudadanos, asociaciones y grupos políticos [10,11].

Generalmente, debido a la complejidad de las muestras a analizar, es necesaria una separación previa a la detección en la que, las técnicas más empleadas son la cromatografía de gases, cromatografía líquida y cromatografía de fluidos supercríticos, aunque en la actualidad se están desarrollando muchos métodos electroforéticos para su determinación. Los sistemas de detección más comúnmente empleados son los métodos fotométricos, fluorimétricos o la espectrometría de masas.

Concretamente, la cromatografía de gases permite la determinación de sustancias que sean volátiles y estables térmicamente. Los HAPs son moléculas térmicamente estables pero su volatilidad va a depender tanto del número de átomos de carbono como del grado de condensación entre ellos. Se puede situar el límite de aplicación de la técnica en HAPs planares con estructuras muy condensadas en un máximo de 24 átomos de carbono [12-14]. La sensibilidad, selectividad y poder de resolución van a depender del tipo de columna y detector empleado. El detector más comúnmente empleado es el de ionización de llama [15-30], debido tanto a su precio

- 
10. N.T. Edwards. *J. Environmental Quality*, 12 (1983) 427.
  11. C.S. Davis, P. Fellin, R. Otson. *Int. J. Air Pollution Control Hazardous Waste Management*, 37 (1992) 67.
  12. S. Lesage. *Fresenius J. Anal. Chem.*, 339 (1991) 516.
  13. A. Robbat, T.Y. Liu, M.D. Abraham. *Anal. Chem.*, 64 (1992) 1477.
  14. W.R. Trevelin, L.H. Vidal, M.D. Landgraf, I.C.E. Silva, M.O.O. Rezende. *Anal. Chim. Acta*, 268 (1992) 67.
  15. A. Egizabal, O. Zuloaga, N. Echevarria, L.A. Fernández, J.M. Madariaga. *Analyst*, 123 (1998) 1679.

como a su respuesta universal, pero su uso es limitado en mezclas complejas, mientras que el empleo de un detector de masas prácticamente resuelve toda la problemática de estos compuestos [31-47]. Además de los sistemas de detección anteriormente mencionados también aparecen en la bibliografía métodos de cromatografía de gases con detección ultravioleta, por infrarrojos y por fluorescencia inducida por láser, para la determinación de HAPs en diversas matrices [48,49].

- 
16. M.A. Díez, A. Domínguez, C. Barriocanal, R. Álvarez, C.G. Blanco, M.D. Casal, C.S. Canga. *J. Chromatogr. A*, 823 (1998) 527.
  17. B. Zielinska, E. Fujita, J. Sagebical, G. Hashfield, E. Uberna, T. Hayes, F. Keene. *J. Air Waste Manage.*, 48 (1998) 1038.
  18. T. Hyotylainen, A. Oikari. *Chemosphere*, 38 (1999) 1135.
  19. D. Djozan, Y. Assadi. *Microchem. J.*, 63 (1999) 276.
  20. T. Hyotylainen, A. Oikari. *Sci. Total Environ.*, 294 (1999) 97.
  21. Z.D. Wang, M. Fingas, L. Sigouin. *LC GC N. AM.*, 18 (2000) 1058.
  22. I.N. Glazkov, I.A. Revelsky, I.P. Efimov, Y.A. Zolotov. *Chromatographia*, 52 (2000) 495.
  23. J.D. Van Hamme, O.P. Ward. *J. Ind. Microbiol. Biot.*, 25 (2000) 155.
  24. E.V. Blanco, P.L. Mahía, S.M. Lorenzo, D.P. Rodríguez, E.F. Fernández. *Fresen. J. Anal. Chem.*, 366 (2000) 283.
  25. K. Dobosiewicz, K. Lux Betlej, D. Bodzek. *Waste Air Soil Poll.*, 118 (2000) 101.
  26. M. Czaplicka, A. Weglarz, K. Klejnowski. *Chem. Anal. Warsaw*, 46 (2001) 677.
  27. Y. Zeng y P.K.A. Hong. *J. Air Waste Manage.*, 52 (2002) 58.
  28. S. Bigham, J. Medlar, A. Kabir, C. Shende, A. Alli, A. Malik. *Anal. Chem.*, 74 (2002) 752.
  29. C. Marianna. *Fresen. Environ. Bull.*, 11 (2002) 91.
  30. K. Klejnowski. H. Pyta, M. Czaplicka. *Fresen. Environ. Bull.*, 11 (2002) 60.
  31. C. McRae, A. Ioannou, C. Sun, C.E. Snape, A.E. Fallick. *Abstr. Pap. Am. Chem. S.*, 216 (1998) 011.
  32. G.D. Wang, A.S. Lee, M. Lewis, B. Kamath, R.K. Archer. *J. Agr. Food Chem.*, 47 (1999) 1062.
  33. H.X. Pan, B.X. Mai, H.P. Zhuang, Z. Lin, Y.S. Min, G.Y. Sheng, J.M. Fu. *Chinese J. Anal. Chem.*, 27 (1999) 140.
  34. C. Miege, M. Bouzige, S. Nicol, J. Dugay. V. Pinchon, M.C. Hennion. *J. Chromatogr. A*, 859 (1999) 29.
  35. P. Agozzino, G. Avellone, G. Boscaino, S. Miceli. *J. Mass Spectrom.*, 34 (1999) 1383.
  36. D. Cam, S. Gagni, L. Meldolesi, G. Galletti. *J. Chromatogr. Sci.*, 38 (2000) 55.
  37. M. Callen, S. Hall, A.M. Mastral, T. Gacía, A. Ross, K.D. Bartle. *Fuel Process Technol.*, 62 (2000) 53.
  38. M.D. Gillen, P. Sopelana, M.A. Partearroyo. *J. Agr. Food Chem.*, 48 (2000) 126.
  39. M.D. Gillen, P. Sopelana, M.A. Partearroyo. *Food Addit. Contam.*, 17 (2000) 27.
  40. P. Mottier, V. Parisod, R.J. Turesky. *J. Agr. Food Chem.*, 48 (2000) 1160.
  41. L. Ramos, J.J. Vreuls, U.A.T. Brinkman. *J. Chromatogr. B*, 891 (2000) 275.
  42. C.L. Song, G.L. Fan, X.F. Tu, W.Z. Li y J.X. Duan. *Chinese J. Anal. Chem.*, 28 (2000) 1121.
  43. N. Grova, C. Laurent, C. Feidt, G. Rychen, F. Laurent, E. Lichtfouse. *Eur. J. Mass Spectrom.*, 6 (2000) 656.
  44. T.B. Mahajan, F.L. Plows, J.S. Gillette, R.N. Zare, G.A. Logan. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 12 (2001) 989.
  45. P.W. Crozier, J.B. Plomley, L. Matchuk. *Analyst*, 126 (2001) 1974.
  46. I. Al Saleh, I. Al Doush. *Int. J. Environ. Heal. R.*, 12 (2002) 193.
  47. A.Al Omair, M.I.H. Helaleh. *Chromatographia*, 59 (2004) 715.
  48. I.B. Litofsky. *J. Toxicol. Cutan. Ocul.*, 18 (1999) 151.
  49. W. Wilcke. *J. Plant Nutr. Soil Sc.*, 163 (2000) 229.

La aplicación de la cromatografía líquida al análisis de HAPs data de 1976 en que Boden [50] la aplicó a la determinación de residuos en muestras de interés ambiental. El requerimiento básico para que un analito pueda ser determinado por esta técnica es que sea suficientemente soluble en la fase móvil, propiedad que, en el caso de los HAPs, está relacionada con el número total de átomos de carbono presentes así como de su grado de aromaticidad. Así, por HPLC, se pueden determinar desde derivados alquilbencénicos hasta HAPs con 38 átomos de carbono (13 anillos). En cuanto al grado de aromaticidad, al aumentar éste disminuye su solubilidad en disolventes como diclorometano o clorobenceno.

Desde la primera aplicación de esta técnica, son muy numerosos los artículos publicados empleando como sistemas de detección métodos fotométricos [51-54], fluorimétricos [55-66] o fosforimétricos [67]. En la última década se han desarrollado igualmente métodos de HPLC acoplados a detectores de masas [68-75].

Las propiedades físicas de los fluidos supercríticos determinan la mayor eficiencia cromatográfica de la cromatografía que emplea dichos disolventes respecto a la HPLC y GC, observándose un futuro prometedor en el análisis de HAPs, principalmente

- 
50. H. Boden. *J. Chrom. Sci.*, 14 (1976) 391.
  51. F.S. Sun, D. Littlejohn, M.D. Gibson. *Anal. Chim. Acta*, 364 (1998) 1.
  52. S. Pérez, I. Ferrer, M.C. Hennion, D. Barceló. *Anal. Chem.*, 70 (1998) 4996.
  53. S.Y. Xie, R.B. Huang, L.S. Zheng. *J. Chromatogr. A*, 864 (1999) 173.
  54. S.Y. Xie, S.L. Deng, J.J. Yu, R.B. Huang, L.S. Zheng. *J. Chromatogr. A*, 932 (2001) 53.
  55. M.T.U. Garagorri, M.C.F. González, B.B. Irisarri. *Quim. Anal.*, 16 (1997) 253.
  56. J.L. Beltrán, J. Guiteras, R. Ferrer. *Anal. Chem.*, 70 (1998) 1949.
  57. M.N. Kayali Sayadi, S. Rubio Barroso, M.P. Cuesta Jiménez, L.M. Polo Diez. *Analyst*, 123 (1998) 2145.
  58. C. Miede, J. Dugay, M.C. Hennion. *J. Chromatogr. A*, 823 (1998) 219.
  59. M. Bouzige, V. Pichon, M.C. Hennion. *Environ. Sci. Technol.*, 33 (1999) 1916.
  60. M.A. Rodríguez Delgado, M.S. Astorga, R. Corbella, F.J.T. Montelongo. *Quim. Anal.*, 18 (1999) 313.
  61. V. Fernández Pérez, M.D. Luque de Castro. *J. Chromatogr. A*, 902 (2000) 357.
  62. S.G. Amigo, M.A.L. Yusty, J.S. Lozano. *J. AOAC Int.*, 85 (2002) 141.
  63. V. Pino, J.H. Ayala, A.M. Alfonso, V. González. *J. Chromatogr. A*, 949 (2002) 291.
  64. L. Pesado, E. Blanco, M.C. Casais. *J. Chromatogr. A*, 1056 (2004) 121.
  65. H.W. Chen. *Anal. Sci.*, 20 (2004) 1383.
  66. H. Bagheri, A. Salemi. *Chromatographia*, 59 (2004) 501.
  67. S.S. Levinskii, I.A. Khitrovo, L.V. Krivosheeva. *J. Anal. Chem.*, 56 (2001) 1098.
  68. H. Wilkes, U. Disko, H. Willsch. *Abst. Pap. Am. Chem.*, 215 (1998) 079-GEOC Part I.
  69. B.A. Mansoori. *Rapid Commun. Mass Sp.*, 12 (1998) 712.
  70. C.H. Marvin, R.W. Smith, D.W. Bryan, B.E. McCarry. *J. Chromatogr. A*, 863 (1999) 13.
  71. T. Letzel, U. Poschl, E. Rosenberg, M. Grasserbauer, R. Neissner. *Rapid Commun. Mass Sp.*, 13 (1999) 2456.
  72. C.Y. Airiau, R.G. Brereton, J. Crosby. *Rapid Commun. Mass Sp.*, 15 (2001) 135.
  73. S. Pérez, D. Barceló. *Chromatographia*, 53 (2001) 475.
  74. M. Takino, S. Daishima, K. Yamaguchi, T. Nakahara. *J. Chromatogr. A*, 928 (2001) 53.
  75. A.J. Bystol, S.J. Yo, A.D. Campiglia. *Talanta*, 60 (2003) 449.



en mezclas complejas ampliando considerablemente las limitaciones impuestas (volatilidad y solubilidad) por la GC y HPLC en cuanto al número de átomos de carbono se refiere. Las propiedades físicas de los fluidos supercríticos permiten el empleo de detectores de ionización de llama [76], de fluorescencia [77-79] y proporcionan también posibilidades de acoplar con facilidad detectores de masas [80-85] aumentando así la potencialidad de la técnica.

La electroforesis capilar, ha sido también, en los últimos tiempos, usada para la determinación y cuantificación de los hidrocarburos aromáticos policíclicos. Esta metodología, aunque aún queda mucho para que desplace a los métodos cromatográficos, ofrece ciertas ventajas que hace que esté pugnando junto a éstos en el análisis en general y en concreto en el análisis de HAPs. La cromatografía capilar electrocinética micelar [86,87], supone una simplificación metodológica frente a la cromatografía de fluidos supercríticos y debido a que usa medios organizados (medios micelares [88-90], ciclodextrinas [91,92] u otros [93-95]) solventa los problemas de solubilidad y volatilidad de los métodos de HPLC y GC. Además, los nuevos desarrollos instrumentales que permiten acoplar la técnica a multitud de sistemas de detección (UV [96], fluorescencia inducida por láser [97-103] y espectrometría de masas [104]) la

- 
76. B.N. Barman, V.L. Cebolla, L. Membrado. *Crit. Rev. Anal. Chem.*, 30 (2000) 75.
  77. T. Vo-Dinh, J. Fetzer, A.D. Campiglia. *Talanta*, 47 (1998) 943.
  78. W.R. LaCourse, C.O. Dasenbrock. *Anal. Chem.*, 70 (1998) 37R.
  79. M.A.L. Yusty, J.L.C. Davina. *Food Control*, 16 (2005) 59.
  80. T.L. Chester, J.D. Pinkston, D.E. Raynie. *Anal. Chem.*, 70 (1998) 301R.
  81. L. Toribio, M.J. del Nozal, J.L. Bernal, J.J. Jiménez, M.L. Serna. *J. Chromatogr. A*, 823 (1998) 163.
  82. R.M. Smith. *J. Chromatogr. A*, 856 (1999) 387.
  83. W.E. Rudzinski, T.M. Aminabhavi. *Energ. Fuel*, 14 (2000) 83.
  84. B.J. Turpin, P. Saxena, E. Andrews. *Atmos. Environm.*, 34 (2000) 289.
  85. M.C. Bruzzoniti, C. Sarzanini, E. Mentasti. *J. Chromatogr. A*, 902 (2000) 289.
  86. J.J. Pesek, M.T. Matyska. *Electrophoresis*, 18 (1997) 2228.
  87. M.G. Cikalo, K.D. Bartle, M.M. Robson, P. Mayers, M.R. Euerby. *Analyst*, 123 (1998) 87R.
  88. J.H.T. Luong, Y. Guo. *Electrophoresis*, 19 (1998) 723.
  89. J.H.T. Luong. *Electrophoresis*, 19 (1998) 1461.
  90. G. Kavran, F.B. Erim. *J. Chromatogr. A*, 949 (2002) 301.
  91. I.S. Lurie. *J. Chromatogr. A*, 792 (1997) 297.
  92. J.H.T. Luong, T. Rigby, K.B. Male, P. Bouvrette. *Electrophoresis*, 20 (1999) 1546.
  93. M.J. Xie, Y.Q. Feng, S.L. Da, D.Y. Meng, L.W. Ren. *Anal. Chim. Acta*, 428 (2001) 255.
  94. C.Y. Liu. *Electrophoresis*, 22 (2001) 173.
  95. W. Shi, C.P. Palmer. *Electrophoresis*, 23 (2002) 1285.
  96. Y. Takagai, S. Igarashi. *Analyst*, 126 (2001) 551.
  97. C.J. Smith, J. Grainger, D.G. Peterson. *J. Chromatogr. A*, 803 (1998) 241.
  98. K.P. Robert, C.H. Lin, R. Jankowiak, G.J. Small. *J. Chromatogr. A*, 853 (1999) 1546.
  99. K.P. Roberts, C.H. Lin, M. Singhal, G.P. Casale, G.J. Samll, R. Jankowiak. *Electrophoresis*, 21 (2000) 799.
  100. R. Jankowiak, K.P. Roberts, G.J. Small. *Electrophoresis*, 21 (2000) 293.

están transformando en una potente herramienta en los laboratorios de Química Analítica [105,106] y posibilitando su aplicación al análisis de HAPs en matrices complejas [107-109].

Además de las técnicas separativas para el análisis de HAPs se han propuesto multitud de métodos espectrofotométricos y luminiscentes. Debido a que los HAPs poseen estructuras altamente condensadas, presentan espectros de absorción UV-visible muy característicos, con bandas estrechas y generalmente muy bien definidas, propiedad que ha permitido la detección individual de los mismos por espectrofotometría UV-visible [110,111]. Sin embargo, no es una técnica que sea útil para la resolución de mezclas. Para mejorar su selectividad, sin necesidad de una etapa previa de separación, se propusieron métodos de análisis multicomponente empleando para ello derivadas [112], aunque tampoco eran útiles con muestras complejas pues las longitudes de onda de los HAPs están muy próximas.

Además, los métodos para el análisis de HAPs deben ser muy sensibles pues se suelen encontrar en muy pequeñas cantidades. Las técnicas luminiscentes presentan como característica inherente la sensibilidad, por lo que constituyen, desde hace varias décadas, procedimientos de rutina en los laboratorios de análisis.

Todos los HAPs poseen fluorescencia intrínseca, por lo que existen numerosos métodos espectrofluorimétricos directos para su determinación individual [113]. Sin embargo, de nuevo, existe un gran solapamiento de las bandas fluorescentes de los distintos HAPs lo que limita la aplicación de la técnica a muestras complejas por falta de selectividad.

- 
101. G.F. Wang, L. Geng. *Anal. Chem.*, 72 (2000) 4531.
  102. Y. Takagai, S. Igarashi. *Anal. Bioanal. Chem.*, 373 (2002) 87.
  103. A.D. Formenton Catai, E. Carrilha. *Anal. Bioanal. Chem.*, 376 (2003) 138.
  104. S. Takeda. *Bunseki Kagaku*, 50 (2001) 267.
  105. E. Dabek Zlotorzynska. *Electrophoresis*, 18 (1997) 2453.
  106. G.W. Sovocool, W.C. Brumley, J.R. Donnelly. *Electrophoresis*, 20 (1999) 3297.
  107. C.L. Koper y K.W. Whitaker. *J. Chem. Educ.*, 75 (1998) 347.
  108. G.P. Casale, M. Singhal, S. Bhattacharya, S. Bhattacharya, R. Rama Nathan, K.P. Robert, D.C. Barbacci, J. Zhao, R. Jankowiak, M.L. Gross, E.L. Cavalieri, G.J. Samll, S.I. Rennard, J.L. Mumford, M.L. Shen. *Chem. Res. Toxicol.*, 14 (2001) 255.
  109. E.D. Zlotorzynska, H. Chen, L.Y. Ding. *Electrophoresis*, 24 (2003) 4128.
  110. M.T. Rossi, D.J. Desilets, H.L. Pardue. *Anal. Chim. Acta*, 161 (1984) 191.
  111. M.T. Rossi, H.L. Pardue. *Anal. Chim. Acta*, 175 (1985) 153.
  112. J. Ares. *Anal. Chim. Acta*, 268 (1992) 135.
  113. R.A. Velapoldi, P.A. White, W.E. May, K.R. Eberhardt. *Anal. Chem.*, 55 (1983) 1896.

La limitación de la selectividad de esta técnica para el análisis de muestras complejas puede ser soslayada, sin la necesidad de llevar a cabo una etapa de separación previa, usando medios organizados u optimizando la instrumentación de medida.

La utilización de medios organizados supuso un gran avance en este tipo de análisis, pues no sólo se consigue un gran aumento en la selectividad, sino que los analitos, al ordenarse en este tipo de medios, experimentan una auténtica preconcentración aumentando la sensibilidad de la técnica y disminuyendo los límites de detección. Como medios organizados se han utilizado la  $\alpha$ -ciclodextrina [114],  $\beta$ -ciclodextrina [115],  $\gamma$ -ciclodextrina [116], TX-100 [117], cloruro de bencil-dimetilhezdecilamonio, Pluronic F-68 [118], Brij-96 [119] y polioxietileno 10 lauril éter [120], entre otros.

En cuanto a la manipulación que se puede llevar a cabo en el ámbito instrumental para el aumento de selectividad en la detección fluorimétrica hay que destacar la aplicación de la espectrofluorimetría de tiempo resuelto [121], la obtención de espectros de luminiscencia total [122], espectros sincrónicos [115,123], espectros sincrónicos de ángulo variable [124] o la posibilidad de manipular la señal analítica [125].

Otra técnica utilizada para determinación de HAPs es la fosforescencia. Así, en la bibliografía aparecen métodos de fosforescencia a baja temperatura, fosforescencia sobre soporte sólido y en disolución, usando medios micelares, ciclodextrinas [126],

- 
114. J.M. Bello, R.J. Hurtubise. *Anal. Chem.*, 59 (1987) 2395.  
 115. M. Tachibana, M. Furusawa. *Analyst*, 120 (1995) 437.  
 116. J.M. Schuette, I.M. Warner. *Talanta*, 41 (1994) 647.  
 117. J.J. Santana, Z. Sosa, A. Alfonso, V. González. *Anal. Chim. Acta*, 255 (1991) 107.  
 118. S. Rubio Barroso, D. López López, C. Val Ontillera, L. Polo Díez. *Química Analítica*, 10 (1991) 127.  
 119. J.J. Santana, Z. Sosa, A. Alfonso, V. González. *Talanta*, 39 (1992) 1611.  
 120. J.J. Santana, J. Hernández García, M.M. Bernal Suárez, A. Bermejo Martín-Lázaro. *Analyst*, 118 (1993) 917.  
 121. S. Yamada. *Anal. Chim. Acta*, 264 (1992) 1.  
 122. U.P. Wild, M. Luond, E. Meinster, G.W. Suter. *J. Luminescence*, 40 (1988) 270.  
 123. L.I. He, D.L. Lin, Y.Q. Li. *Progression. Chem.*, 16 (2004) 879.  
 124. L.F. Capitán Vallvey, M. del Olmo, R. Avidad, A. Navalón, I. de Orbe, J.L. Vílchez. *Anal. Chim. Acta*, 302 (1995) 193.  
 125. L. Yao Qun, H. Xian Zhi, X. Jin Gou, C. Guo Zhen. *Anal. Chim. Acta*, 256 (1992) 285.  
 126. A. Segura Carretero, C. Cruces Blanco, A. Fernández Gutiérrez, A. Muñoz de la Peña. *Applied Spectroscopy*, 52 (1998) 420.

microemulsiones [127,128], y también ha sido utilizada la metodología HAI-RTP para la determinación de algunos HAPs como fueron el acenafteño [129,130], fenantreno [131], fluoreno [132,130], naftaleno [129] y pireno [133], pero hasta ahora no se ha abordado el estudio sistemático global de los 16 HAPs de la EPA.

## 2. ESTUDIOS PRELIMINARES DE VARIABLES EXPERIMENTALES DE LOS HAPs

Al igual que en los Capítulos anteriores se han realizado estudios preliminares de las variables experimentales más importantes que pueden afectar a la emisión fosforescente (disolvente orgánico, átomo pesado y desoxigenante) para los 16 HAPs considerados por la EPA usando unas condiciones instrumentales de partida (Tabla A.3-3).

**Tabla A.3-3. Parámetros instrumentales preliminares**

<b>Parámetros instrumentales</b>	<b>Valor seleccionado</b>
Voltaje del detector	950 V
Tiempo de demora/integración	0.12/5.00 ms
Ancho de las rendijas <sub>exc/em</sub>	20/20 nm

De estos estudios previos se han seleccionado para cada uno de los 16 HAPs, la concentración de trabajo de los mismos, el mejor disolvente de trabajo y volumen del mismo adicionado, la elección de un átomo pesado y la concentración de Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> a la cual emiten señal fosforescente. A partir de estos valores comenzó la optimización de las condiciones experimentales e instrumentales óptimas de emisión fosforescente de cada uno de los 16 HAPs (ver Tabla A.3-4).

- 
127. A. Segura Carretero, C. Cruces Blanco, A. Fernández Gutiérrez. *Anal. Chim. Acta*, 329 (1996) 165.  
 128. A. Segura Carretero, C. Cruces Blanco, A. Fernández Gutiérrez. *Anal. Chim. Acta*, 353 (1997) 337.  
 129. A. Segura Carretero, C. Cruces Blanco, B. Cañabate Díaz, A. Fernández Gutiérrez. *Anal. Chim. Acta*, 361 (1998) 217.  
 130. L.D. Li, L. Mou, X.K. Chen. *J. Chinese U.*, 21 (2000) 1040.  
 131. L.D. Li, Y. Zhao, Y.G. Wu, A.J. Yong. *Talanta*, 46 (1998) 1147.  
 132. A. Segura Carretero, C. Cruces Blanco, B. Cañabate Díaz, J.F. Fernández Sánchez, A. Fernández Gutiérrez. *Anal. Chim. Acta*, 417 (2000) 19.  
 133. L.D. Li, Z.X. Zhang, W.Q. Long, A.J. Tong. *Spectrochim. Acta A*, 57 (2001) 385.

Tabla A.3-4. Condiciones experimentales preliminares para cada analito

Compuesto	Concentración (ng/mL)	Átomo pesado		[Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> ] (M)	Acetonitrilo (%v/v)
		Tipo	Concentración (M)		
<b>NAPH</b>	300	KI	1.0	0.008	0
<b>ACEN</b>	10	TiNO <sub>3</sub>	0.005	0.010	0
<b>ACE</b>	100	KI	1.2	0.006	0
<b>FLU</b>	30	TiNO <sub>3</sub>	0.0375	0.006	0
<b>PHE</b>	50	KI	1.4	0.010	0
<b>ANT</b>	100	TiNO <sub>3</sub>	0.005	0.007	25
<b>FLT</b>	5	KI	1.4	0.010	20
<b>PYR</b>	5	TiNO <sub>3</sub>	0.01	0.003	20
<b>CHRY</b>	5	KI	1.0	0.006	25
<b>BaA</b>	2	KI	1.2	0.005	0
<b>BkF</b>	5	KI	1.2	0.004	30
<b>BbF</b>	10	KI	1.2	0.010	30
<b>BaP</b>	50	KI	1.2	0.004	30
<b>IcdP</b>	5	KI	1.0	0.006	25
<b>BghiP</b>	5	KI	1.0	0.003	30
<b>DBahA</b>	50	KI	0.5	0.004	20

### 3. CARACTERÍSTICAS ESPECTROSCÓPICAS DE LOS HAPs

Tras establecer unas condiciones instrumentales y experimentales preliminares, en primer lugar se llevó a cabo un estudio sobre las características fosforescentes a temperatura ambiente en disolución inducidas por átomo pesado de estos 16 hidrocarburos aromáticos policíclicos. Se registraron los espectros de excitación y emisión en las condiciones instrumentales y experimentales preliminares de cada analito (Tabla A.3-3 y A.3-4). Para ello en un matraz de 10 mL se colocaron alícuotas de cada disolución madre de los 16 HAPs en estudio de 50 µg/mL, según la concentración de trabajo requerida, a continuación se adicionaron la cantidad y tipo de átomo pesado (KI 2.0 M y TiNO<sub>3</sub> 0.25 M) y Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> 0.1 M necesarios en cada caso (ver Tabla A.3-4) y se enrasó con agua bidestilada. Los espectros de excitación y emisión fosforescentes obtenidos se presentan en la Figura A.3-3.

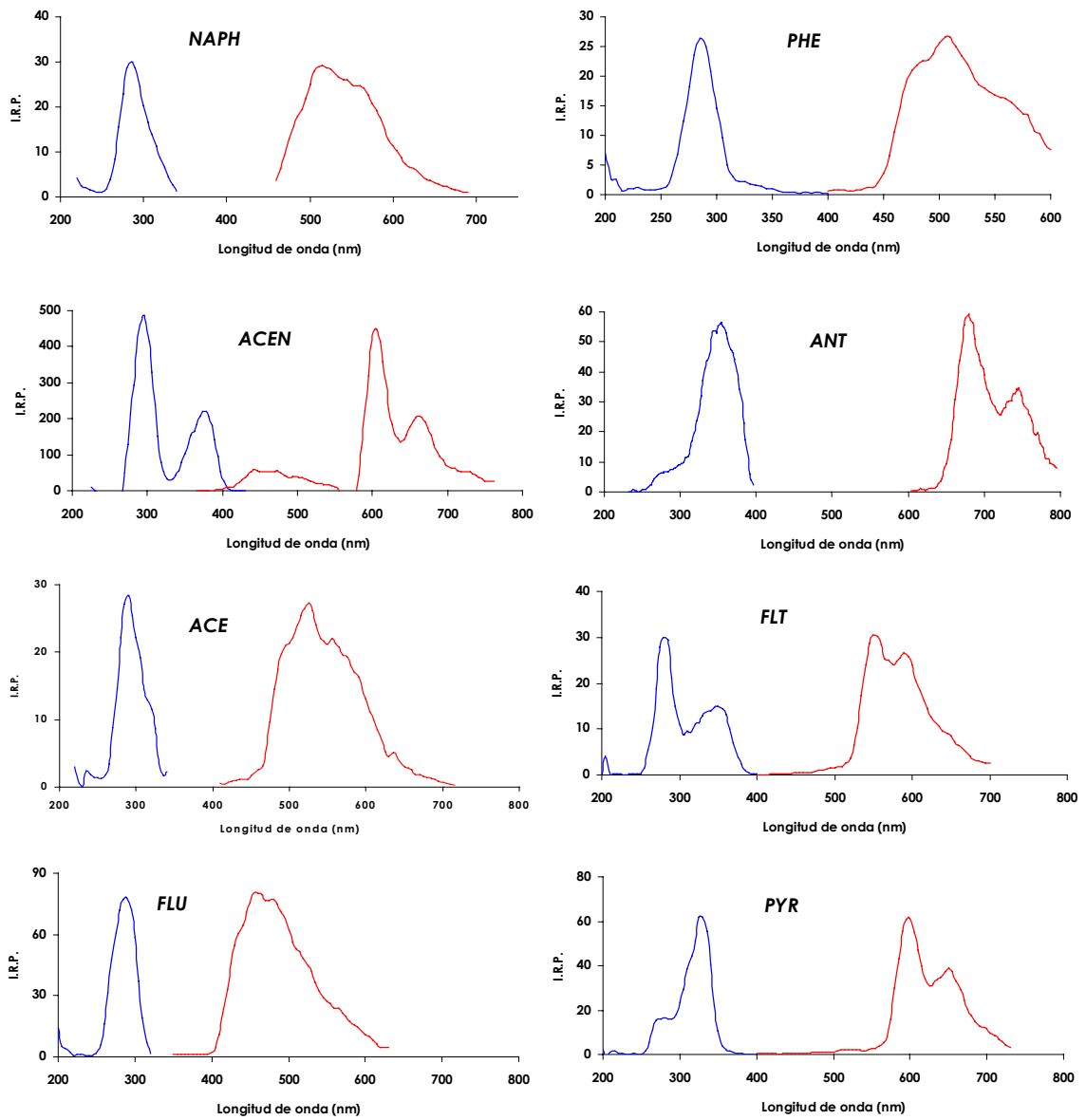
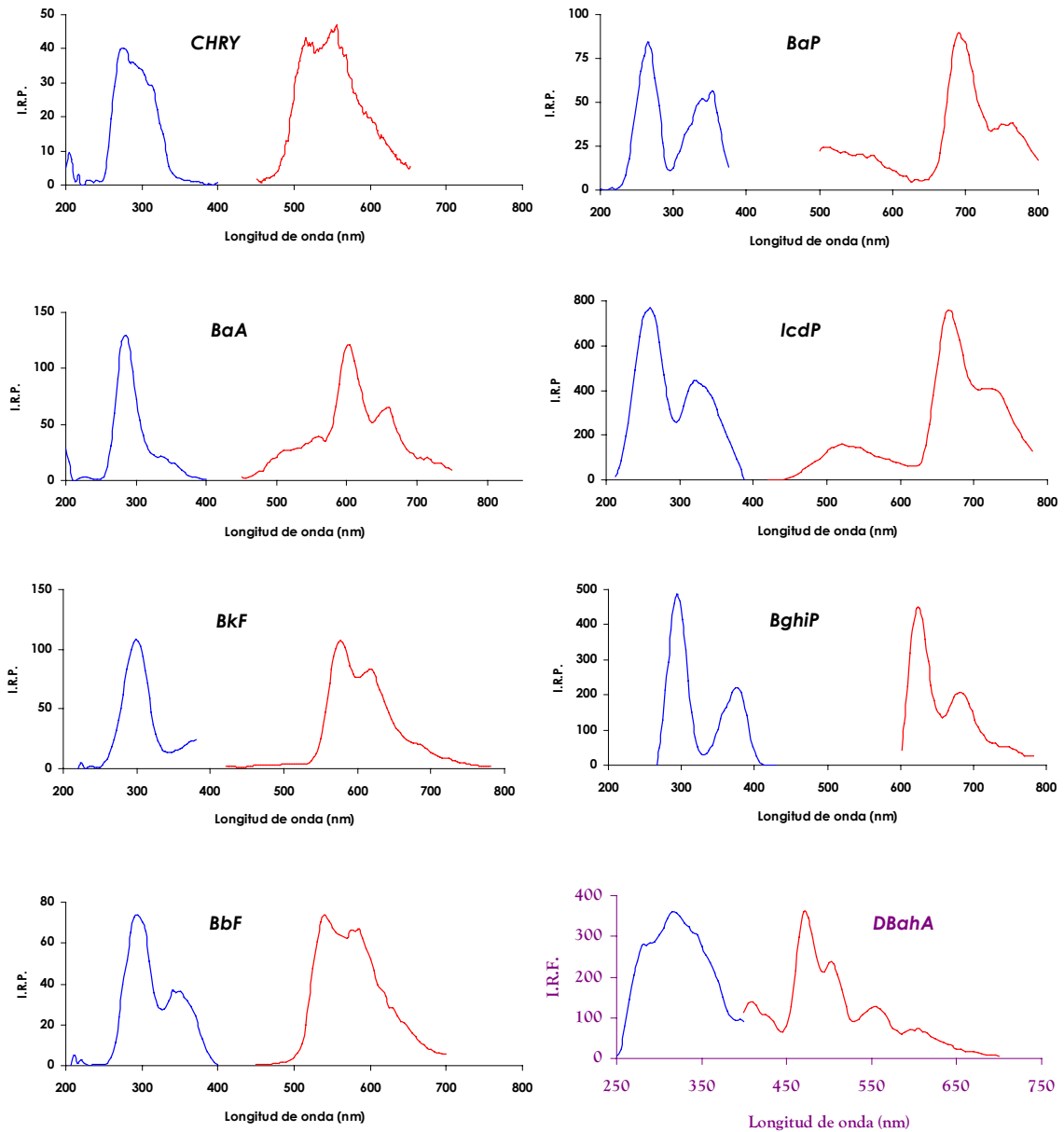


Figura A.3-3. Espectros de excitación (—) y emisión (—) fosforescentes de los HAPs



**Figura A.3-3 (continuación). Espectros de excitación (—) y emisión (—) fosforescentes de los HAPs y espectro de fluorescencia retardada del DBahA.**

Se comprobó que de los 16 hidrocarburos aromáticos policíclicos, tan solo el DBahA no emite fosforescencia en estas condiciones, no obstante presenta fluorescencia retardada (ya que no se produce un desplazamiento espectral batocrómico con respecto a su señal fluorescente descrita en bibliografía) y tiene unos tiempos de vida del orden de los  $\mu$ s en las condiciones de medida. Este hecho, no animó a estudiar como afectan las variables instrumentales y experimentales a esta emisión luminiscente puesto que puede aparecer en condiciones de fosforescencia. Por lo tanto en todos los estudios posteriores se estudiará junto con los otros 15 HAPs.

En este estudio de las características espectroscópicas podemos ver de manifiesto que al aumentar el número de anillos de benceno y la condensación de los mismos, se produce un desplazamiento batocrómico hacia longitudes de onda de emisión y lógicamente los estados triplete se hacen menos energéticos.

A las disoluciones preparadas de la forma anteriormente descrita, se les registró también la curva de decaimiento de la intensidad de fosforescencia con el tiempo para el cálculo del tiempo de vida ajustando dichas curvas de decaimiento a una función exponencial. Las curvas de decaimiento se muestran en la Figura A.3-4.

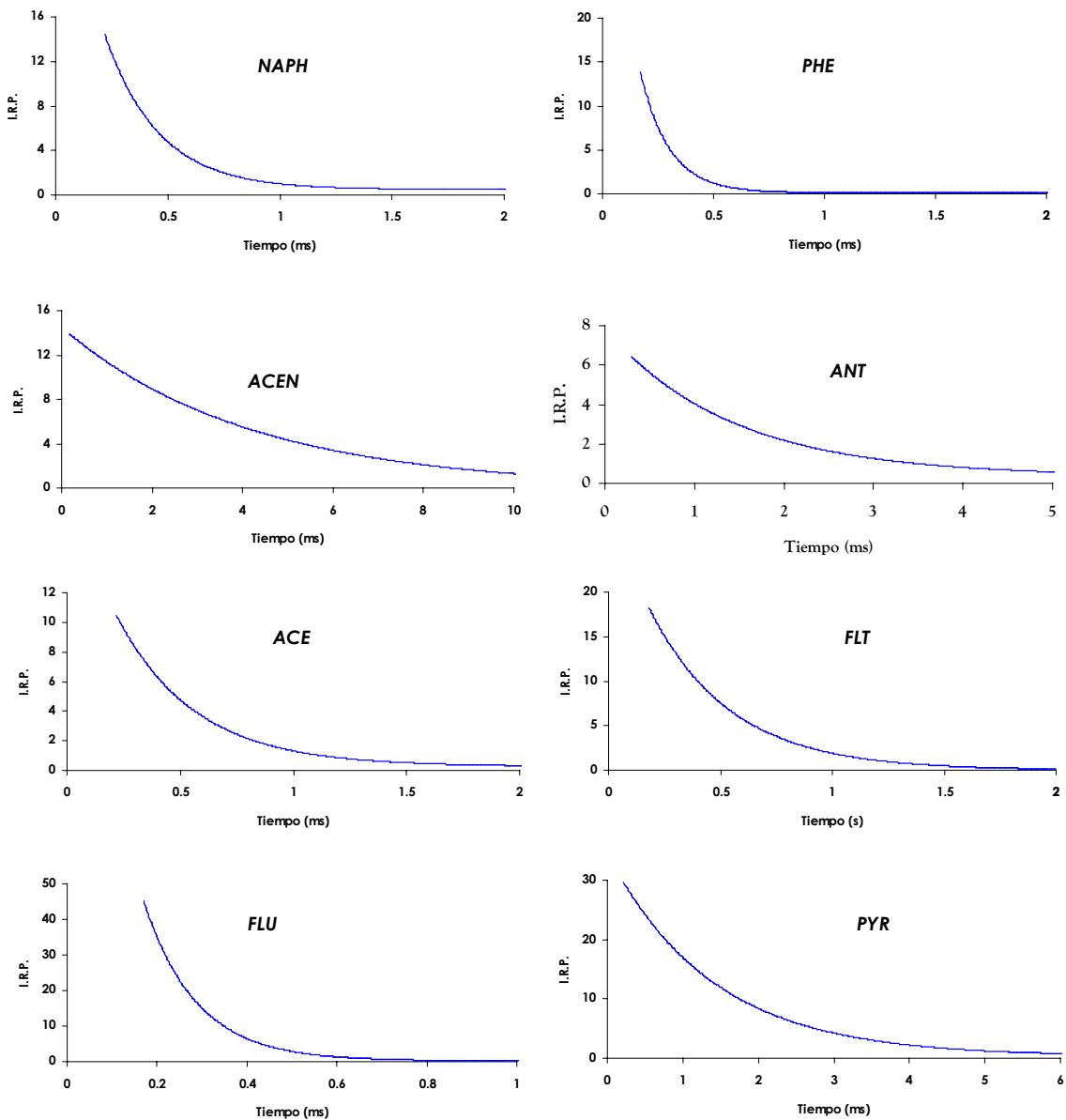


Figura A.3-4. Curvas de decaimiento de los HAPs.



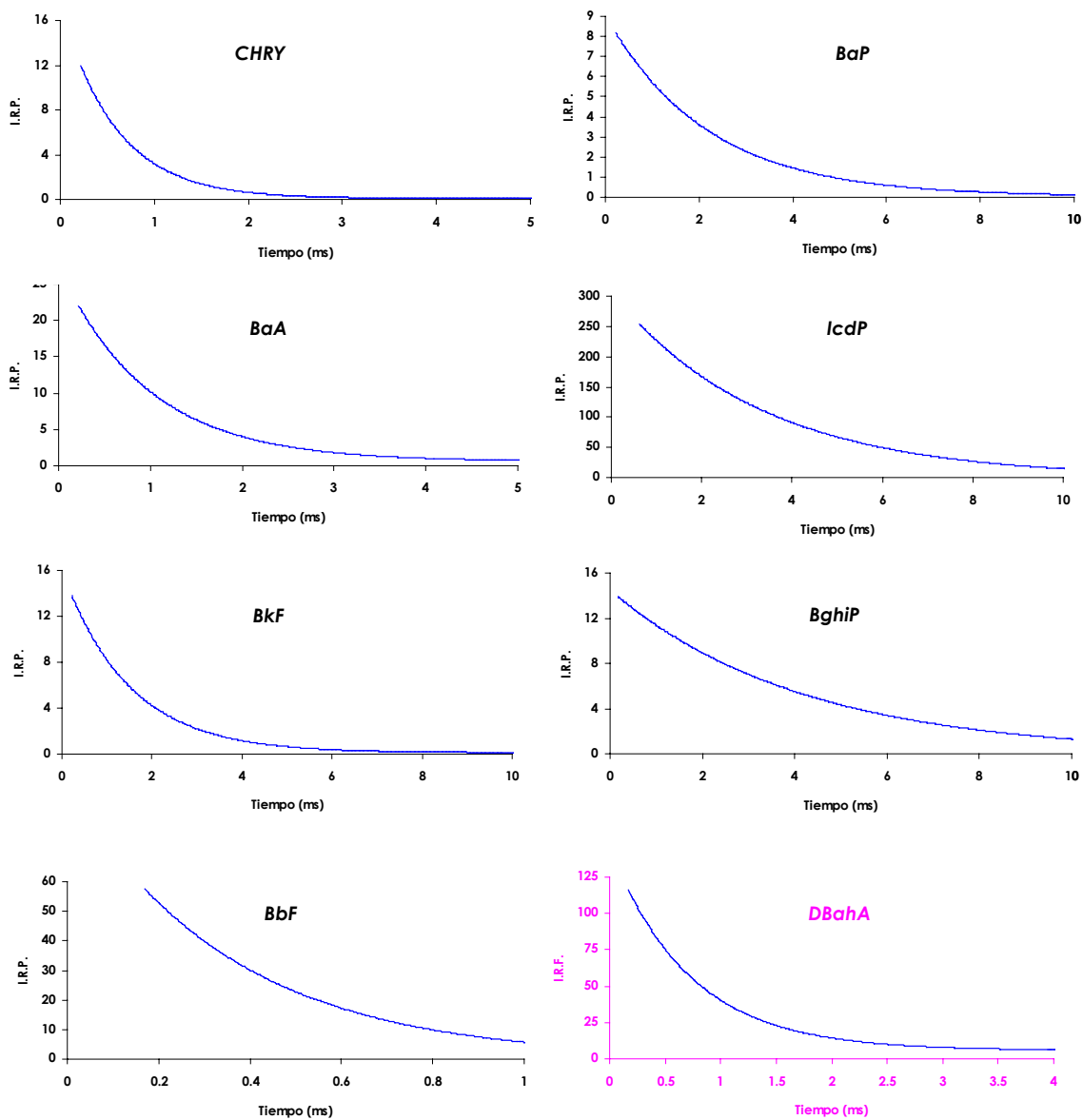


Figura A.3-4 (continuación). Curvas de decaimiento de los HAPs.

Las características espectroscópicas, longitudes de onda máximas de excitación y emisión y tiempos de vida calculados en las curvas de decaimiento, obtenidos para cada analito se muestran en la Tabla A.3-5.

Tabla A.3-5. Características espectroscópicas en condiciones experimentales de la metodología HAI-RTP de los HAPs

Compuesto	$\lambda_{exc/em}$ (nm)*	$\tau$ ( $\mu$ s)
<b>NAPH</b>	280/515	250
<b>ACEN</b>	290/500, <u>530</u>	962
<b>ACE</b>	290/525	350
<b>FLU</b>	290/455	118
<b>PHE</b>	285/505	131
<b>ANT</b>	355/ <u>680</u> ,750	819
<b>FLT</b>	<u>280</u> ,355/ <u>555</u> ,590	362
<b>PYR</b>	280, <u>330</u> / <u>593</u> ,650	1500
<b>CHRY</b>	275/ <u>515</u> ,555	583
<b>BaA</b>	280/ <u>605</u> ,660	970
<b>BkF</b>	300/ <u>570</u> ,622	1414
<b>BbF</b>	<u>295</u> ,345/ <u>555</u> ,585	249
<b>BaP</b>	<u>290</u> ,355/ <u>690</u> ,765	2162
<b>IcdP</b>	<u>295</u> ,326/ <u>525</u> , <u>665</u> ,725	2200
<b>BghiP</b>	<u>295</u> ,378/ <u>450</u> , <u>620</u> ,665	4139
<b>DBahA</b>	<u>315</u> / <u>470</u> ,505,555,605	717

\*Subrayados los máximos de excitación y emisión

Si se comparan las longitudes de onda de excitación y emisión de calculados para los HAPs en presencia de átomo pesado perturbador (HAI-RTP) (Tabla A.3-5) y en presencia de medio organizado (MS/ME-RTP) [134-136], se comprueba que no hay diferencias significativas en los máximos ofrecidos en las diferentes metodologías, tanto para el espectro de excitación como para el de emisión, lo cual corrobora que las longitudes de onda elegidas son señales fosforescentes. En el caso del DBahA, se comprobará que los máximos indican que la señal registrada es fluorescencia retardada.

En cuanto a la comparación de los tiempos de vida de los HAPs en otras metodologías con medio organizado (MS-RTP y ME-RTP) [84-86] y los obtenidos con esta nueva metodología (Tabla A.3-5), como era de esperar, el tiempo de vida es menor puesto que hay menos protección de la molécula del medio y por tanto son más probables las desactivaciones no radiantes del estado triplete, por colisiones.

134. A. Segura Carretero, C. Cruces Blanco, A. Fernández Gutiérrez. *Anal. Chim. Acta*, 353 (1997) 337.

135. J. Weijun, L. Changsong. *Anal. Chem.*, 65 (1993) 863.

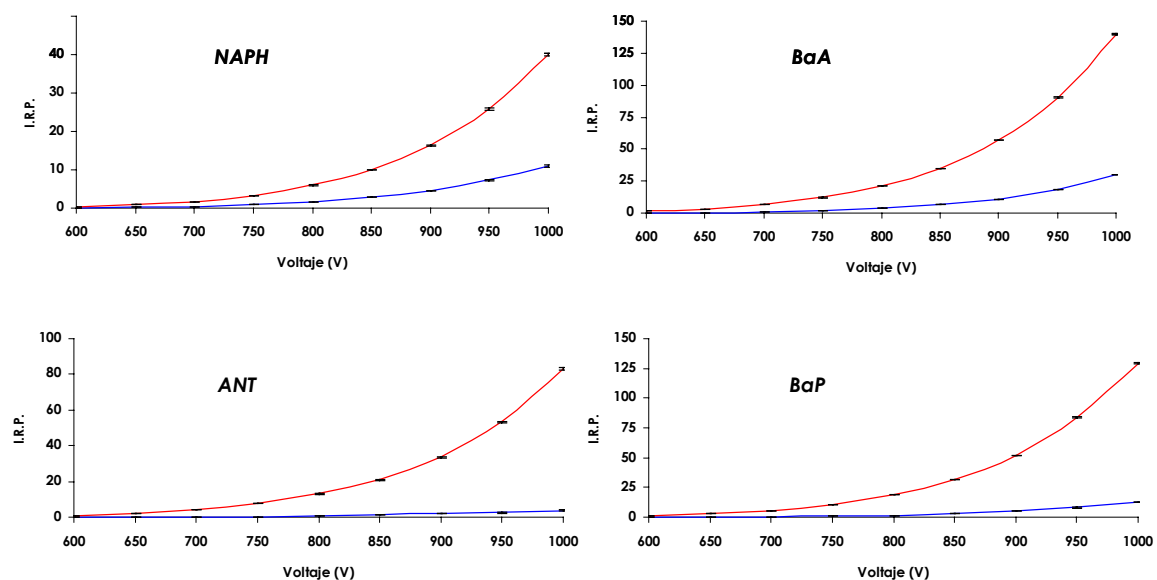
136. S. Scypinski, L.J. Cline Love. *Anal. Chem.*, 56 (1984) 322.

## 4. SELECCIÓN DE LOS PARÁMETROS INSTRUMENTALES

### 4.1. Optimización del voltaje del detector

Para optimizar este parámetro, se preparó una muestra de cada uno de los HAPs en las condiciones experimentales preliminares (Tabla A.3-4) y un blanco de igual forma pero sin contener el analito. Las disoluciones se enrasaron hasta 10 ml con agua bidestilada y se introdujeron en la cubeta de medida, se registró la señal fosforescente a los máximos de cada HAP y la desviación estándar de las medidas conforme se variaba el voltaje del detector mediante un registro de 20 réplicas.

Se observó que la tendencia generalizada en la optimización de este parámetro es una gráfica en la cual a medida que aumenta el valor del voltaje del detector aumenta la señal fosforescente así como el error en la medida fosforescente. La Figura A.3-5 muestra la forma que tuvieron dichas gráficas de optimización para cuatro de los 16 HAPs estudiados.



**Figura A.3-5. Influencia de la sensibilidad del detector sobre la intensidad de fosforescencia del HAP (→) y de su blanco (←).**

Por tanto, para todos los analitos estudiados se seleccionó un voltaje del detector de 950 V.

## 4.2. Optimización del tiempo de demora e integración

Se optimizaron los tiempos de demora e integración y para ello se prepararon muestras y blancos de igual forma que en el apartado anterior, registrando la intensidad fosforescente al valor de voltaje elegido como óptimo para cada HAP, variando en primer lugar el valor del tiempo de demora y una vez optimizado éste se realizó el estudio similar del tiempo de integración. Registrando la intensidad de fosforescencia y la desviación estándar relativa y llevando a cabo 20 réplicas. Los resultados obtenidos para cuatro de los analitos se muestran en la Figura A.3-6. Se puede observar que la tendencia de este parámetro es similar en los cuatro casos presentados, un aumento del tiempo de demora provoca una disminución en la intensidad de fosforescencia y del ruido, y que la curva que se forma al representar este parámetro es acorde a la curva de decaimiento de cada HAP.

En cuanto al tiempo de integración, un aumento de éste provoca un aumento de la señal fosforescente hasta sobrepasar el valor del tiempo de vida del compuesto, a partir del cual el aumento es nulo o menos acusado. Con la variación del parámetro del tiempo de demora y sabiendo los tiempos de vida de cada compuesto se puede disponer de una gran selectividad, adecuando el valor del tiempo de demora para conseguir eliminar algunos compuestos de tiempos de vida menores que pudieran actuar como interferentes. Es por lo tanto un parámetro muy útil para la resolución de mezclas de HAPs, esta es una de las grandes ventajas que presentan las técnicas fosforescentes.

A la vista de las experiencias se escogieron como valores óptimos aquellos en los que la relación de intensidades entre muestra y blanco fuese máxima. Se observa principalmente como el valor del tiempo de demora escogido en todos los casos ha sido 0.12 ms.

Los valores seleccionados para el tiempo de integración se muestran en la Tabla A.3-7 y podemos observar claramente como este parámetro varía según el tiempo de vida del HAP (Figura A.3-6), en aquellos en los que el tiempo de vida del HAP es alto necesita un mayor tiempo de integración para conseguir la máxima intensidad de fosforescencia. En alguno de los casos, como por ejemplo el NAPH, ACE...etc, hemos escogido un tiempo de integración muy alto aunque su tiempo de vida sea pequeño, esto se debe a que con esos valores conseguimos una mejora ostensible en la reproducibilidad de la señal. De forma general podemos decir que un valor para todos los HAPs es de 5 ms.

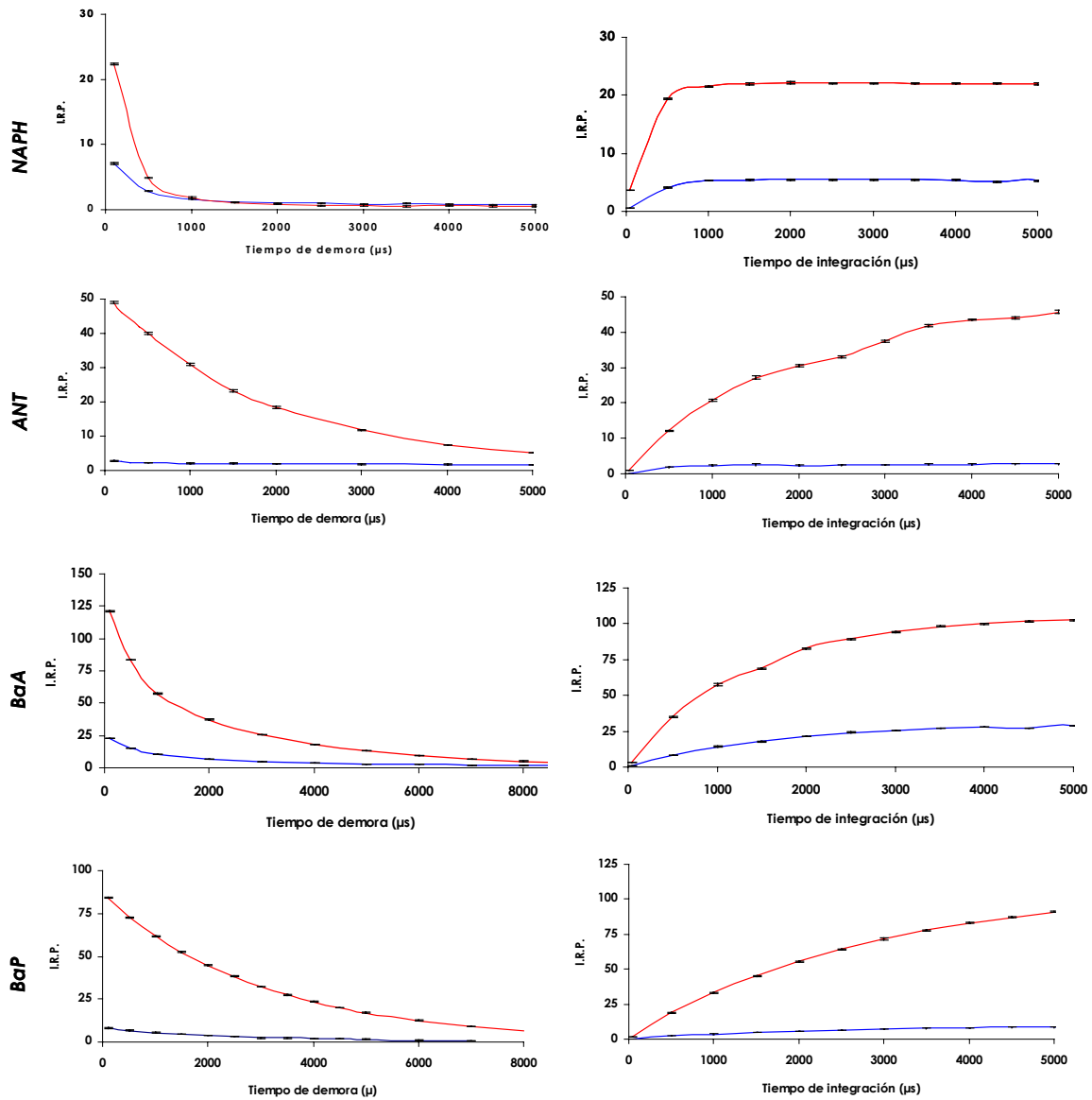


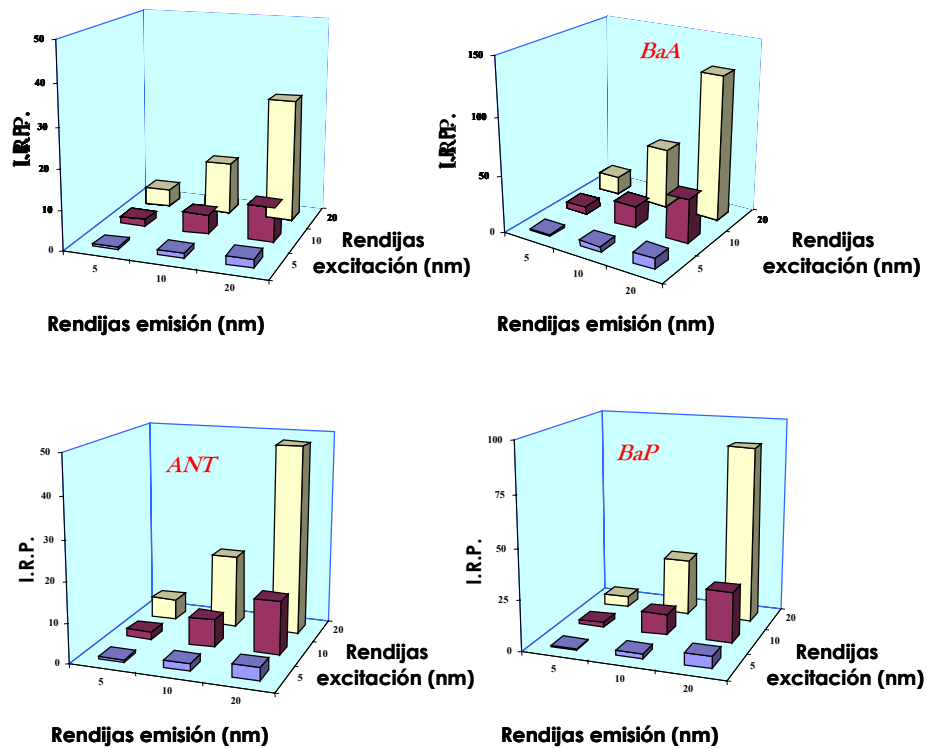
Figura A.3-6. Influencia del tiempo de demora y de integración sobre la intensidad de fosforescencia del HAP (→) y de su blanco (←), para NAPH, ANT, BaA y BaP.

Tabla A.3-7. Tiempo de integración óptimos

Compuesto	$t_g$ (ms)	Compuesto	$t_g$ (ms)
NAPH	5.0	CHRY	2.5
ACEN	5.0	BaA	4.5
ACE	5.0	BkF	5.0
FLU	5.0	BbF	4.0
PHE	0.5	BaP	5.0
ANT	5.0	IcdP	5.0
FLT	3.5	BghiP	5.0
PYR	1.5	DBahA	4.5

### 4.3. Optimización del ancho de rendijas

Para ver el efecto que produce la anchura de las rendijas sobre la señal analítica se preparó una muestra y un blanco, de igual forma que en el apartado anterior, y se fijaron los parámetros instrumentales óptimos, hasta ahora estudiados, variando la anchura de las rendijas. Este estudio se ve reflejado en la Figura A.3-7, donde vemos el efecto de esta variable instrumental para cuatro de los HAPs estudiados.



**Figura A.3-7. Influencia del ancho de rendijas sobre la intensidad de fosforescencia de una muestra para NAPH, ANT, BaA y BaP.**

Como se observa en la figura, un aumento de la anchura de las rendijas produce un aumento en la emisión fosforescente, mientras que el ruido no se ve afectado por este factor. La mayor señal analítica se tiene cuando se usa la mayor apertura posible de las rendijas. Por ello, para el resto del trabajo experimental se seleccionó un ancho de rendijas<sub>exc/em</sub> de 20/20 nm para los 16 HAPs.

## 5. SELECCIÓN DE LAS VARIABLES EXPERIMENTALES

### 5.1. Optimización del tipo y concentración de átomo pesado

Las condiciones experimentales, tipo y concentración de átomo pesado, óptimas que se proponen para el desarrollo de métodos analíticos inducidos por átomos pesados de los HAPs, se muestran en la Tabla A.3-8 y en la Figura A.3-7 se puede ver como afecta este parámetro a la emisión de los 16 HAPs estudiados.

Se ensayaron dos tipos de átomos pesados KI y  $TiNO_3$ , eligiendo KI como átomo pesado para 12 de los 16 HAPs y  $TiNO_3$  para los otros cuatro. Se apreció una tendencia generalizada de saturación en la optimización de la concentración de KI de forma que a medida que aumenta la concentración de la sal aumenta la señal fosforescente hasta que llega a una meseta o zona de saturación en la que la señal ya es prácticamente independiente de la concentración.

En los casos en los que se utiliza  $TiNO_3$  como átomo pesado, se observaron dos tendencias en el desarrollo de la señal con la concentración (Figura A.3-7). La primera es una curva que presenta claramente un máximo a partir del cual la señal fosforescente decrece con la concentración (ACEN y FLU), mientras que la segunda es una curva de saturación donde la señal aumenta con la concentración, al menos hasta el máximo valor ensayado (ANT y PYR).

**Tabla A.3-8. Tipo y concentración de átomo pesado para los 16 HAPs**

Compuesto	Átomo pesado	
	Tipo	Concentración (M)
<b>NAPH</b>	KI	1.2
<b>ACEN</b>	$TiNO_3$	0.037
<b>ACE</b>	KI	1.2
<b>FLU</b>	$TiNO_3$	0.025
<b>PHE</b>	KI	1.2
<b>ANT</b>	$TiNO_3$	0.075
<b>FLT</b>	KI	1.2
<b>PYR</b>	$TiNO_3$	0.075
<b>CHRY</b>	KI	1.2
<b>BaA</b>	KI	1.4
<b>BkF</b>	KI	1.0
<b>BbF</b>	KI	1.2
<b>BaP</b>	KI	1.0
<b>IcdP</b>	KI	1.0
<b>BghiP</b>	KI	0.8
<b>DBahA</b>	KI	1.0

En la Tabla A.3-8 sólo se muestran los valores de tipo y concentración de átomo pesado donde se obtiene la mayor señal analítica, si se tiene en cuenta todos los datos obtenidos se puede deducir que con la utilización de KI como átomo pesado todos los analitos emiten señal fosforescente (haciéndolo 12 con la mayor señal analítica), lo que es interesante si se pretende resolver una mezcla de todos ellos. Por el contrario la utilización de  $TiNO_3$  como átomo pesado limita el número de analitos que emiten fosforescencia con este átomo pesado, quedándose en sólo 8 analitos los que emiten señales analíticamente útiles (siendo tan solo 4 los que emiten su máxima señal con este átomo pesado).

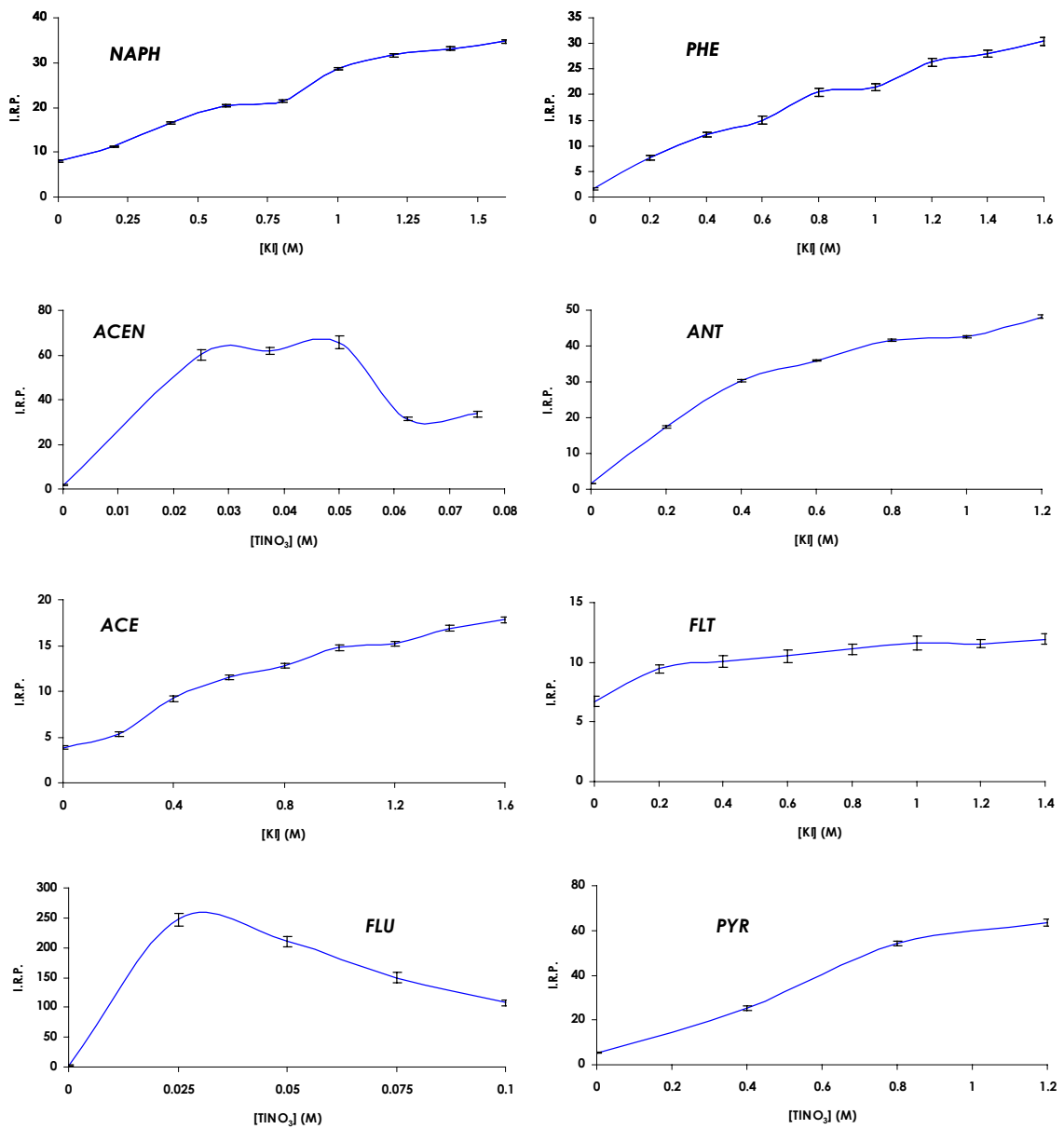


Figura A.3-8. Influencia de la concentración de átomo pesado sobre la intensidad de fosforescencia.



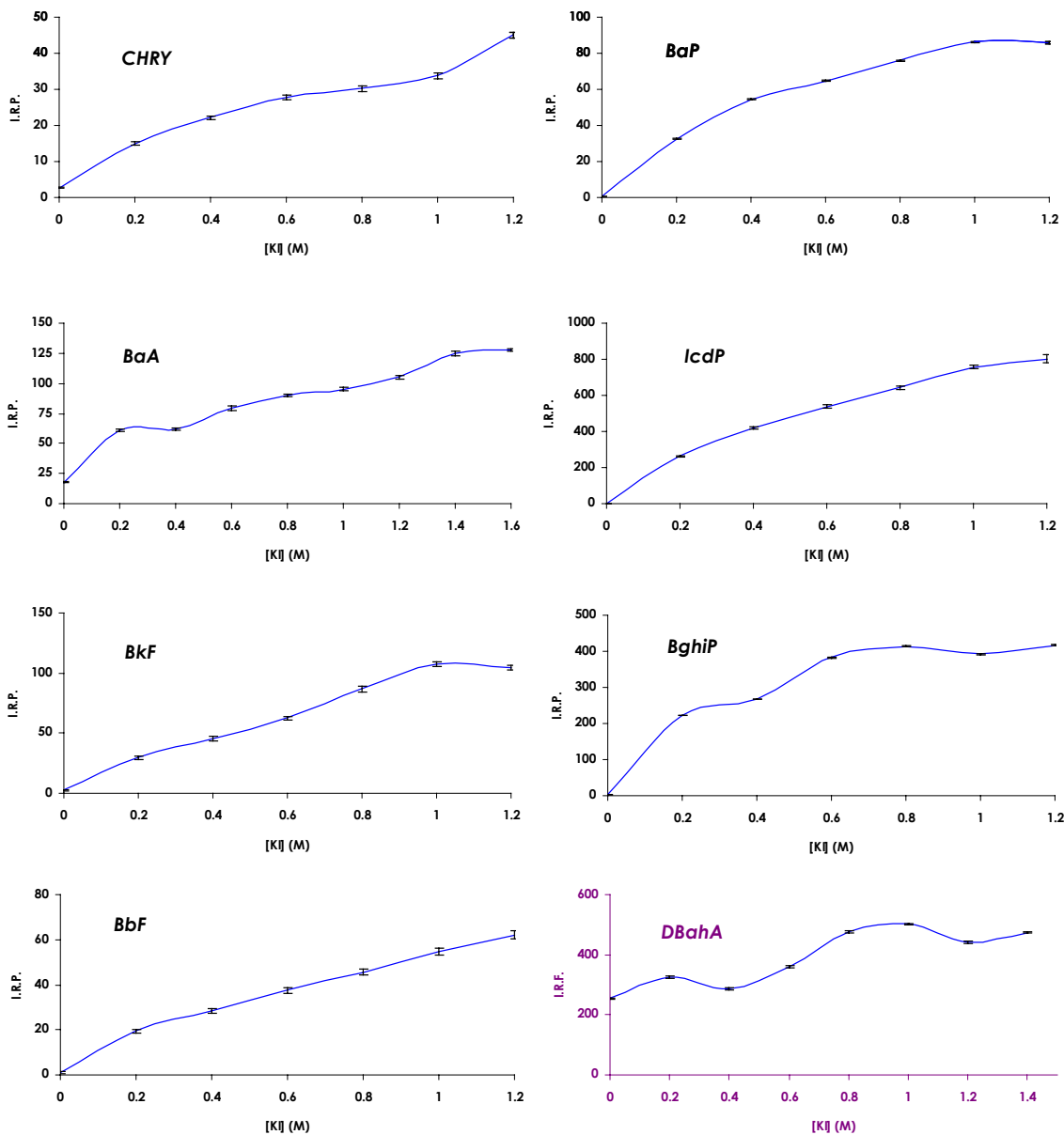


Figura A.3-8 (continuación). Influencia de la concentración de átomo pesado sobre la intensidad de fosforescencia.

Se comprobó también que el comportamiento del DBahA es diferente al del resto de HAPs estudiados, este compuesto es el único que da señal en ausencia total de átomo pesado, lo que deja más claro si cabe aún que se trata de una señal de fluorescencia retardada.

## 5.2. Optimización del sistema de desoxigenación

La concentración de  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  se optimizó midiendo la señal de fosforescencia y el tiempo de estabilización de disoluciones de los 16 HAPs en las condiciones instrumentales óptimas y añadiendo el tipo y la concentración de átomo pesado óptimo junto con cantidades variables de  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  0.1 M. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla A.3-9.

Las cinéticas de desoxigenación en función de la concentración de sulfito sódico se observaron registrando la evolución de la señal fosforescente con el tiempo a diferentes concentraciones del desoxigenante. Se observó, para todos los casos, que una vez alcanzada la concentración de  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  para que la señal aparezca instantáneamente, un aumento de ésta no afecta prácticamente a la señal fosforescente (ver Figura A.3-9).

Se han encontrado excepciones a este comportamiento para algunos de los compuestos estudiados concretamente para FLU y BkF. Así, existe una concentración óptima de sulfito sódico para la medida de fosforescencia, ya que presenta un máximo de emisión en la gráfica de señal frente a concentración de desoxigenante (Figura A.3-9), a partir del cual la señal disminuye, no habiendo encontrado una explicación teórica a este hecho.

**Tabla A.3-9. Concentraciones óptimas de  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  para los 16 HAPs**

<b>Compuesto</b>	<b>Concentración <math>\text{Na}_2\text{SO}_3</math> (M)</b>	<b>Compuesto</b>	<b>Concentración <math>\text{Na}_2\text{SO}_3</math> (M)</b>
<b>NAPH</b>	0.006	<b>CHRY</b>	0.005
<b>ACEN</b>	0.0025	<b>BaA</b>	0.006
<b>ACE</b>	0.008	<b>BkF</b>	0.005
<b>FLU</b>	0.0025	<b>BbF</b>	0.005
<b>PHE</b>	0.005	<b>BaP</b>	0.006
<b>ANT</b>	0.009	<b>IcdP</b>	0.006
<b>FLT</b>	0.005	<b>BghiP</b>	0.005
<b>PYR</b>	0.003	<b>DBahA</b>	0.008

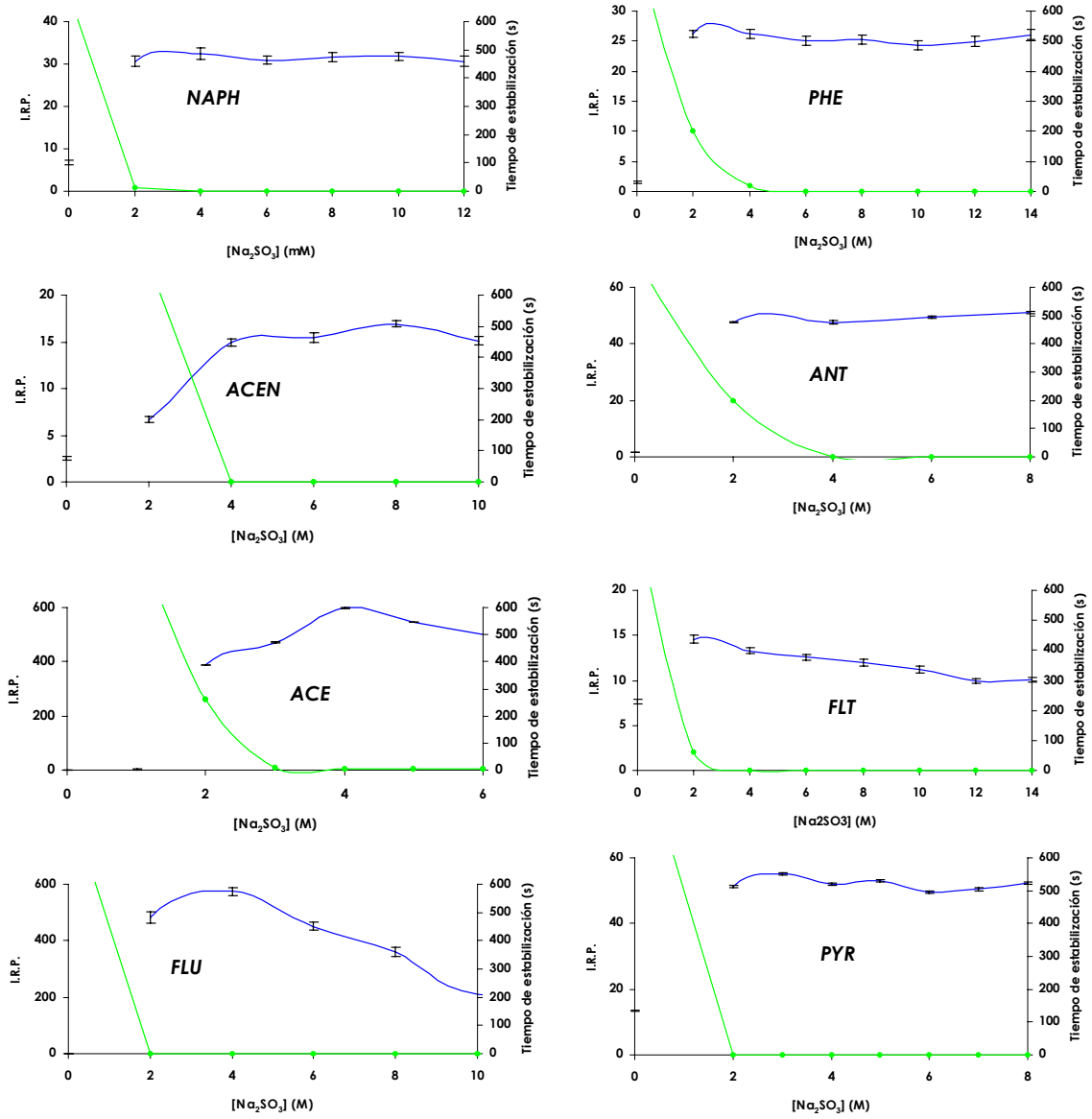


Figura A.3-9. Intensidad (—) y tiempo de estabilización (—) de la señal fosforescente en función de la concentración de  $\text{Na}_2\text{SO}_3$ .

Fosforescencia a temperatura ambiente inducida por átomos pesados

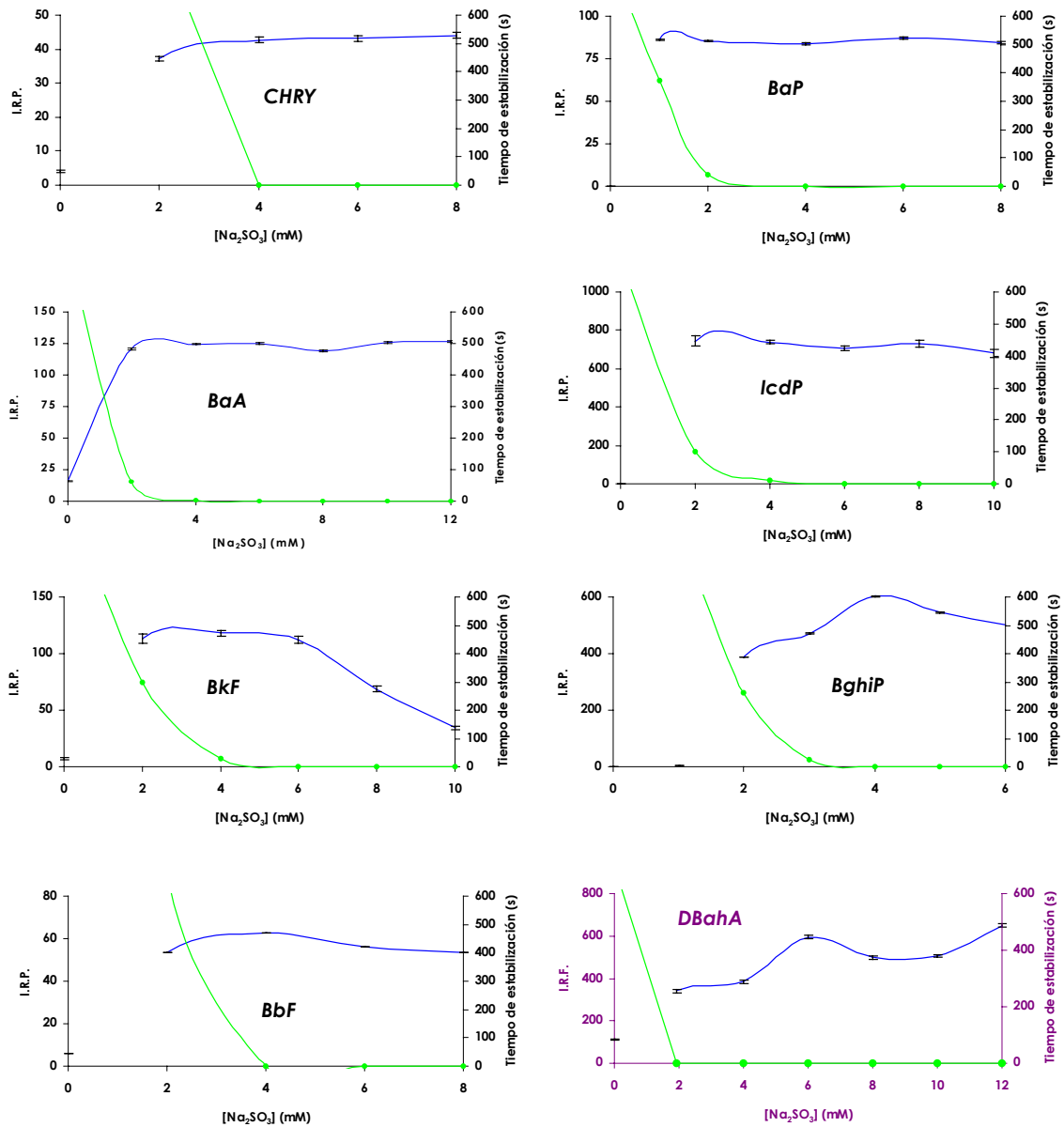


Figura A.3-9 (continuación). Intensidad (—) y tiempo de estabilización (—) de la señal fosforescente en función de la concentración de  $\text{Na}_2\text{SO}_3$ .

De nuevo con la optimización de este parámetro experimental se observa que el comportamiento del DBahA es diferente al resto, aunque la tendencia es la misma, se puede comprobar que en ausencia de desoxigenante la señal ya es muy importante, por lo que se puede decir que el oxígeno afecta también en gran medida a la obtención de la señal fluorescente retardada.

### 5.3. Influencia de disolventes orgánicos

La limitación de la HAI-RTP al estudio de analitos insolubles en agua, lleva a estudiar la influencia de la presencia de porcentajes de disolventes orgánicos, miscibles con ella, con el fin de posibilitar la solubilización de sustancias que no lo fueran en medio acuoso, y ampliar de esta forma el campo de aplicación de esta metodología.

Debido a que los HAPs son bastante insolubles en agua, es necesario disolver los analitos en disolventes orgánicos y añadir un disolvente orgánico a las muestras que ayude a su solubilización. Por tanto, se estudió el efecto que produce la utilización de cinco disolventes orgánicos miscibles con agua (etanol, metanol, acetonitrilo, dimetilformamida y acetona) en las muestras a diferentes porcentajes en volumen.

En los trabajos previos se llevó a cabo la elección del disolvente que ofrecía mejores características fosforescentes para cada analito, en la Figura A.3-10 se pueden observar las gráficas obtenidas del estudio realizado (no se muestran las barras de error por no complicar las gráficas), realizándose las medidas de la intensidad de fosforescencia en las condiciones instrumentales preliminares (ver Tabla A.3-3) y con unas condiciones experimentales de átomo pesado y desoxigenante de partida en las que los analitos emitieran señal (Tabla A.3-4), variando el (%v/v) de los distintos disolventes orgánicos desde 0 hasta 30%.

Es de destacar que el estudio de este parámetro es bastante importante y además es uno de los que nos proporciona más posibilidades en este tipo de metodología, con la adición de los 5 disolventes orgánicos a distintos %(v/v) se nos abre un gran número de posibilidades

Fosforescencia a temperatura ambiente inducida por átomos pesados

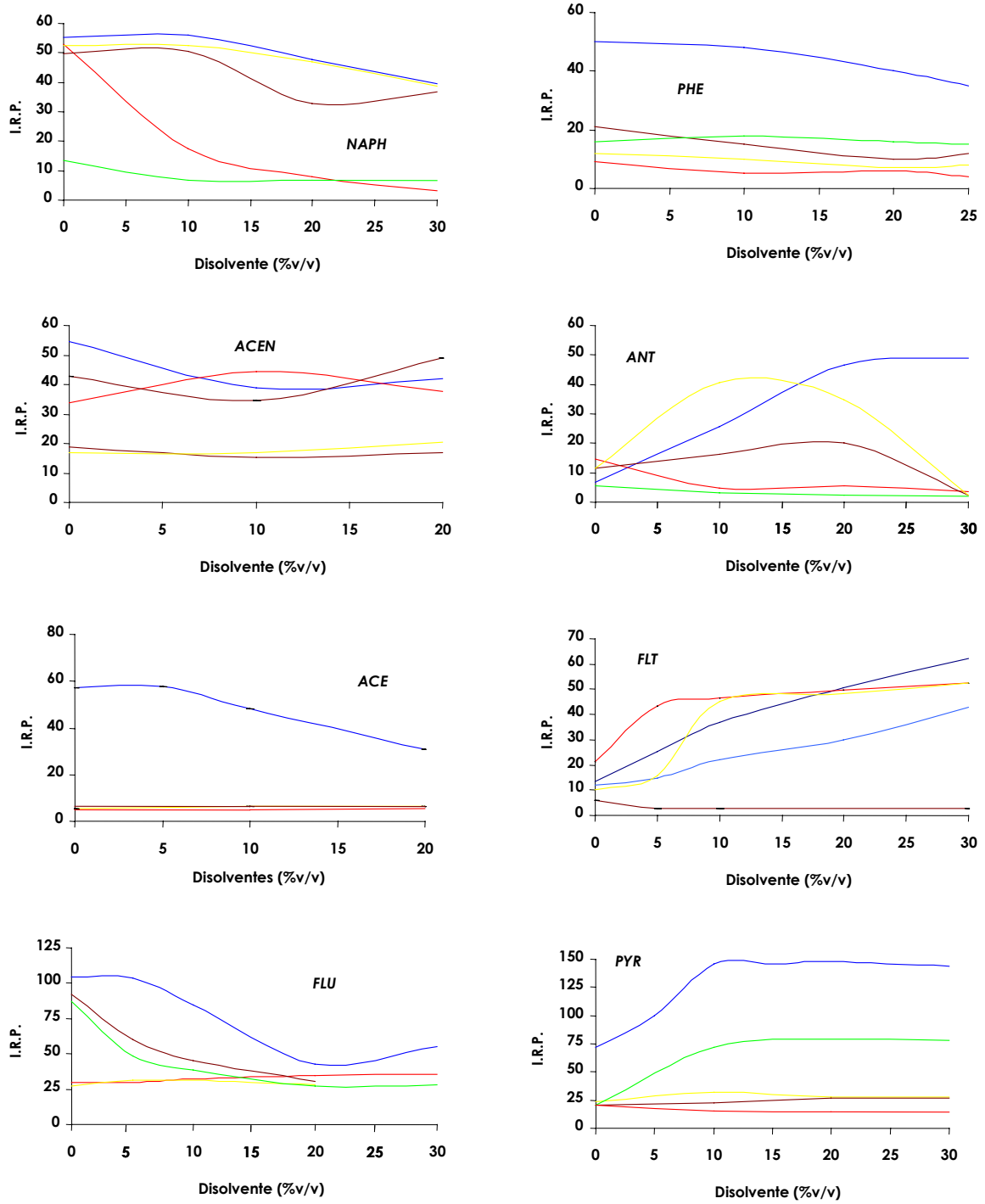


Figura A.3-10. Efecto de disolventes orgánicos sobre la señal de fosforescencia. Etanol (—), metanol (—), acetonitrilo (—), dimetilformamida (—) y acetona (—).

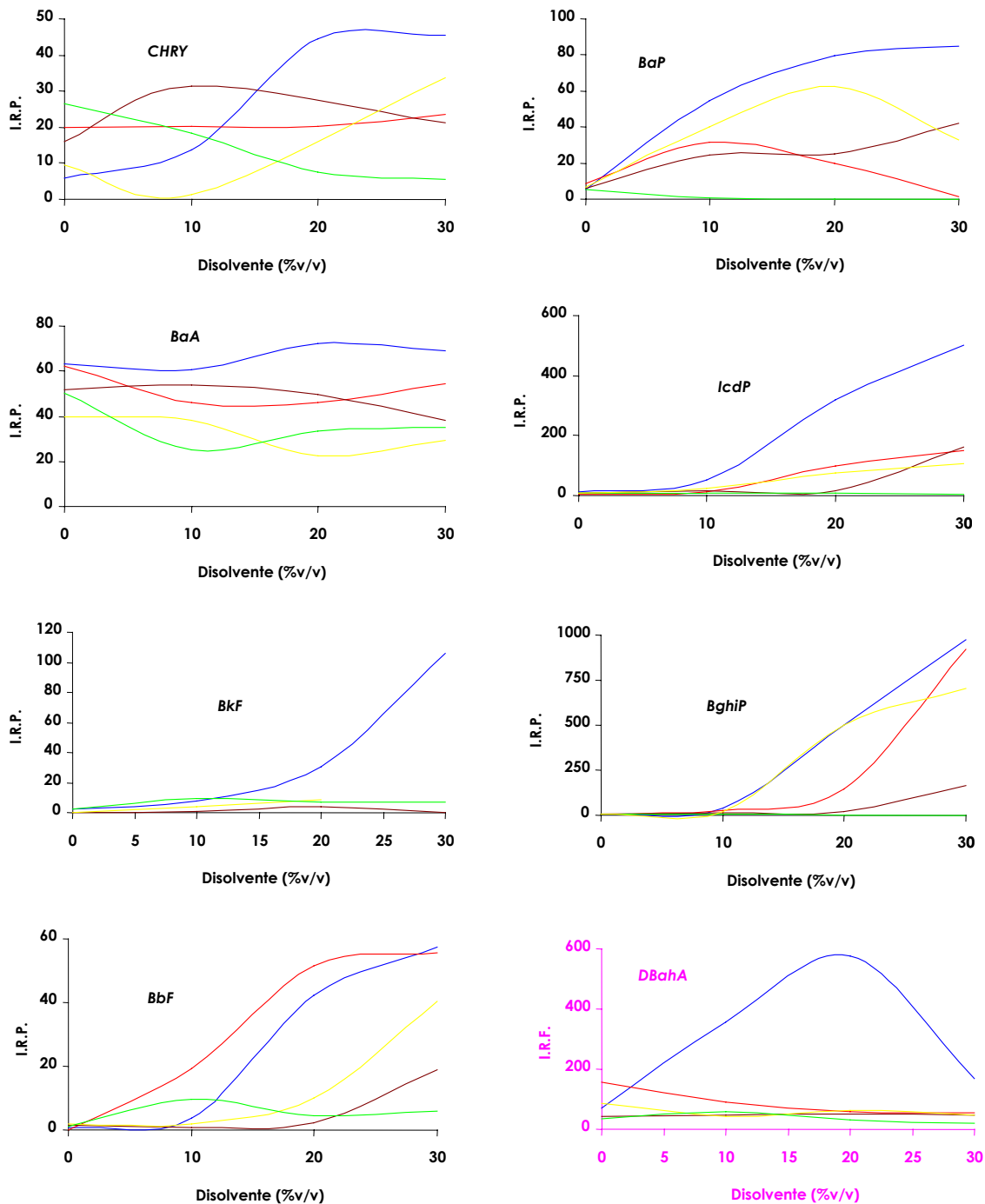


Figura A.3-10 (continuación). Efecto de disolventes orgánicos sobre la señal de fosforescencia. Etanol (—), metanol (—), acetonitrilo (—), dimetilformamida (—) y acetona (—).

Como se pudo comprobar en los trabajos previos realizados el mejor disolvente para obtener la mejor señal con todos los HAPs en conjunto fue el acetonitrilo, aunque este extenso estudio puede ser muy aprovechable, debido a que variando el disolvente y el % del mismo se puede llegar a desarrollar diferentes métodos selectivos simplemente variando este parámetro.

Una vez hemos llegado al compromiso de elegir el acetonitrilo como disolvente orgánico para continuar el estudio de los HAPs se estudió también como afecta la presencia del disolvente acetonitrilo a la emisión fosforescente de los analitos en estudio, los resultados óptimos se presentan en la Tabla A.3-10. Se puede observar como en cinco de los HAPs, NAPH, ACEN, ACE, FLU y PHE la mejor señal se obtiene sin adición de disolvente orgánico adicional, simplemente con el pequeño porcentaje de la alícuota de la disolución de analito en ACN (% comprendidos entre un 0.01 y 0.4). En el resto de los casos la mejor señal se obtiene con la adición de una pequeña cantidad de disolvente que varía entre el 5% (v/v) necesario para el PYR y del 30% (v/v) para el CHRY (ver Figura A.3-11).

**Tabla A.3-10. (%v/v) óptimos de acetonitrilo**

<b>Compuesto</b>	<b>Acetonitrilo (%v/v)</b>
<b>NAPH</b>	0
<b>ACEN</b>	0
<b>ACE</b>	0
<b>FLU</b>	0
<b>PHE</b>	0
<b>ANT</b>	20
<b>FLT</b>	25
<b>PYR</b>	5
<b>CHRY</b>	30
<b>BaA</b>	15
<b>BkF</b>	25
<b>BbF</b>	25
<b>BaP</b>	25
<b>IcdP</b>	25
<b>BghiP</b>	25
<b>DbahA</b>	15



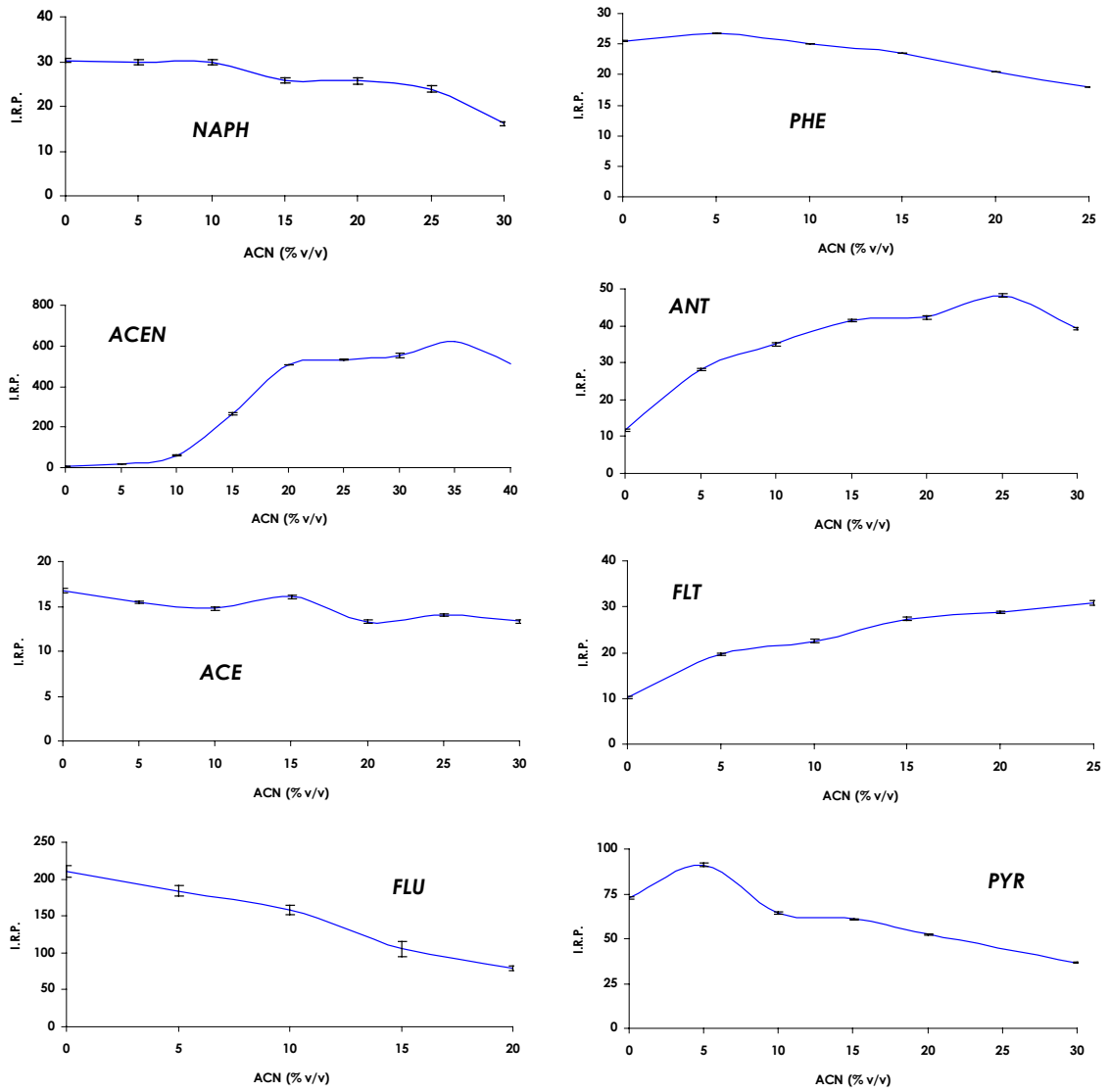


Figura A.3-11. Efecto del acetonitrilo sobre la señal fosforescente.

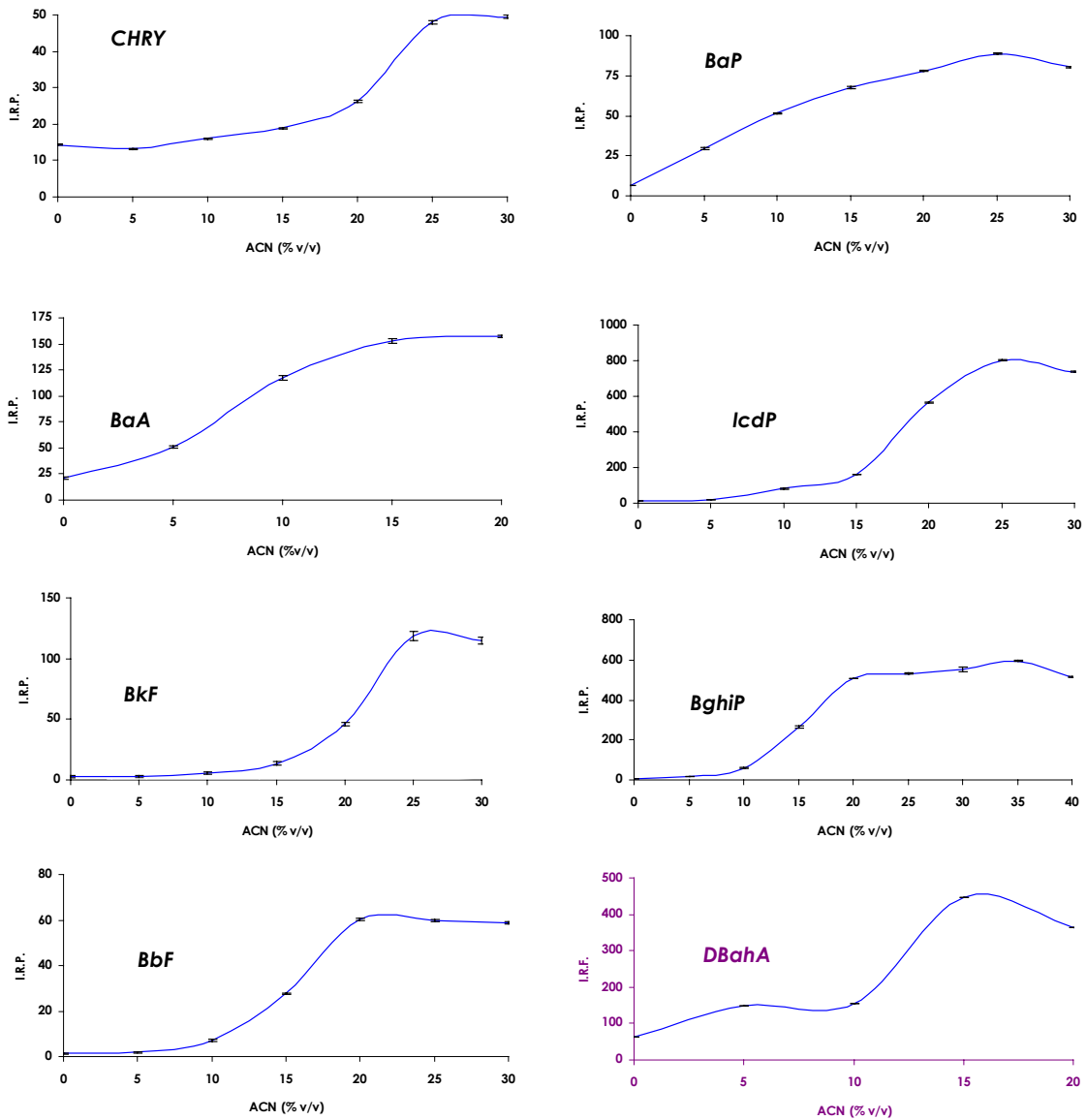


Figura A.3-11 (continuación). Efecto del acetonitrilo sobre la señal fosforescente.

#### 5.4. Estabilidad con el tiempo

Se comprobó la estabilidad de la intensidad de fosforescencia con el tiempo. Para ello se preparó una disolución de cada uno de los 16 HAPs a los valores instrumentales y experimentales optimizados hasta este momento, las disoluciones se enrasaron hasta 10 ml con agua bidestilada y se introdujeron en la cubeta de medida, registrándose la señal analítica durante 1 hora.

Se pudo observar en todos los casos que la señal analítica es instantánea y en la mayoría de los casos permanece perfectamente estable durante al menos 1 hora (Figura A.3-12). Se pudo comprobar como para algunos compuestos (ACE, FLU, PYR) la señal disminuye un poco en los primeros 600 s, siendo el caso del PYR el más acusado, y el caso del DBahA en el cual la señal es estable hasta los 1800 s donde comienza a disminuir. Todo lo contrario le ocurre al BbF, en el cual la intensidad aumenta durante los primeros 300 s, estabilizándose posteriormente.

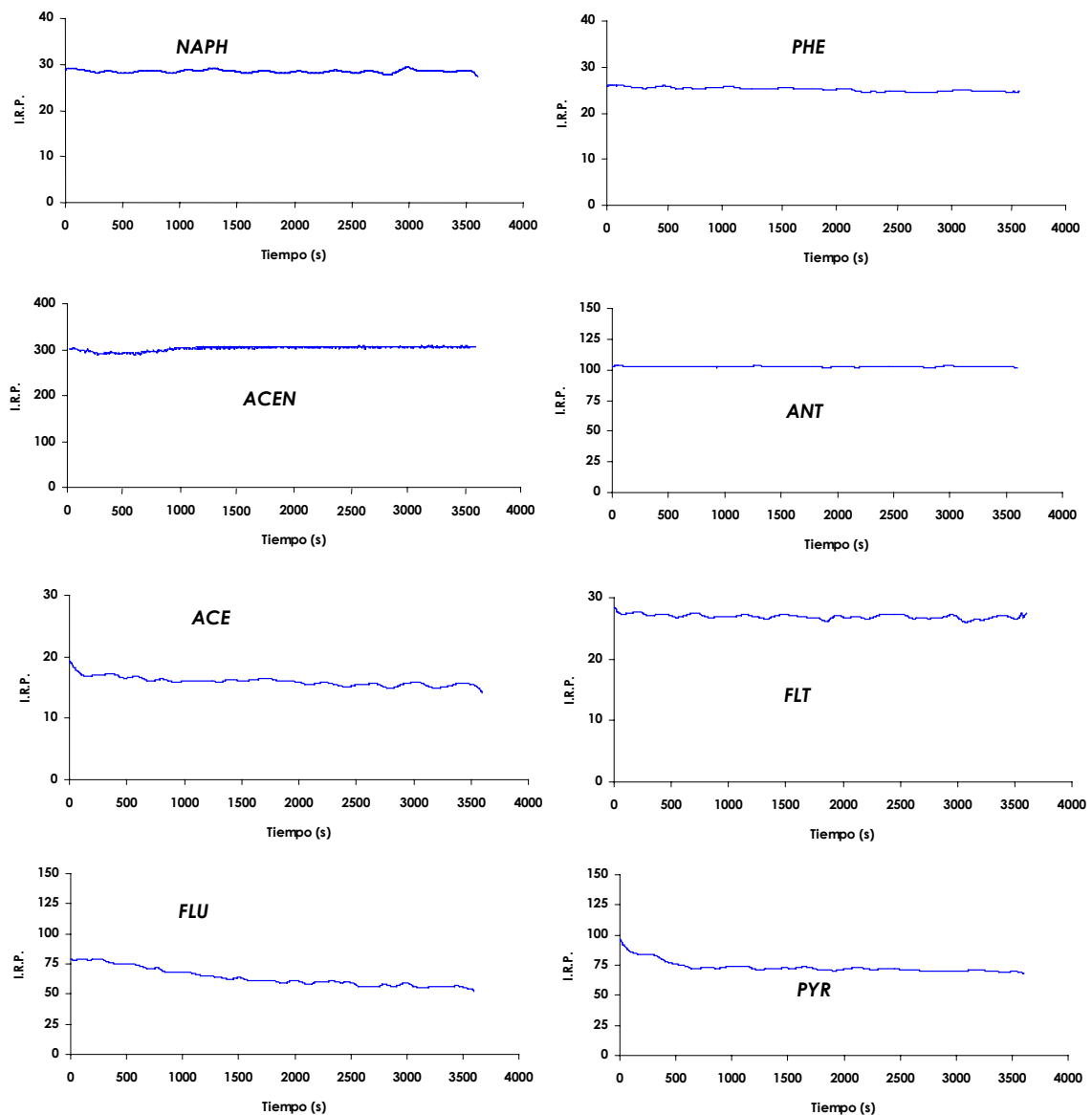


Figura A.3-12. Estabilidad de la emisión fosforescente con el tiempo.

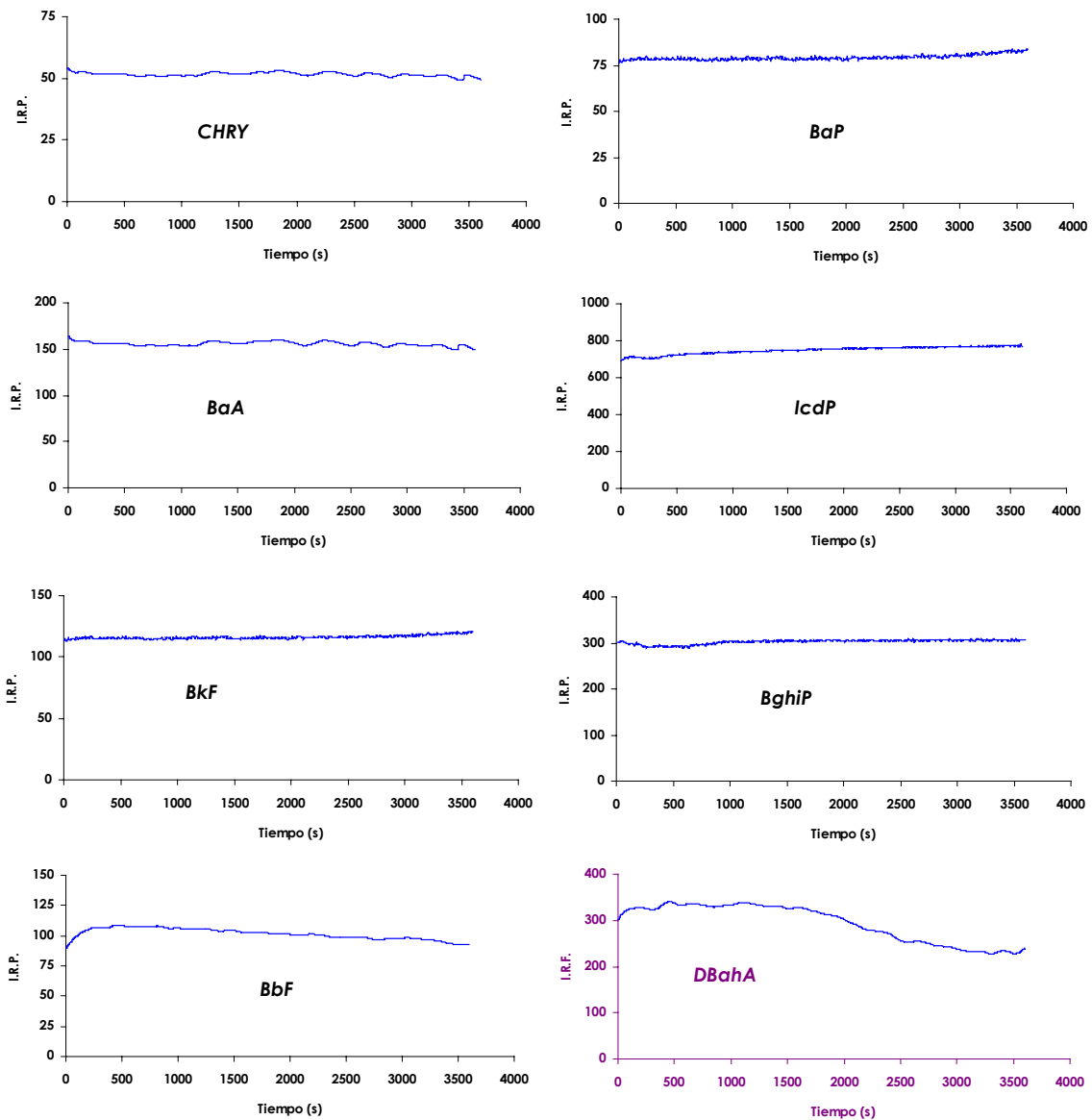


Figura A.3-12 (continuación). Estabilidad de la emisión fosforescente con el tiempo.

## 6. ESTABLECIMIENTO DE LOS MÉTODOS ANALÍTICOS DE LOS HAPs

Se procedió al establecimiento de los métodos analíticos una vez optimizadas las variables experimentales e instrumentales que intervienen en este sistema. En este apartado se establecen el procedimiento operatorio, las rectas de calibrado y los parámetros de fiabilidad para los 15 HAPs.

## 6.1. Procedimiento operatorio

En un matraz de 10 mL se colocan alícuotas de una disolución de nuestro analito en estudio de 50 µg/mL, según la concentración requerida, a continuación se adicionan la cantidad y tipo de átomo pesado (KI 2.0 M y TINO<sub>3</sub> 0.25 M) y Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> 0.1 M necesaria en cada caso (Tabla A.3-11) y se enrasa con agua. Estas muestras se introducen dentro de la cubeta de medida y se registra la emisión fosforescente a las longitudes de onda de excitación y emisión óptimas (Tabla A.3-5), con unas rendijas de emisión y excitación de 20/20 nm, un voltaje del detector de 950 V, un tiempo de demora de 120 µs y un tiempo de integración que varía según el analito (ver Tabla A.3-11), registrando también la señal de un blanco preparado en las mismas condiciones pero sin contener el analito estudiado.

**Tabla A.3-11. Condiciones instrumentales y experimentales óptimas para cada HAP**

Compuesto	t <sub>g</sub> (ms)	Átomo pesado		[Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> ] (M)	Acetonitrilo (%v/v)
		Tipo	Concentración (M)		
<b>NAPH</b>	4.5	KI	1.2	0.006	0
<b>ACEN</b>	5.0	TINO <sub>3</sub>	0.037	0.003	0
<b>ACE</b>	5.0	KI	1.2	0.008	0
<b>FLU</b>	5.0	TINO <sub>3</sub>	0.025	0.003	0
<b>PHE</b>	0.5	KI	1.2	0.005	0
<b>ANT</b>	5.0	TINO <sub>3</sub>	0.075	0.009	20
<b>FLT</b>	3.5	KI	1.2	0.005	25
<b>PYR</b>	1.5	TINO <sub>3</sub>	0.075	0.003	5
<b>CHRY</b>	2.5	KI	1.2	0.005	30
<b>BaA</b>	4.5	KI	1.4	0.006	15
<b>BkF</b>	5.0	KI	1.0	0.005	25
<b>BbF</b>	4.0	KI	1.2	0.005	25
<b>BaP</b>	5.0	KI	1.0	0.006	25
<b>IcdP</b>	5.0	KI	1.0	0.006	25
<b>BghiP</b>	5.0	KI	0.8	0.005	25

## 6.2. Recta de calibrado

Se establecieron las rectas de calibrado para los métodos propuestos variando la concentración de los analitos y registrando tres réplicas para cada nivel de concentración.

En la Figura A.3-13 se muestra la influencia de la concentración sobre la señal de fosforescencia y en la Tabla A.3-12 se muestran los parámetros estadísticos más importantes de las rectas de calibrado de cada HAP.

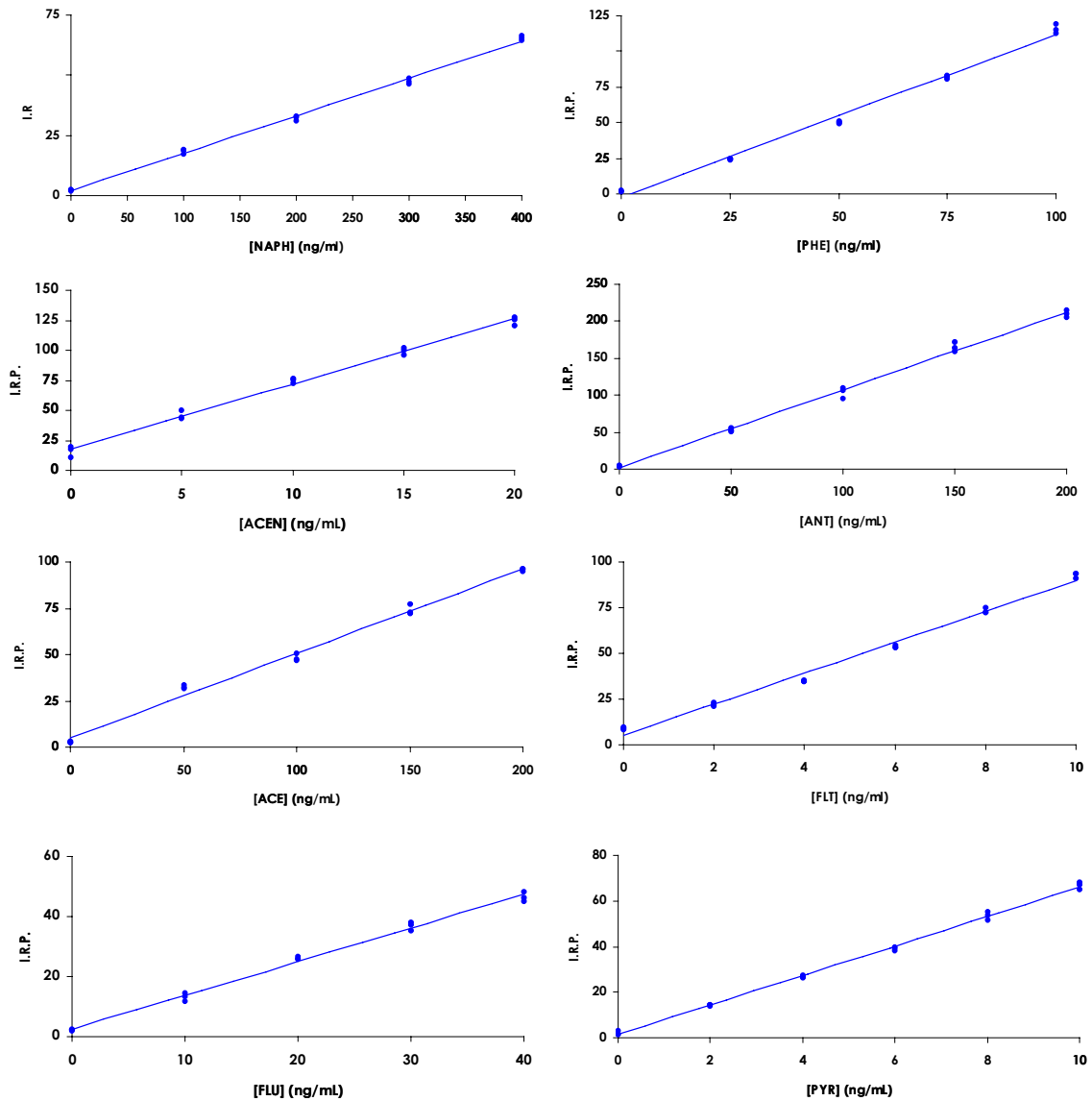


Figura A.3-13. Rectas de calibrado de los HAPs.

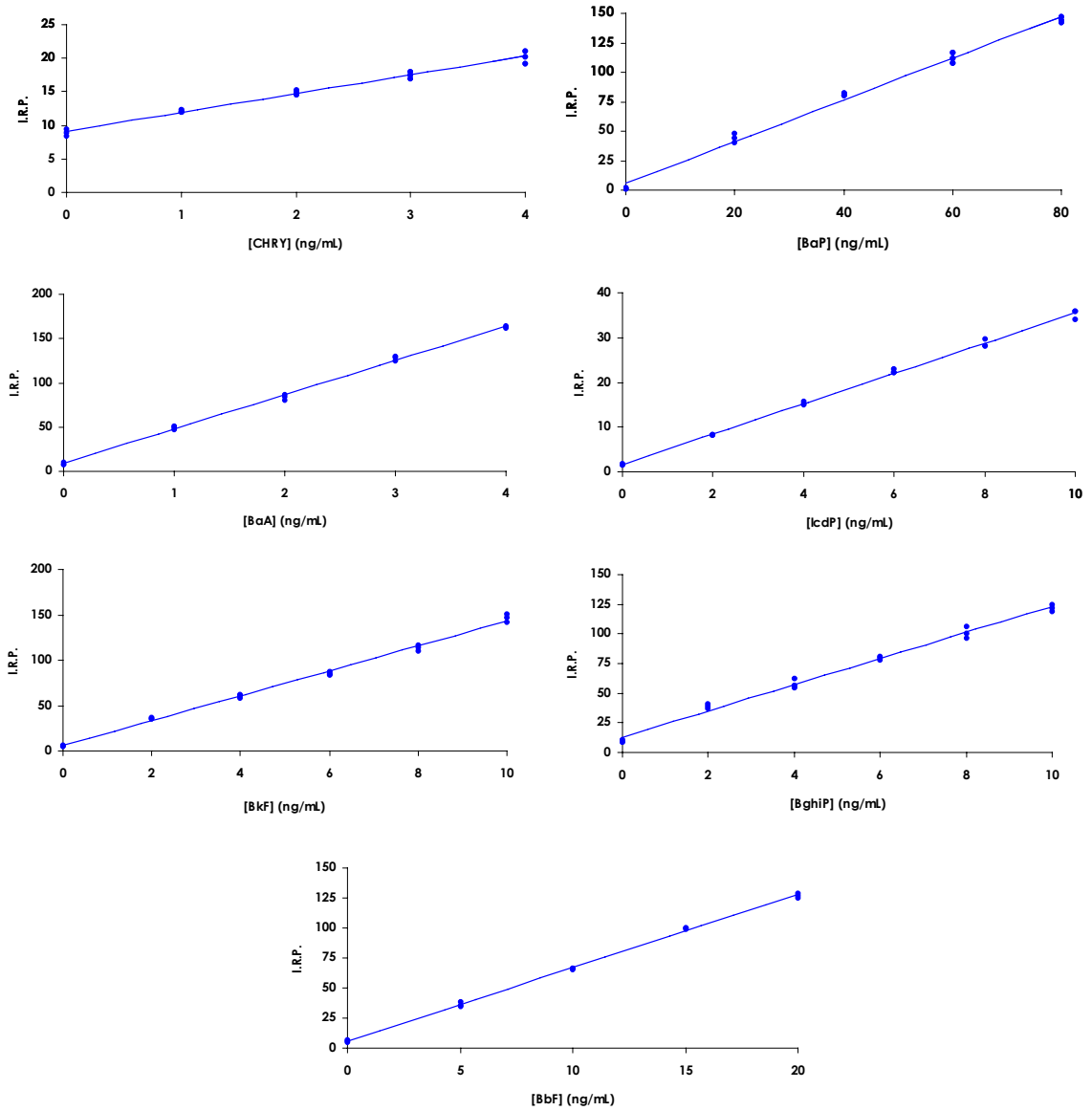


Figura A.3-13 (continuación). Rectas de calibrado de los HAPs.

Tabla A.3-12. Parámetros estadísticos de las rectas

Parámetros estadísticos				
Compuesto	Ordenada en el origen (a)	Pendiente (b)	Coefficiente de correlación (r)	Coefficiente de determinación (r <sup>2</sup> ) (%)
NAPH	2.02	0.15	0.998	99.71
ACEN	18.01	5.40	0.996	99.27
ACE	5.00	0.45	0.996	99.22
FLU	2.49	1.12	0.997	99.40
PHE	-2.16	1.14	0.995	99.15
ANT	2.38	1.04	0.997	99.52
FLT	5.14	8.47	0.995	98.99
PYR	1.50	6.45	0.998	99.74
CHRY	8.95	2.84	0.995	99.18
BaA	9.30	38.61	0.998	99.77
BkF	5.90	13.71	0.998	99.57
BbF	5.71	6.12	0.999	99.85
BaP	5.71	1.77	0.996	99.34
IcdP	1.67	3.38	0.998	99.75
BghiP	13.11	11.00	0.995	99.15

### 6.3 Parámetros de fiabilidad

Para demostrar la capacidad de esta técnica para determinar los compuestos estudiados, se han establecido los parámetros analíticos de posibles métodos mediante el uso de HAI-RTP (Tabla A.3-13).

Tabla A.3-13. Parámetros analíticos

Compuesto	Intervalo dinámico lineal (ng/mL)	Límite de detección (ng/mL)	Límite de cuantificación (ng/mL)	D.E.R. (%) (*ng/mL)
NAPH	0-400	17.82	59.39	1.82
ACEN	0-20	1.43	4.81	3.94
ACE	0-200	14.92	49.72	4.47
FLU	0-40	2.60	8.68	3.56
PHE	0-100	7.57	25.24	4.87
ANT	0-200	11.48	38.24	3.42
FLT	0-10	0.76	2.54	4.01
PYR	0-10	0.38	1.30	1.99
CHRY	0-6	0.51	1.72	3.83
BaA	0-4	0.15	0.54	2.41
BkF	0-10	0.51	1.69	2.55
BbF	0-20	0.64	2.11	1.87
BaP	0-80	5.51	18.40	3.71
IcdP	0-10	0.38	1.30	1.87
BghiP	0-10	0.73	2.41	3.49

\* Mitad del intervalo dinámico lineal



Podemos observar como los límites de detección oscilan entre los 0.15 ng/mL para el BaA y 17.82 ng/mL en el caso del NAPH. Es de destacar que en la mayoría de los HAPs este límite anda entorno a las decenas de ng/L, salvo en los casos de NAPH, ACE, PHE y ANT, para los cuales los límites de detección son del orden de las decenas de ng/mL. Obteniendo en todos los casos unas desviaciones estándar relativa no superiores al 4.81 %.

A la vista de los resultados obtenidos, esta nueva metodología puede permitir establecer métodos de determinación de los HAPs de forma individual o conjunta con buenas características analíticas que compiten en términos de límites de detección, sencillez, rapidez y bajo coste con los ofrecidos hasta el momento por otras técnicas luminiscentes.



**PARTE B**  
**Optosensores fosforescentes a temperatura ambiente**



## INTRODUCCIÓN PARTE B

### OPTOSENSORES FOSFORESCENTES A TEMPERATURA AMBIENTE

<b>1. IMPORTANCIA ACTUAL, DEFINICIÓN Y COMPONENTES DE LOS SENSORES .....</b>	<b>215</b>
1.1. Importancia actual .....	215
1.2. Definición de sensor .....	217
1.3. Componentes básicos de un sensor.....	219
<b>2. DISEÑO DE UN SENSOR .....</b>	<b>220</b>
<b>3. CLASIFICACIÓN DE LOS SENSORES .....</b>	<b>221</b>
<b>4. SENSORES ÓPTICOS .....</b>	<b>224</b>
4.1. Generalidades.....	224
4.2. Clasificación de los sensores ópticos.....	227
<b>5. SENSORES TIPO CÉLULA (OPTOSENSORES) .....</b>	<b>228</b>
5.1. Análisis por inyección de flujo .....	229
5.2. Acoplamiento de las fases sensoras a sistemas de análisis en flujo .....	230
5.3. Clasificación de los sensores en flujo .....	232
5.4. Características que deben cumplir los sensores de flujo .....	233
5.5. Ventajas e inconvenientes de los sensores de flujo .....	233
<b>6. OPTOSENSORES FOSFORESCENTES A TEMPERATURA AMBIENTE.....</b>	<b>234</b>
<b>7. LA TECNOLOGÍA DE IMPRESIÓN MOLECULAR EN EL DESARROLLO DE FASES SENSORAS .....</b>	<b>241</b>
7.1. Generalidades.....	241
7.2. Síntesis de polímeros impresos.....	242



## 1. IMPORTANCIA ACTUAL, DEFINICIÓN Y COMPONENTES DE LOS SENSORES

### 1.1. Importancia actual

La creciente demanda de técnicas de análisis químico rápidas, fiables y sencillas ha provocado un enorme interés en la búsqueda y desarrollo de nuevas tecnologías analíticas que den lugar a métodos de análisis y/o instrumentación sencilla para la monitorización directa, a tiempo real de un analito en una muestra y de forma reversible. La importancia actual de este objetivo explica el desarrollo exponencial que han experimentado los sensores químicos a lo largo de las últimas décadas.

El desarrollo de sensores químicos ha sido y es muy importante en campos tan variados como la medicina, el control ambiental y en diversos aspectos de las actividades industriales, como la seguridad en minería o el control de procesos industriales, etc..

En el campo de la Química Clínica [1,2], la posibilidad de miniaturización de los sensores ha dado muy buenos resultados, llegando a desarrollarse dispositivos muy económicos (desechables o reutilizables) que pueden ser separados del módulo principal.

En el campo del control ambiental [3,4], el empleo de sensores constituye una herramienta muy útil en la identificación y cuantificación de contaminantes de forma remota y continua, dando información muy valiosa a la hora de llevar a cabo una estrategia adecuada para remediar los efectos de la contaminación en áreas contaminadas o en zonas con desechos peligrosos para la vida.

También se ha producido un importante incremento en la demanda de automatización en procesos industriales. Las medidas de parámetros químicos son necesarias para seguir y controlar un proceso. Así, en la Química Analítica de procesos, los métodos para el análisis on-line están basados en la disponibilidad de sensores químicos. La demanda más importante en la industria en cuanto a las características de los sensores son robustez, estabilidad con el tiempo o con la

- 
1. C. Kolle, W. Gruber, W. Trettnak, K. Biebernig, C. Dolezan, F. Reininger, P. O'Leary. *Sens & Actuators B*, 38 (1997) 141.
  2. A. Elamari, N. Gisin, J.L. Muñoz, S. Poitry, M. Tsacopoulos, H. Zbinden. *Sens. & Actuators B*, 38 (1997) 183.
  3. W.R. Seitz, O.S. Wolfbeis (Ed.) "Fibre optic chemical sensors and biosensors". Vol. II, CRC Press., Boca Raton, Cap. 9, pág. 1 (1991).
  4. K.R. Rogers, J.N. Lin. *Biosensors Bioelectron.*, 7 (1992) 317.

temperatura, además de cumplir con una biocompatibilidad en procesos biotecnológicos.

El empleo de sensores químicos en estos campos puede dar lugar a resultados cuantitativos o semicuantitativos rápidos, en la propia matriz de la muestra, es decir, "in situ", reduciendo los costes de transporte y material de laboratorio, pues se minimiza el número de muestras requeridas en comparación con las necesidades para su análisis en el laboratorio, empleando los métodos clásicos para su confirmación. Además, la posibilidad de obtener medidas a tiempo real hace que su mayor campo de aplicación sea en aquellas situaciones en las que la muestra no se pueda llevar fácilmente al laboratorio y para análisis de rutina.

Los sensores químicos permiten realizar tres tipos de análisis que son aplicables al control analítico, dependiendo de las necesidades y que son:

- Control continuo en línea a tiempo real (monitorización).
- Control "alarma" regular.
- Control ocasional discreto o al azar.

Es de resaltar, que el éxito final de un sensor químico es su comercialización y venta, y para ello sus características de robustez, selectividad, sensibilidad, linealidad, inmunidad e interferencia y ausencia de efectos de matriz deben ser elevadas para poder competir con los análisis clásicos de laboratorio.

Después de aproximadamente dos décadas de investigación en la tecnología de los sensores, la mayor parte de los esfuerzos han dado como resultado únicamente curiosidades científicas en las universidades y en los institutos de investigación. En el presente, muy poco de la tecnología de sensores, y en particular de los sensores ópticos, comparada con los cientos de diseños existentes, ha sido convertida en productos comerciales.

Varios son los obstáculos para la comercialización de sensores. En primer lugar, características tales como sensibilidad, intervalo dinámico lineal, reproducibilidad y estabilidad demostradas para los sensores a nivel de laboratorio no son lo suficientemente cercanas a las necesidades del usuario. Además, aún cuando se logren valores óptimos, estas características se reducen drásticamente durante los distintos pasos en el desarrollo y producción en masa de un sensor. Por lo tanto, es



importante realizar diseños con características químicas y físicas simples, que permitan el uso de tecnologías ya desarrolladas tanto como sea posible.

El segundo obstáculo es la necesidad de desarrollar sistemas integrados y de interfases. En el concepto de sensor es necesario tener en cuenta un paso posterior en el diseño de prototipos, y es que deben ser fácilmente utilizables por usuarios no habituales.

El tercer obstáculo concierne a lo no competitivo del campo de los sensores. La comercialización se torna difícil o imposible si no se defienden las verdaderas ventajas que éstos tienen sobre sus competidores basados en tecnologías ya desarrolladas y probadas.

Y por último, probablemente el factor más importante responsable de la lenta comercialización de sensores se debe al tipo de mercado al que va dirigido. Debido a la complejidad de estos sistemas, deben invertirse millones de euros para su desarrollo y, por lo tanto, hasta que no se hagan visibles los beneficios de estos mercados, las compañías privadas no estarán motivadas para investigar y transferir la tecnología de los sensores a la producción en cadena. Sin embargo, uno de los mercados en el que el desarrollo de sensores puede desempeñar un papel realmente importante es en varios sectores de la Química Analítica industrial, tales como controles ambientales de efluentes y análisis de control en la cadena de producción.

## 1.2. Definición de sensor

De forma general, se puede denominar "sensor" a cualquier dispositivo robusto, de uso sencillo y preferiblemente portátil, capaz de transformar (transducir) la magnitud de un fenómeno cuya identificación resulta de interés en una señal física medible, proporcionando de forma directa y continua información de su entorno<sup>5</sup>. Estos dispositivos se pueden dividir en dos grupos en función de que detecten cambios en parámetros físicos (presión, temperatura, etc.) o bien parámetros químicos (pH, concentración de oxígeno, etc.). Los sensores físicos son sensores capaces de cuantificar fenómenos físicos y a los diseñados para medir especies (bio)químicas se les conoce como sensores (bio)químicos.

---

5. J. Janata, A. Bezegh. *Anal. Chem.*, 60 (1988) 62R.

Resulta difícil dar una definición exacta y universal de lo que es un sensor químico. Según Roe y col. [6] un "Sensor Químico Ideal" es un dispositivo capaz de detectar y/o cuantificar a tiempo real una especie química en un medio complejo (muestra de interés) a través de una interacción química selectiva.

La IUPAC propone otra definición según la cual un "Sensor Químico Analítico" es un transductor miniaturizado que responde de manera selectiva y reversible a la presencia de compuestos químicos o iones dando lugar a señales eléctricas que dependen de la concentración de analito [7].

Idealmente, un sensor químico debe operar de forma continua y reversible, directamente en la matriz de la muestra y debe tener la capacidad de proporcionar información sobre la distribución espacial y temporal de una especie molecular o iónica a tiempo real [8]. Otras condiciones que idealmente debería cumplir un sensor son las de ser portátil además de ser barato, tener mínimo mantenimiento y ser fácil de usar.

De hecho, el principal objetivo que se persigue con un sensor ideal es integrar dos de los tres pasos generales a seguir en la determinaciones analíticas: tratamientos preliminares, medida y transducción de la señal analítica.

Las prestaciones de un sensor son derivadas de criterios analíticos generales así como de requerimientos específicos como son la estabilidad a largo plazo, miniaturización, estabilidad mecánica, tiempo de respuesta, estabilidad con el tiempo, compatibilidad con la presión, temperatura, explosividad, radiactividad, condiciones biológicas y esterilización.

Sin embargo, muy pocos sensores cumplen todas las anteriores especificaciones de forma estricta. De hecho, numerosos autores denominan también sensores a ciertos diseños que no son capaces de medir de forma continua la concentración de ciertas especies, es decir, que son irreversibles y sólo permiten una determinación. En este caso, hablamos de sensores "desechables o de un solo uso" [5].

En determinadas ocasiones puede ocurrir que el sensor no sea lo suficientemente selectivo; en este caso, puede ser de gran ayuda la incorporación de

- 
6. J.N. Roe, F.C. Szoka, A.S. Verkman. *Analyst*, 115 (1990) 353.
  7. A. Hulanicki, S. Glab, F. Ingman. IUPAC discussion paper, Commission V.I., July 1999.
  8. M. Valcárcel, M.D. Luque de Castro. *Analyst*, 118 (1993) 593.

alguna técnica simple de pretratamiento, en línea con la detección, para separar el analito de las especies interferentes presentes en la muestra [9]

Así pues, en sentido amplio, podríamos acabar definiendo un sensor como cualquier dispositivo de uso sencillo que sea para los instrumentos de medida lo que los sentidos son para los seres vivos [10], es decir, un sistema que proporcione una determinada respuesta a un estímulo exterior, respuesta que posteriormente es analizada y procesada.

### 1.3. Componentes básicos de un sensor

Un sensor químico capaz de informar sobre una especie química concreta consta básicamente de tres partes [11] (véase Figura 1):

- a. **Zona química o zona de reconocimiento:** en la cual se produce la interacción selectiva con el analito de interés, lo que origina un cambio físico-químico del sistema cuya magnitud está relacionada con la concentración de la especie a determinar. Pueden usarse distintos tipos de interacciones como base de la química de reconocimiento: reacciones ácido-base, de complejación, interacciones electrostáticas, desactivación luminiscente, adsorción en una superficie activa, etc..
- b. **Transductor físico:** que transforma en una señal analítica medible el cambio en alguna propiedad física del sistema producido por la interacción físico-química selectiva que tiene lugar con el analito de interés (se genera una señal óptica, eléctrica, etc.).
- c. **Elemento electrónico:** de tratamiento y medida de señales eléctricas.

La magnitud de la señal física obtenida se relaciona posteriormente con la concentración de analito a través de una curva de calibrado realizada previamente.

---

9. K. Cammann. *Sens. & Actuators B*, 6 (1992) 19.

10. R. Pereiro. "Estudio de nuevas fases sólidas reactivas para sensores ópticos de elementos de interés biomédico: Análisis de aluminio y potasio". Tesis Doctoral, Universidad de Oviedo, 1991.

11. J. Janata. "Principles of Chemical Sensors". CRC Press. Boca Raton, FL, vol. 1 (1991).

En resumen, un sensor consiste en una capa químicamente sensible o sistema de reconocimiento, un transductor para convertir la información química en una señal eléctrica u óptica y una electrónica para la evaluación de datos, normalmente integrada en el sensor.

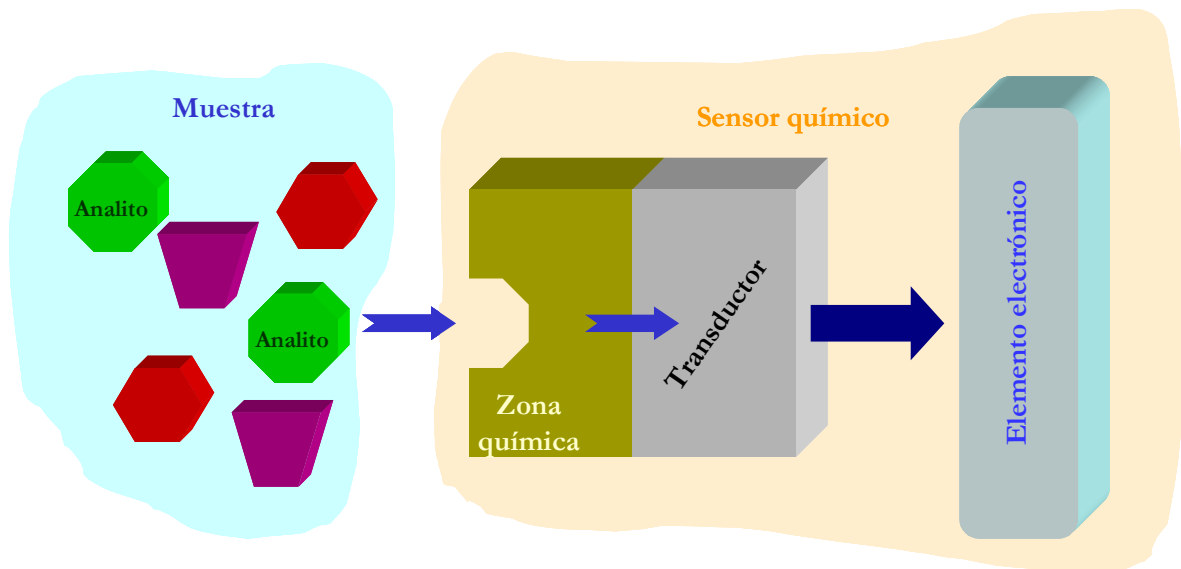


Figura 1. Partes de un sensor químico.

## 2. DISEÑO DE UN SENSOR

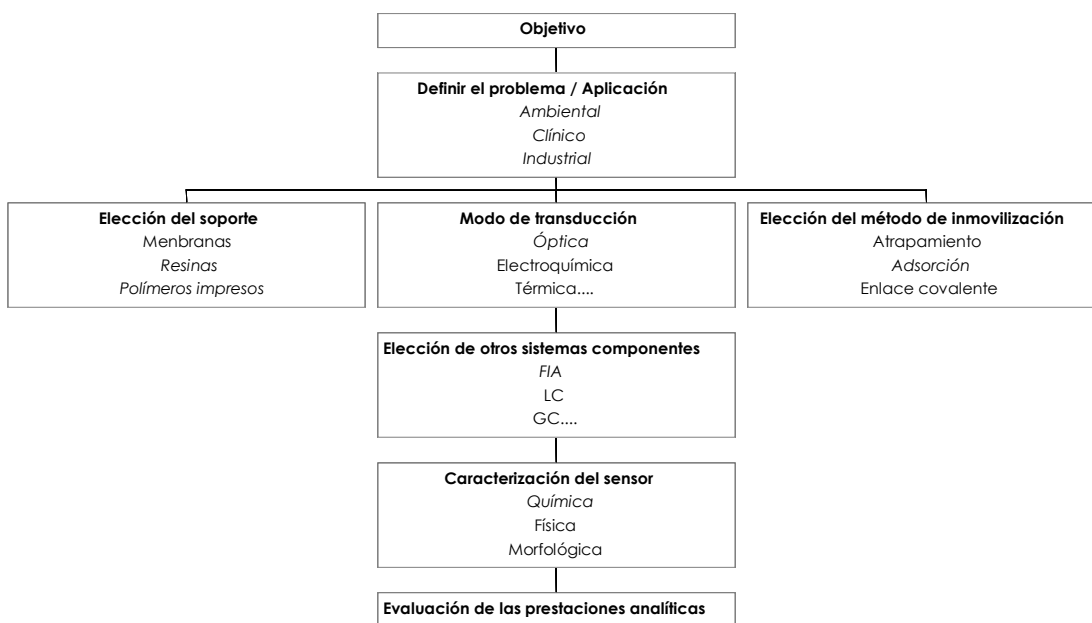
Los pasos básicos a seguir en el diseño de un sensor<sup>12</sup> para resolver un problema analítico particular están esquematizados en la Figura 2.

Las consideraciones prácticas de mayor importancia a tener en cuenta en el diseño de un sensor son:

1. **Mecanismo de reconocimiento.** La fase sensora debe reconocer la especie a determinar a través de una interacción fácilmente detectable y cuya magnitud sea función de la concentración del analito.

12. O.A. Sadik, J.M. Van Emon. *Chemtech.*, 27 (1997) 38.

2. **Inmovilización del reactivo.** Existen diferentes métodos (adsorción pasiva, entrecruzamiento, enlace covalente, iónico, etc.) cada uno de ellos con sus ventajas e inconvenientes. Debe tenerse en cuenta que dicha inmovilización puede alterar profundamente las características del analito en disolución.
  
3. **Transductores.** Según se midan cambios en alguna propiedad eléctrica, óptica, cambios de masa, etc., como consecuencia del reconocimiento, se puede hablar de transductores electroquímicos, ópticos, piezoeléctricos, etc..



**Figura 2. Esquema de las consideraciones a tener en cuenta en el diseño de un sensor.**

### 3. CLASIFICACIÓN DE LOS SENSORES

Se pueden establecer diferentes clasificaciones de los sensores utilizando diversos criterios. El gran interés que existe actualmente en el mundo de los sensores hace que estos se encuentren evolucionando continuamente y por tanto, es seguro que irán apareciendo otras clasificaciones a medida que se desarrollen nuevos tipos de sensores. Los criterios más utilizados y la clasificación de sensores correspondientes a cada criterio son los siguientes [13]:

13. J.M. Costa Fernández, A. Sanz Medel. "Sensores Químicos Fosforescentes a Temperatura Ambiente" en el libro A. Fernández Gutiérrez, S.G. Schulman (Eds) "Fosforescencia Molecular Analítica: Una Aproximación Práctica". Editorial Universidad de Granada, Granada, 2001.

- Atendiendo al modo de reconocimiento, los sensores pueden clasificarse en **sensores químicos** o **bioquímicos**. Cuando la etapa de reconocimiento se lleva a cabo mediante un elemento sensible biológico (por ejemplo una enzima, un anticuerpo, una célula) el dispositivo resultante es conocido como biosensor. Así pues, la diferencia entre un sensor químico y un biosensor está en la reacción (química o biológica) de reconocimiento del analito. Los sensores (bio)químicos han sido ampliamente utilizados para aplicaciones ambientales, clínicas, biológicas e industriales.
- De acuerdo con la naturaleza de la interacción medible en **sensores reversible** e **irreversibles**.
- Según su forma externa en **sensores planos**, **tipo sonda** o **tipo célula de flujo**.
- En función de la relación entre la zona de reconocimiento y el transductor en **sensores conectados** o **integrados**.
- Teniendo en cuenta el modo de operación en **sensores de medidas discretas (sensores tipo sonda)** o **de medidas en flujo (optosensores)**.
- Considerando el número de especies a determinar en **sensores simples** o **múltiples**, (monoparamétricos y multiparamétricos, respectivamente).
- Atendiendo a la naturaleza de la señal física que se genera y se mide, es decir, atendiendo al tipo de transductor, los sensores químicos se han venido clasificando en **sensores eléctricos**, **ópticos**, **térmicos** o **piezoeléctricos** [14].

Esta última clasificación, basada en la naturaleza de la señal física que se genera o mide, es bastante general y es la más ampliamente establecida. Por ello, se procede a describir de una forma más pormenorizada esta clasificación.

1. **Electroquímicos:** miden cambios en alguna propiedad eléctrica del sistema (potencial, intensidad de corriente, etc.) y el cambio producido en las magnitudes eléctricas es proporcional a la concentración de analito. Un caso particular importante son los ISFETs (transistores de efecto de campo) usados principalmente como sensores potenciométricos, pero también es posible utilizarlos como sensores voltamperométricos o conductimétricos.

---

14. T.E. Edmonds, Ed. "Chemical Sensors". Blackie & Son, Reino Unido (1988).

2. **Ópticos:** se producen cambios en alguna propiedad óptica del sistema (absorbancia, reflectancia, luminiscencia) relacionada con la concentración de la especie a cuantificar.
3. **Térmicos:** se miden calores de reacción o cambios en la temperatura del sistema.
4. **Piezoeléctricos:** se cuantifican cambios de masa, de viscosidad, etc..

También se han desarrollado otros sensores, aunque en menor medida, que utilizan otros tipos de detección, pudiendo citar: los de ondas acústicas de superficie y los magnéticos, en donde se utilizan medidas de paramagnetismo.

A la vista de esto, no existe un principio universal para el desarrollo de un sensor, ya que cada caso requiere una adaptación específica de un principio de medida, por lo que existen sensores basados en medidas eléctricas, ópticas, gravimétricas o principios térmicos. Una visión general de los principios básicos para el desarrollo de sensores se puede ver en la Tabla 1.

**Tabla 1. Visión general de principios de funcionamiento o tipos de sensor**

Principio de funcionamiento	Tipo de sensor
Cambio en la conductividad	Óxidos de metales semiconductores Semiconductores orgánicos
Cambio en el potencial	Electrodos selectivos de iones Sensores de gases en estado sólido Transistores de efecto de campo
Cambio de intensidad de corriente	Sensores amperométricos (electrodos de oxígeno y enzimas, inmunosensores, sonda de gases en estado sólido)
Cambio de la frecuencia de resonancia	Cristales piezoeléctricos resonantes
Cambio de propiedades ópticas	Transmisión/absorción, dispersión, reflectancia, fluorescencia, refracción, tiempo de decaimiento, polarización
Efectos térmicos	Sensores térmicos y calorimétricos

## 4. SENSORES ÓPTICOS

### 4.1. Generalidades

La importancia y el potencial de los sensores químicos ha ido en aumento durante los últimos años. Los primeros trabajos desarrollados sobre sensores para especies químicas se enfocaron desde una perspectiva electroquímica (sensores potenciométricos y amperométricos). No obstante, el gran volumen de conocimiento de que se dispone hoy día sobre métodos óptico-espectroscópicos y las amplias posibilidades que los mismos ofrecen, han dado lugar a la búsqueda e investigación en el campo de los sensores con detección óptico-espectroscópica [15,16].

La conjugación de las excelentes propiedades que ofrecen las fibras ópticas como vías de transmisión de luz a través de grandes distancias con la abundante información química cuantitativa y cualitativa que se puede obtener mediante técnicas analíticas espectroscópicas han llevado, en las últimas décadas, a un desarrollo espectacular de los sensores de fibra óptica (también llamados "optrodos" [17], término que resulta de la combinación de las palabras "óptico" y "electrodo" y que surge al observar cierta similitud entre el trabajo con un sensor óptico y un electrodo) para el análisis y/o control de parámetros de interés químico, medioambiental, clínico, etc..

Los sensores ópticos se basan en la inmovilización de una determinada fase sensora en el extremo de una fibra óptica o de un haz de fibras bifurcado. La interacción del analito a determinar con la fase sensora provoca un cambio en las propiedades ópticas de ésta que se recoge mediante la utilización de fibras ópticas. El uso de fibras ópticas permite "acercar el espectrómetro a la muestra", mientras que el empleo de fases sensoras inmovilizadas permite llevar a cabo medidas en la propia muestra ("in situ").

Los pioneros en la utilización de fases sensoras inmovilizadas para llevar a cabo medidas continuas en fluidos biológicos fueron Luebbers y Optiz<sup>18</sup>. Desde entonces numerosos trabajos han continuado esta línea de desarrollo de sensores de fibra óptica para llevar a cabo la medida de numerosas especies en muestras reales.

---

15. W.R. Seitz. *Anal. Chem.*, 56 (1984) 16A.

16. O.S. Wolfbeis. "Fiber Optic Chemical Sensors", CRC Press, Boca Raton, FL, vol. 1, 1991.

17. S.A. Borman. *Anal. Chem.*, 53 (1981) 616A.

18. D.W. Luebbers, N. Optiz. *Naturforsch. C. Biosci.*, 30c (1975) 532.



Es importante tener en cuenta que en numerosas ocasiones se habla de sensores ópticos para referirse, únicamente, a sistemas donde se emplean reactivos inmovilizados sobre soportes sólidos para la medida de forma continua, a través de una interacción química selectiva con el analito, sin la utilización de fibras ópticas. Sin embargo, en estos casos la fase sensora desarrollada debería acoplarse de manera sencilla a un sistema de fibras ópticas, paso último necesario para el desarrollo de un verdadero optrodo.

La sensibilidad, especificidad y versatilidad de los métodos ópticos han hecho de la espectroscopía una técnica muy popular sobre la cual se basan potenciales sistemas de control. En general, podemos decir que hay un elevado número de ventajas inherentes a los sensores ópticos que aconsejan el uso de los mismos frente a otros tipos de sensores, particularmente, frente a los electroquímicos. Éstas son:

- La señal óptica no está sujeta a interferencias eléctricas.
- No se requiere un sistema de referencia.
- No hay consumo significativo de analito por parte de la fase sensora, por lo que la muestra queda inalterada tras la medida.
- La fase activa no necesita estar en contacto con el sistema óptico. Esto simplifica extraordinariamente el desarrollo de sensores en los que la fase activa debe ser sustituida o reemplazada, lo cual resulta necesario cuando se desarrollan fases basadas en reactivos con vida limitada o en sensores de un solo uso (desechables).
- En algunos casos, utilizando un discriminador adecuado, es posible acoplar distintas fases ópticamente activas a un único sistema de transducción, lo cual da lugar a una importante disminución del costo y resulta una ventaja económicamente clara pues es posible la realización del análisis rápido de diversos analitos con un mismo equipo.
- Son susceptibles de ser miniaturizados, permitiendo el desarrollo de sensores de fibra óptica muy pequeños y flexibles.
- Ofrecen la posibilidad de resoluciones a varias longitudes de onda e información temporal, pudiéndose aplicar también técnicas de tiempo resuelto [19,20].
- Es posible desarrollar sensores ópticos para analitos que no pueden ser determinados por técnicas electroquímicas.

---

19. R.L. Plant, D.H. Burns. *Appl. Spectr.*, 47 (1993) 1594.

20. P.M. Gewehr, D.T. Delpy. *Med. & Biol. Eng. & Comp.*, 31 (1993) 2.

- Los sensores basados en la atenuación de la fluorescencia se pueden usar en un intervalo de concentraciones mucho más amplio que los sensores electroquímicos.
- En determinadas aplicaciones, como a la hora de realizar medidas biomédicas "in vivo", los sensores ópticos son más seguros, evitándose el riesgo de un "shock" eléctrico.
- Algunos sensores ópticos pueden trabajar en intervalos de temperatura extremos lo que hace posible su esterilización a temperaturas elevadas.
- Cuando se emplean sistemas de fibra óptica, es posible transmitir señales ópticas a grandes distancias, lo que permite realizar análisis en ambientes peligrosos (en ambientes radiactivos, en atmósferas contaminadas o a altas temperaturas o presiones, etc.) sin necesidad de recurrir previamente a la realización de la toma de muestra.

Sin embargo, los sensores ópticos también presentan algunas desventajas, tales como:

- La luz ambiental puede interferir en las medidas.
- La estabilidad temporal del sensor puede no ser elevada debido a la fotodescomposición de los reactivos usados.
- Los tiempos de respuesta pueden ser grandes, sobre todo en los casos en los que estén involucrados fenómenos de transferencia de masa.
- En general, los sensores ópticos presentan intervalos lineales menores que los electroquímicos.
- Y en muchos casos, existe una carencia de reactivos selectivos y que interaccionan reversiblemente con el analito. Además, habitualmente hay una pérdida de sensibilidad tras su inmovilización.

Estos problemas explican, en parte, la falta hasta la fecha de éxito comercial de los sensores ópticos y garantizan un esfuerzo investigador continuado y ligado al trabajo conjunto de varias áreas [21].

La espectroscopía de emisión luminiscente ha desarrollado métodos caracterizados por su sensibilidad, selectividad y versatilidad; la industria de las telecomunicaciones ha logrado la comercialización de fibras ópticas de bajo coste que permiten transmitir luz y cubrir así largas distancias; se encuentran disponibles

---

21. O.S. Wolfbeis. *Trends Anal. Chem.*, 4 (1985) 184.

nuevas fuentes de radiación como láseres y diodos fotoemisores (LED's) [22] que permiten la excitación del analito prácticamente en todo el intervalo de longitudes de onda de la región visible; se han desarrollado fotodiodos de bajo costo; y por último, nuevos métodos quimiométricos junto con microprocesadores de alta capacidad y pequeño tamaño permiten almacenar y procesar datos, aún en el caso de relaciones complejas de señal-concentración.

#### 4.2. Clasificación de los sensores ópticos

Son numerosas las clasificaciones propuestas de los sensores ópticos atendiendo a diversos aspectos [13]. Así:

- **Según la naturaleza del fenómeno óptico medido**, se puede hablar de sensores de absorbancia, de reflectancia, de dispersión Raman, luminiscentes (fluorescentes, fosforescentes, quimioluminiscentes, bioluminiscentes), etc..
- **Según la naturaleza de interacción con el analito**, podemos hablar de sensores ópticos reversibles, cuando la interacción química del analito con la zona de reconocimiento del sensor es reversible y por ello no se consume apreciablemente el reactivo de reconocimiento; o sensores ópticos irreversibles, cuando la interacción es irreversible y, por ello, se produce consumo del reactivo de reconocimiento. Estos últimos se dividen, a su vez, en regenerables o reutilizables, siempre y cuando puedan volver a ser utilizados tras un tratamiento con un reactivo determinado y no regenerables o desechables cuando resultan irrecuperables al realizar la medida y por tanto son de un solo uso.
- **Según su forma externa**, podemos hablar de dos amplios grupos: tipo sonda (optrodos), que están constituidos por una o varias fibras ópticas y una fase sensora normalmente fijada al extremo del cable óptico por medio de una membrana; y sensores tipo célula de flujo (optosensores), donde el sólido ópticamente activo se encuentra empaquetado en una célula de flujo que puede estar situada en el paso óptico del instrumento o en el exterior del mismo y en este caso es preciso utilizar fibras ópticas que permitan el transporte de la luz.

---

22. D.S. Ballantine, D. Callahan, G.J. Maclay, J.R. Stetter. *Talanta*, 39 (1992) 1657.

La configuración tipo sonda permite su empleo tanto en discontinuo como en flujo, sin embargo los sensores tipo célula de flujo sólo se pueden emplear en sistemas de flujo.

El acoplamiento de estos sensores tipo célula de flujo a sistemas de análisis por inyección en flujo (híbrido conocido como "optosensor") ofrece importantes ventajas de gran interés analítico entre las que se pueden citar: facilidad para renovar reactivos en la superficie sensora, posibilidad de integrar en un sistema de flujo pretratamiento en línea de la muestra, empleo de reacciones no reversibles en la fase activa, etc..

## 5. SENSORES TIPO CÉLULA DE FLUJO (OPTOSENSORES)

Un sistema analítico convencional de flujo continuo comprende tres etapas: la transferencia de masa (analito) entre dos fases, las reacciones (bio)químicas y la detección continua en una celda de flujo convencional [23].

El dispositivo que realice simultáneamente la detección con la reacción y la separación en la celda de flujo puede considerarse formalmente como un "sensor", pues reúne sus cuatro características principales (responde directa, reversible, continua y rápidamente a variaciones en la concentración del analito de interés) y se denomina "optosensor".

Este término fue introducido por Ruzicka y Hansen [24] para definir un nuevo principio de detección en análisis por inyección en flujo basado en el cambio de las propiedades ópticas de una superficie activa situada en el paso de un flujo.

La realización simultánea de la etapa de retención del analito y del proceso de detección espectroscópica en un sistema de análisis por inyección en flujo (FIA) constituye una vía de amplias posibilidades para la superación de muchos inconvenientes de los sensores ópticos [25,26].

---

23. M. Valcárcel, M.D. Luque de Castro. "Flow Injection Analysis". Wiley. Nueva York, USA, 2<sup>nd</sup> Ed. (1988).

24. J. Ruzicka, E.H. Hansen. *Anal. Chim. Acta*, 173 (1985) 3.

25. J. Ruzicka, G.D. Christian. *Anal. Chim. Acta*, 234 (1990) 31.25

26. J. Ruzicka, G.D. Marshall. *Anal. Chim. Acta*, 237 (1990) 329.

### 5.1. Análisis por inyección en flujo

Una metodología con las características de las técnicas FIA ofrece numerosas ventajas analíticas, entre las que se puede citar<sup>27</sup>: fundamento sencillo, equipamiento de bajo costo, bajo consumo de muestra y reactivos, elevada frecuencia de muestreo y fácil automatización. El FIA se engloba dentro de los métodos cinéticos y por tanto presenta en general una mayor selectividad que las correspondientes técnicas manuales. La exactitud y la precisión son realmente sorprendentes a pesar de que se basa en medidas de sistemas en estado transitorio.

La técnica FIA consiste básicamente en una inyección o inserción directa de la muestra líquida en un flujo continuo y no segmentado. De este modo, la muestra es arrastrada a través del flujo del sistema, pudiendo tener lugar uno o varios procesos adicionales entre ésta y el fluido portador. La sustancia a analizar se hace pasar por un detector apropiado que permite realizar medidas en continuo, originando una señal transitoria que está relacionada con la concentración de la especie de interés. El grado de dispersión de la muestra es altamente reproducible estando controlado por factores tales como la velocidad de flujo, el diseño geométrico del sistema y la longitud y diámetro de los tubos.

Las condiciones experimentales de trabajo habitual en FIA origina una mezcla incompleta del "bolo" de muestra inyectado en el flujo portador. De ahí, que una característica fundamental de esta metodología sea que el tiempo de operación ha de ser muy reproducible por efectuarse las medidas en condiciones de no equilibrio.

El tratamiento profundo de esta temática está ampliamente documentado en la bibliografía [23,27].

Finalmente, es de recalcar, la casi universalidad del FIA dado que su carácter modular lo hace sencillo de adaptar a cualquier necesidad analítica concreta. Sin lugar a dudas, el gran desarrollo actual de esta técnica se debe a su excepcional versatilidad. Este tipo de sistema en flujo puede ser utilizado con éxito en el análisis de rutina de un laboratorio.

---

27. M. Valcárcel, M.D. Luque de Castro. "Análisis por Inyección en Flujo". Ed. Univ. Córdoba/Monte de Piedad y Caja de Ahorros de Córdoba, (1984).

## 5.2. Acoplamiento de las fases sensoras a sistemas en flujo

Una de las características más relevante de los sensores tipo "célula de flujo" es su total compatibilidad con sistemas FIA. Por lo que a las características intrínsecas de los sistemas de inyección de flujo (automatización, flexibilidad, acondicionamiento y calibrados de muestra sencillos, desarrollo previo de reacciones químicas, etc.) se suman las de la utilización de fases sensoras (selectividad, preconcentración del analito, etc.) y hace posible su aplicación a muestras reales de todo tipo [8].

El acoplamiento con sistemas FIA pueden ofrecer soluciones a algunos de los problemas de los sensores ópticos, tales como largos tiempos de respuesta marcados por lentos procesos de difusión del analito desde la muestra a la fase activa, que limitan la utilidad práctica de éstos. Así, los tiempos de respuesta pueden ser reducidos al incorporar un pequeño bolo de muestra en el flujo portador que va a interactuar con la fase sensora de forma transiente. De igual manera, el tiempo de exposición se puede utilizar para realizar una discriminación cinética entre el analito y otras sustancias interferentes cuando éstas posean una velocidad de difusión diferente.

El empleo de fases sólidas para la detección en un sistema FIA ofrece, en principio, dos ventajas inherentes (propias del equilibrio heterogéneo líquido-sólido) cuando se compara con la utilización más convencional de fases líquidas que contienen el reactivo [28,29]:

1. La transferencia de masa radial en un reactor empaquetado es mucho más intensa que en un reactor hueco y, por tanto, la contribución de la difusión radial en el equilibrio sólido-líquido dentro del bloque es más eficaz.
2. El equilibrio líquido-sólido también tiene lugar en aquellos elementos de la muestra donde no hay dispersión, debido a que el mismo procede exclusivamente en la interfase sólido/líquido.

Alguna de las ventajas de tipo práctico, que se pueden conseguir al introducir interfases sólidas en sistemas de análisis en flujo, son las siguientes [8]:

1. Aumento de la sensibilidad utilizando fases sólidas, ya que la sensibilidad de los sistemas de análisis en flujo puede incrementarse por:

---

28. J. Ruzicka, E.H. Hansen. *Anal. Chim. Acta*, 214 (1988) 1.

29. M. Valcárcel, M.D. Luque de Castro. "Non-Chromatographic Continuous Separation Techniques". Royal Society of Chemistry. Inglaterra (1991).

- *Preconcentración en línea o "in situ"*: es uno de los métodos más eficaces para aumentar la sensibilidad. Físicamente, la preconcentración puede conseguirse acoplado en el sistema en flujo una unidad adecuada de separación como puede ser una microcolumna con un relleno adecuado. Si la fase sólida se dispone en la célula de flujo de un detector óptico no destructivo se consigue un sistema particular de preconcentración "in situ", que integra los procesos de retención y detección [8,30].
  - *Disminución de la dilución*: históricamente, los primeros reactores sólidos utilizados en FIA fueron de naturaleza redox y de esta forma, se evita la dilución correspondiente al empleo de un reductor adicional [31].
  - *Aumento de la estabilidad de los reactivos*: las enzimas inmovilizadas sobre soportes adecuados suelen ser más estables que en disolución y se han utilizado ampliamente en sistemas de análisis en flujo tanto para determinar substratos [32,33] como actividades enzimáticas [34].
2. Aumento de la selectividad utilizando fases sólidas. Los métodos FIA son más selectivos que sus homólogos manuales puesto que al realizar las medidas sin llegar a condiciones de equilibrio se eliminan interferencias de especies que reaccionen más lentamente que el analito [35]. La selectividad de los sistemas FIA puede mejorarse substancialmente empleando fases sólidas como medio de eliminar interferencias [36], mediante medidas de velocidad de reacción basadas en enzimas inmovilizadas [37] y acoplado sistemas de flujo a técnicas de separación más poderosas como el HPLC [38].

- 
30. M.D. Luque de Castro, M. Varcárcel. *Trends Anal. Chem.*, 10 (1991) 114.  
 31. J.F. Van Staden, A.E. Joubert, H.R. Vliet. *Fresenius Z. Anal. Chem.*, 325 (1986) 150.  
 32. J. Ruz, F. Lázaro, M.D. Luque de Castro. *J. Autom. Chem.*, 10 (1988) 15.  
 33. E.H. Hansen. *Anal. Chim. Acta*, 216 (1989) 257.  
 34. J.M. Fernández Romero, M.D. Luque de Castro. *Chim. Oggi.*, Noviembre (1988) 17.  
 35. M. Valcárcel, A. Ríos. *Analisis*, 18 (1990) 469.  
 36. S.R. Bysouth, J.F. Tyson, P.B. Stockwell. *Analyst*, 115 (1990) 571.  
 37. A. Ríos, M.D. Luque de Castro, M. Valcárcel. *Anal. Chem.*, 60 (1988) 1540.  
 38. J. Rizucka, G.D. Christian. *Anal. Chim. Acta*, 234 (1990) 31.

### 5.3. Clasificación de los sensores de flujo

De acuerdo con la localización de la zona de reconocimiento, donde tiene lugar la reacción, separación y detección, podemos clasificar los sensores en flujo en dos tipos básicos [13] (ver Figura 3):

1. **Optosensor convencional**, donde la zona de reconocimiento está incorporada dentro de una célula de flujo especial que se encuentra en el compartimento de muestra del instrumento.
2. **Optosensores de fibra óptica**, donde la zona de reconocimiento está incorporada dentro de una célula de flujo que se sitúa fuera del instrumento.

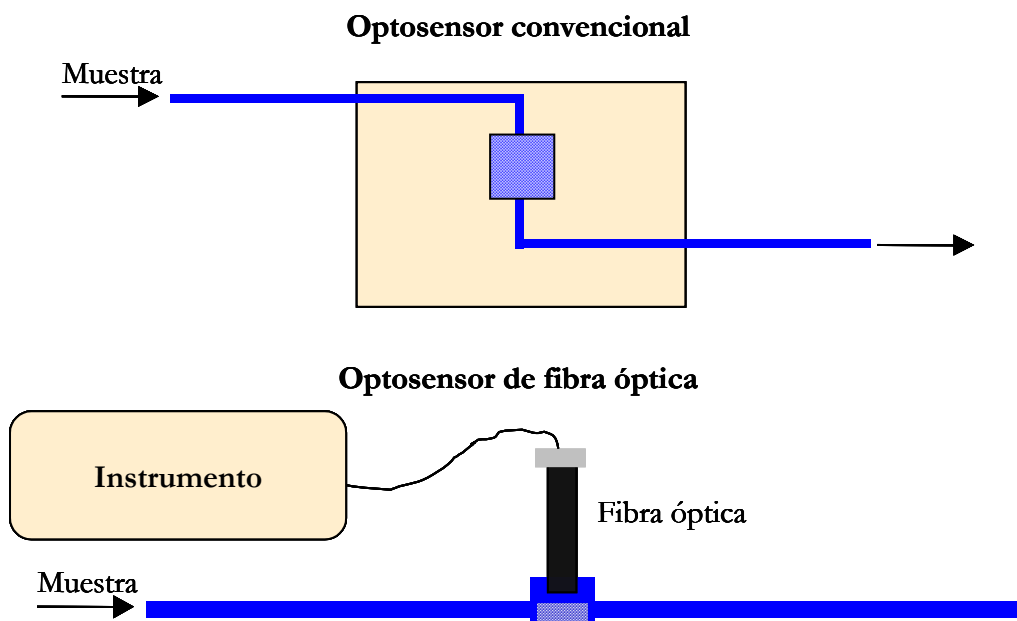


Figura 3. Tipos básicos de optosensores de flujo.



#### 5.4. Características que deben cumplir los sensores de flujo

Los optosensores deben reunir una serie de características necesarias para un adecuado funcionamiento:

1. El sistema debe ser reversible (o fácilmente regenerable si es irreversible)
2. La cinética de los procesos que tengan lugar debe ser rápida.
3. La fase de reconocimiento químico debe estar inmovilizada eficientemente para que pueda ser usada en un gran número de determinaciones.
4. La zona sensible y el sistema de detección deben ser totalmente compatibles, lo cual no siempre es posible.

Como ya se ha comentado, uno de los rasgos más sobresalientes de los optosensores es su total compatibilidad con sistemas de inyección en flujo. Esto hace posible mejorar las características intrínsecas de los mismos (automatización, flexibilidad, acondicionamiento, calibrados de muestra sencillos, etc.) así como ampliar su aplicación a muestras reales de prácticamente todo tipo. Posiblemente, uno de los grandes aportes de estos sistemas es su facilidad para acoplar un sistema de regeneración de la fase sensora en el caso de irreversibilidad en la reacción de reconocimiento, de una forma simple y automática [8].

#### 5.5. Ventajas e inconvenientes de los sensores de flujo

Como conclusión, podemos señalar que los optosensores presentan una serie de ventajas como son:

- Una mayor sensibilidad al reducirse la dispersión de la muestra inyectada.
- Una mejora indirecta de la selectividad eliminando especies interferentes y señales parásitas a través de medidas cinéticas.
- Una sencilla regeneración de la fase sensora, de forma simple y automática, en el caso de irreversibilidad de la reacción de reconocimiento.
- Una mejora de las características intrínsecas de los sensores derivadas del empleo de la técnica FIA como son automatización, flexibilidad, acondicionamiento y desarrollo de métodos sencillos, desarrollo previo de reacciones químicas, etc..

Por el contrario, las mayores desventajas de los sensores en flujo son:

- La necesidad de un sistema para impulsar la muestra.
- La dificultad del análisis remoto a largas distancias y en micromuestras, que se reduce drásticamente en el caso de los optosensores de fibra óptica.
- La necesidad de que la zona sensible y el detector sean compatibles.
- La posibilidad la existencia de problemas, si las cinéticas derivadas de los pasos de separación y reacción son demasiado lentas.

## 6. OPTOSENSORES ÓPTICOS FOSFORESCENTES A TEMPERATURA AMBIENTE

Como era de esperar, de las dos técnicas analíticas derivadas del fenómeno fotoluminiscente, la fluorimetría y la fosforimetría, la fluorimetría ha sido tradicionalmente la técnica empleada en el desarrollo de sensores ópticos luminiscentes. Sin embargo, la fosforescencia a temperatura ambiente ("room temperature phosphorescence", RTP) presenta diversas ventajas frente a la fluorescencia entre las que cabe citar:

- a. Mayores longitudes de onda de emisión y mayor separación entre las longitudes de onda de emisión y excitación (lo que simplifica su discriminación).
- b. Largos tiempos de vida del estado triplete excitado (lo que hace posible el diseño de instrumentación sencilla para la medida de tiempos de vida).
- c. Señales analíticas con bajas señales de fondo (puesto que la emisión fosforescente se mide una vez que toda señal de fondo luminiscente ha cesado) dando lugar a mejores relaciones señal/fondo y por tanto a menores límites de detección.
- d. Finalmente, en principio el empleo de la RTP daría lugar a sistemas mas selectivos, debido a que la fosforescencia es un fenómeno mucho menos común que la fluorescencia.

La fosforimetría a temperatura ambiente sobre soportes sólidos es hoy una técnica que ofrece una gran sensibilidad, amplios intervalos lineales de concentración y una extraordinaria selectividad. La selectividad es una característica inherente a la fosforimetría, ya que la emisión aparece en regiones espectrales poco pobladas y son

pocas las moléculas que emiten fosforescencia en comparación con la fluorescencia. Además, dado que las transiciones singlete-triplete están prohibidas, el tiempo de vida del estado triplete es relativamente largo y por ello es posible hacer una discriminación temporal de la emisión, lo que permite incrementar aún más la selectividad de la técnica. Estas excepcionales características analíticas, en términos de sensibilidad y selectividad, junto con el bajo costo de la instrumentación necesaria, hacen de la fosforescencia una técnica especialmente atractiva para el desarrollo de sensores ópticos.

De ahí que durante los últimos años se ha venido manifestando un creciente interés en el desarrollo de sensores químicos y bioquímicos fosforescentes a temperatura ambiente. La elevada sensibilidad de la fosforescencia permite la miniaturización de las fases sensoras que pueden ser fácilmente adaptadas a fibras ópticas para llevar a cabo el desarrollo de sensores que permiten el análisis a largas distancias o en ambientes peligrosos. Se han descrito ya varios ejemplos de sensores fosforescentes en los últimos años tanto para el análisis de iones como de gases (p. ej.  $O_2$ ,  $H_2O$ , etc.) y este interés se está desplazando rápidamente hacia el campo de los biosensores (glucosa, alcoholes, etc.), ofreciendo una interesante alternativa para llevar a cabo el desarrollo de sensores "in vivo" (considerando que el problema de la biocompatibilidad de los materiales usados parece estar continuamente mejorando).

Sin embargo, y a pesar de las ventajas que estos ofrecen, son pocos los sensores ópticos fosforescentes a temperatura ambiente desarrollados hasta la fecha. Este hecho deriva fundamentalmente del reducido número de moléculas disponibles capaces de desarrollar fosforescencia a temperatura ambiente.

A la hora de desarrollar un optosensor basado en medidas de fosforescencia a temperatura ambiente es importante tener en cuenta una serie de parámetros fundamentales que de una manera u otra van a determinar sus propiedades analíticas (sensibilidad, selectividad y tiempo de respuesta).

Sin lugar a dudas, el elemento más característico y crítico en el diseño de un sensor de RTP es la constitución y configuración de la "fase activa" al analito, esa fase sólida capaz de reconocer selectivamente a la especie buscada. Es precisa una selección adecuada de la molécula fosforófora indicadora y/o del soporte sólido,

considerando que para observar fosforescencia a temperatura ambiente analíticamente útil se necesitan [39-41]:

1. Rigidez del sistema: es necesario asegurar un elevado grado de rigidez para el fosforóforo, que asegure la protección del triplete excitado. La inmovilización transitoria sobre un soporte sólido constituye un camino para asegurar la rigidez.
2. La población del estado triplete excitado debe asegurarse, por ejemplo, a través del empleo de átomos o estructuras pesadas, bien intramoleculares (sustituyentes como -I, -Br, etc.) o extramoleculares ( $Tl^+$ ,  $Ag^+$ ,  $Br-CH_2-CH_2-Br$ , etc.), que al favorecer el cruce intersistemas elevan la constante de velocidad radiacional de la fosforescencia dando lugar a señales de emisión fosforescente intensas [42].
3. El oxígeno molecular en estado fundamental está en estado triplete [43] y es por ello un desactivante muy eficaz de tripletes excitados del analito luminiscente. Por consiguiente, cuando una fase sensora es desarrollada para la determinación de un analito distinto del oxígeno es preciso asegurar su total eliminación. La eliminación del oxígeno disuelto en medios acuosos puede llevarse a cabo mediante el burbujeo con un gas inerte como Ar o  $N_2$  [44] o empleando un desoxigenante químico como el  $Na_2SO_3$  [45].

Se han propuesto una gran variedad de fases sensoras como soportes en RTP para una amplia variedad de compuestos biológicos, drogas, pesticidas y contaminantes orgánicos. Entre los soportes más empleados cabe citar:

#### a.- Resinas comerciales:

Se estudiaron quince resinas comerciales como fases sensoras (véase la Figura A-1):

- *Polímeros de intercambio iónico o resinas de tipo iónico*

---

39. R.J.Hurtubise(1990) Phosphorimetry: Theory, Instrumentation and Applications. VCH, Verlagsgesellschaft.

40. T. Vo-Dinh. "Room Temperature Phosphorimetry for Chemical Analysis". Wiley, New York (1984).

41. S. Schulman. "Fluorescence and Phosphorescence Spectroscopy: Physicochemical Principles and Practice". Pergamon Press, New York (1977).

42. P.G. Seybold, W. White. *Anal. Chem.*, 47 (1975) 1199.

43. C. Parker. "Photoluminescence of Solutions". Elsevier, Amsterdam, (1968).

44. L.J. Cline Love, M.L. Grayeski, J. Noroski, R. Weinberg. *Anal. Chim. Acta*, 170 (1985) 3.

45. M.E. Díaz García, A. Sanz-Medel. *Anal. Chem.*, 58 (1986) 1436.

a) Resinas de poliestireno-divinilbenceno (PS-DVB):

1) Catiónicas: **Dowex 50w** (50wx2, 50wx4, 50wx8) (Ver Figura 4)

En éstas, el grupo ionogénico que las convierte en catiónicas es el sulfonato ( $\text{SO}_3^-$ ).

2) Aniónicas: **Dowex 1** (1x2, 1x4, 1x8) (Ver Figura 4)

El grupo iónico en este caso es  $\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3\text{Cl}^-$ .

La nomenclatura  $xn$  a continuación del nombre comercial de la resina, siendo  $n$  un número que varía entre 1 y 32, indica el porcentaje en peso de DVB añadido a la mezcla inicial de copolimerización y es un índice del grado de entrecruzamiento entre los monómeros de estireno y DVB.

b) Resinas con matriz de dextrano (polímero de glucosa) entrecruzado con glicerina, **Sephadex**:

1) Catiónicas:

**SP-Sephadex**, que contiene grupos sulfopropilo ( $\text{O}(\text{CH}_2)_3\text{SO}_3-\text{H}^+$ ).

**CM-Sephadex**, con grupos carboximetilo ( $\text{OCH}_2\text{COOH}$ ).

2) Aniónicas:

**QAE-Sephadex**, conteniendo grupos dietil(2-hidroxipropil)aminoetilo.

**DEAE-Sephadex**, con grupos dietilaminoetilo.

- **Polímeros no-iónicos o resinas neutras**

a) **Gel de Silica** (Davisil, Merck), con matrices de sílice.

b) **Amberlita XAD** (2, 4 y 7) (Ver Figura 4).

Aunque las tres tengan similar nombre comercial hay gran diferencia entre ellas. Las XAD 2 y 4 están formadas bajo una matriz de estireno y DVB, pero con distinto grado de entrecruzamiento; mientras que la XAD 7 posee una matriz de polimetacrilato.

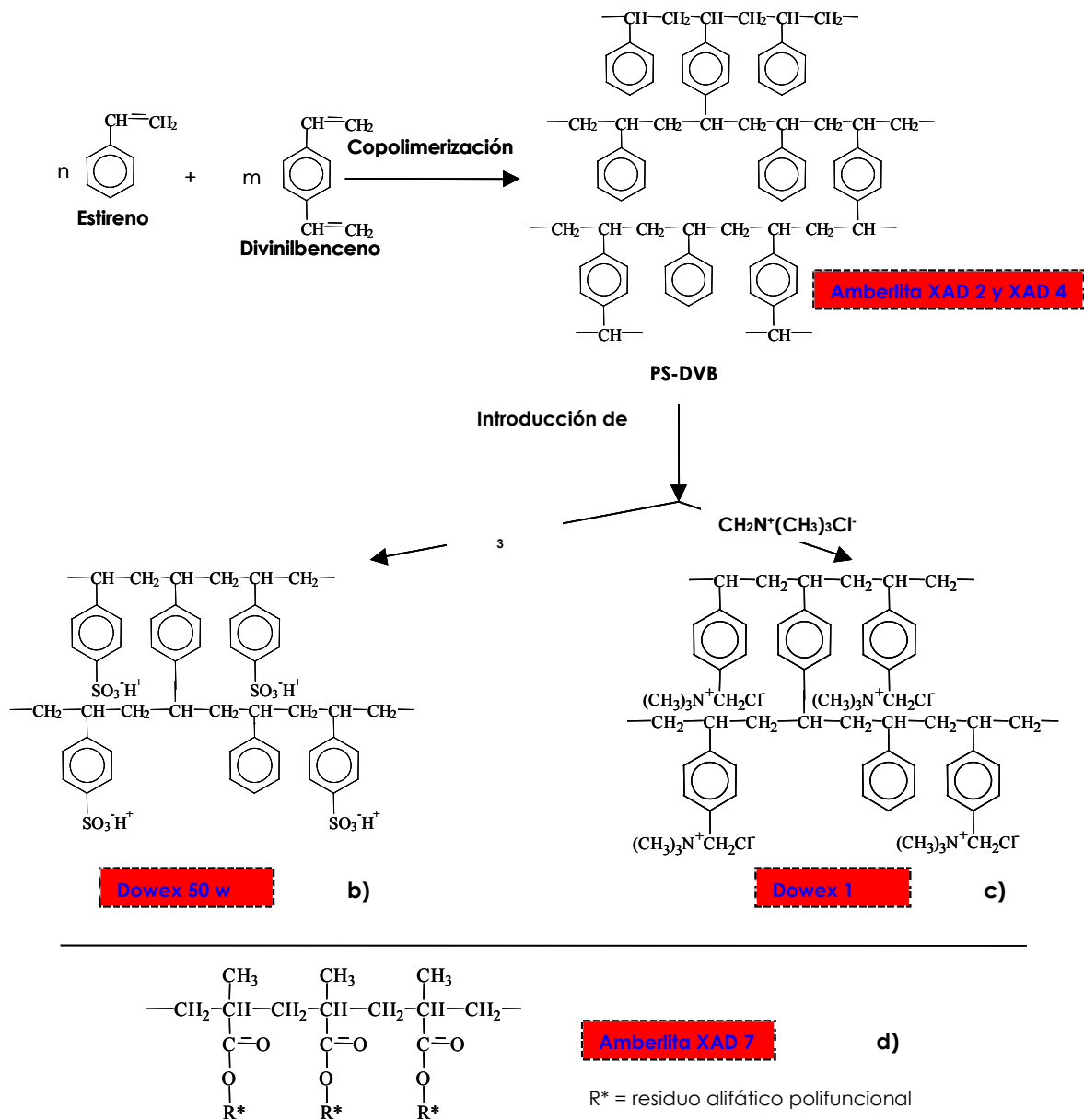


Figura 4. Estructura de las resinas XAD y Dowex.

## b.- Tecnología sol-gel

El proceso de formación de sol-gel es un método de producción de materiales cerámicos que fue descrito por primera vez hace 150 años [1]. Hoy día su utilidad analítica se ha visto revitalizada como consecuencia de su capacidad, una vez adaptándolo convenientemente, para incorporar en los poros del material cerámico sustancias termo y fotosensibles tales como moléculas orgánicas y proteínas activas [43-44].

La tecnología sol-gel además de proporcionar materiales de gran estabilidad, transparentes y altamente porosos, ofrece la posibilidad de llevar a cabo una multitud de modificaciones posibles (a través de variaciones en la composición de la mezcla de precursores, pH, temperatura, etc.). Mediante estas modificaciones pueden ser especialmente útiles para servir como soporte de moléculas en el desarrollo de sensores químicos. La matriz porosa debe retener eficazmente las moléculas inmovilizadas, pero al mismo tiempo deben de ofrecer una máxima accesibilidad para que los analitos puedan interactuar con la molécula inmovilizada. El proceso sol-gel permite, además, llevar a cabo un adecuado ajuste de las propiedades de difusión del analito en el sol-gel que minimice las tradicionales limitaciones al transporte de masa, presentes en los sensores clásicos, a través de modificadores estructurales.

La formación de matrices inorgánicas mediante la tecnología sol-gel tiene lugar a través de la hidrólisis (en presencia de agua) y condensación de distintos precursores (principalmente ortosilicatos tetrasustituídos) para producir una suspensión coloidal (sol). Posteriormente tiene lugar una gelación por aglomeración de los monómeros coloidales formados con un aumento de la viscosidad del sol y originándose una estructura porosa de óxido del metal denominada gel. Las propiedades del gel continúan cambiando mientras queden disolventes y agua en la estructura porosa debido a interacciones de policondensación que tras una etapa de secado y encogimiento de lugar el xerogel poroso (gel seco al haberse evaporado el agua y los disolventes orgánicos). Se usa un medio ácido o básico para catalizar la reacción de hidrólisis y controlar la superficie específica y distribución de los poros en el xerogel.

Las matrices sol-gel proporcionan una serie de ventajas e inconvenientes frente a los soportes habituales:

- Son compatibles con numerosos compuestos orgánicos e inorgánicos

- Rigidez física y resistencia a la deformación mecánica.
- No se aprecian deformaciones ni lavados de la fase sensora al ser sumergidos en medios orgánicos o disoluciones acuosas.
- Es inerte químicamente.
- Alta estabilidad térmica, fotoquímica y biodegradabilidad.
- Excelente transparencia óptica.

También presenta una serie de desventajas que disminuyen su aplicabilidad en la tecnología de sensores:

- Son frágiles.
- Sufren hidrólisis a alto pH.
- Tienen gran capacidad de intercambio catiónico debido a los grupos silanoles superficiales.
- Requiere procesos relativamente complejos para la inmovilización química de reactivos orgánicos.
- Largos tiempos de respuesta en medios acuosos especialmente cuando la molécula indicadora es atrapada en la estructura inorgánica.
- Pueden haber problemas de lavado de la molécula inmovilizada.

### **c.- Tecnología de impresión molecular**

Esta metodología es explicada a continuación con detalle.



## 7. LA TECNOLOGÍA DE IMPRESIÓN MOLECULAR EN EL DESARROLLO DE FASES SENSORAS

### 7.1. Generalidades

Aunque el interés en la técnica de impresión molecular es relativamente nuevo, el concepto en sí mismo tiene una larga historia.

Alrededor 1930, el químico soviético Polyakov era uno de muchos científicos que estuvieron implicados en investigaciones con la sílica para su uso en cromatografía. Polyakov preparó su sílica por la acidificación de las soluciones del silicato de sodio que, después de la sequedad del polímero, se obtenía una matriz rígida. Con el objetivo de aumentar la capacidad de enlace de la sílica, estudio los efectos sobre la estructura de la presencia de benceno, tolueno o xileno durante la sequedad. Después de 20-30 días de sequedad a temperatura ambiente los polímeros, fueron lavados. En un artículo publicado en 1931 [46], fue demostrado que bajo ciertas condiciones (cuando  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$  fue utilizada como el agente de activación), el grado de la re-adsorción era diferente que en otros casos [47,48]. Investigaciones más detalladas de este fenómeno, sugieren que este fenómeno era una consecuencia de la naturaleza química del compuesto añadido. Sin embargo, estos estudios aparecen haber sido en gran parte inadvertidos por la comunidad científica.

Años más tarde, Pauling y su discípulo Dickey, utilizaron un método muy similar al de Polyakov, la principal diferencia es que estos adicionan una molécula molde durante el proceso, al precipitar la gel de sílice en presencia de colorantes, tras secar y extraerle el colorante, el gel de sílice guardaba cierto efecto memoria [ 49].

Fue en 1972 cuando se marca el comienzo de la impresión molecular como se conoce hoy día, cuando los laboratorios de Wulff [50] y Klotz [51] divulgaron independientemente la preparación de polímeros orgánicos con predeterminadas selectividad con algunos ligandos. Las moléculas utilizadas como plantilla, o sus derivados, que estaban presentes durante la polimerización fueron reconocidos por el polímero molecular impreso (MIPs). Los trabajos pioneros de los grupos de Wulff,

---

46. M. Polyakov. *Zhur. Fiz. Khim.*, 2 (1931) 799.

47. M. Polyakov. *Zhur. Fiz. Khim.*, 4 (1933) 454.

48. M. Polyakov, L. Kuleshima, I. Neimark. *Zhur. Fiz. Khim.*, 10 (1937) 100.

49. F. Dickey. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 35 (1949) 227.

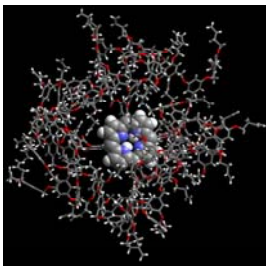
50. G. Wulff, A. Sarhan. *Angew Chem.*, 84 (1972) 364.

51. T. Takagishi, I. Klotz. *Biopolymers*, 11 (1972) 483.

Mosbach, Shea, y otros, pusieron los fundamentos de la técnica de impresión molecular actual. En los años 80 Takagishi realizó numerosos estudios similares [ 52-55].

Actualmente la impresión molecular es una técnica que va en aumento. Durante los últimos cinco años se han publicado unos 250-300 artículos. El aumento inicial durante los años 90 implicó principalmente los sistemas relacionados con el investigaciones relacionadas con el grupo de Mosbach, la fabricación de polímeros impresos por vía no-covalente, así como el aumento de los campos de aplicación, ha sido probablemente un paso muy significativo en el avance del interés de esta técnica. El trabajo publicó por Vlatakis y col. en 1993 [56], fue el primer trabajo que demostraba que un sistema de MIPs puede rivalizar en selectividad con un sistema de anticuerpos. Este trabajo recibió mucha atención y representa en gran medida el trabajo más citado del área. Muchos logros notables se han divulgado desde entonces que han contribuido a hacer de la tecnología de impresión molecular una técnica muy utilizada.

Hoy día la impresión molecular es una nueva técnica y una herramienta prometedora para el desarrollo de un nuevo concepto de sensores químicos. En general se puede describir como una manera de hacer "cerraduras artificiales" para "llaves moleculares" mediante un sencillo procedimiento:



1. La especie a determinar se mezcla con monómeros.
2. Los monómeros y la "molécula molde" se unen entre sí.
3. La adición de un entrecruzador fija la estructura del aducto en una red tridimensional.
4. La eliminación de la molécula molde da lugar a la obtención de un material con "memoria selectiva" para dicha molécula.

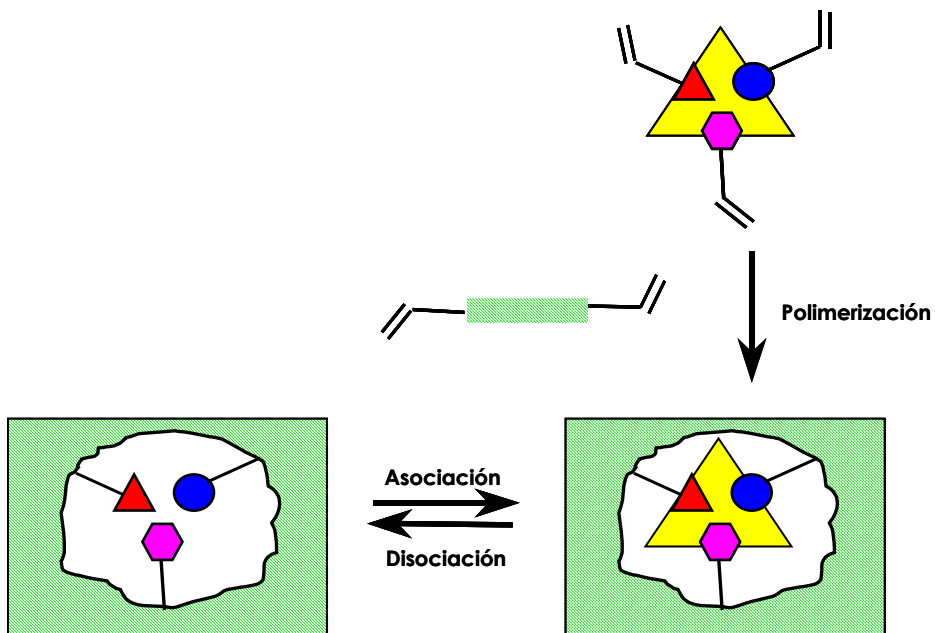
## 7.2. Síntesis de polímeros impresos

Aunque son diversas las vías para la preparación de los polímeros impresos, son dos las más utilizadas: covalente y no-covalente.

- 
52. T. Takagishi, A. Hayashi, N. Kuroki. *J. Polym. Sci. Polym. Chem. Ed.*, 20 (1982) 1533.
  53. T. Takagishi. *J. Polym. Sci. Polym. Chem. Ed.*, 22 (1984) 4035.
  54. T. Takagishi. *J. Polym. Sci. Polym. Lett. Ed.*, 23 (1985) 545.
  55. T. Takagishi, M. Okada. *Chem. Express*, 1 (1986) 359.
  56. G. Vlatakis. *Nature*, 361 (1993) 645.

La Vía covalente se basa en la co-polimerización inicial de monómeros funcionales, generalmente de tipo acrílico o vinílico, con un derivado polimerizable de la molécula molde. Esto supone derivatizar previamente dicha molécula. Por adición de un monómero entrecruzador y en presencia de un agente iniciador de la polimerización se fija la estructura del aducto en una red tridimensional. La posterior liberación de la molécula molde se lleva a cabo por métodos químicos, generalmente hidrólisis que rompa los enlaces covalentes creados.

Las ventajas más importantes de esta vía son la creación de sitios de unión muy específicos y la no influencia del disolvente empleado en la síntesis. Por el contrario tienen el inconveniente de ser lentos, no reversibles para el proceso de reconocimiento, por lo que dichos polímeros no resultan adecuados para su utilización en sistemas donde se requiera una respuesta rápida y además las capacidad de reocupación de éstos oscila entre 10-15%; este hecho es atribuido a que los sitios de unión se encuentran fundamentalmente en zonas internas del mismo.



**Figura 5. Esquema ilustrativo de la vía covalente.**

En la vía no-covalente la molécula molde interacciona con los monómeros funcionales formando un agregado en el que predominan interacciones de tipo

enlace de hidrógeno, interacciones electroestáticas, enlaces de Van der Waals, etc. Los monómeros funcionales y de entrecruzamiento suelen ser de la misma naturaleza que los utilizados en la vía covalente. El proceso comienza con un ordenamiento de los monómeros funcionales alrededor de la molécula molde, en un disolvente adecuado, para producir un sistema pre-organizado cuya estructura se fija durante el entrecruzamiento, análogo al caso anterior. La extracción de la molécula no requiere ahora roturas de enlaces covalentes y puede llevarse a cabo por un proceso de extracción suave con un disolvente de características adecuadas.

Los inconvenientes de este tipo de polímeros son que se crean huecos menos específicos y que el disolvente compite con los monómeros funcionales en la interacción con la molécula molde. Sin embargo la capacidad de recuperación de éstos oscila 80-90%; en este caso los puntos de unión se encuentran en zonas más accesibles.

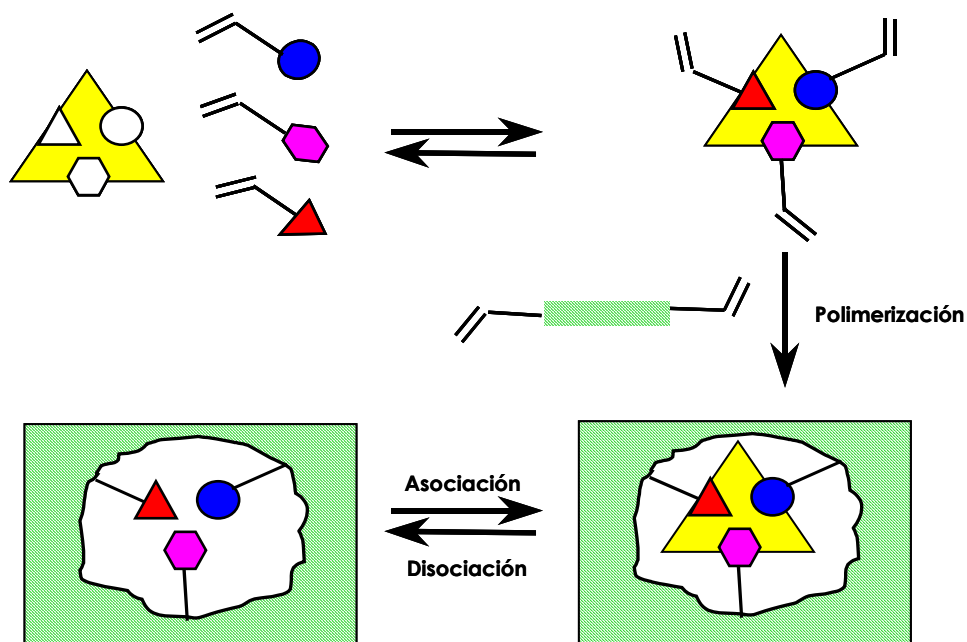


Figura 6. Esquema ilustrativo de la vía no covalente.

### 7.3. Ventajas de la impresión molecular

Las ventajas de este tipo de materiales son principalmente:

1. Selectividad y sensibilidad más alta que los soportes habituales (resinas comerciales).
2. Fáciles de preparar y baratos en general.
3. Pueden ser preparados para prácticamente todo tipo de moléculas.
4. Pueden ser almacenados en atmósfera seca a temperatura ambiente durante varios años.
5. Se puede trabajar con disolventes orgánicos.
6. Pueden ser reutilizados muchas veces.
7. Poseen una alta estabilidad a todo tipo de pHs, tanto ácidos como básicos.
8. Presentan elevada estabilidad mecánica, térmica y química debido a su naturaleza fuertemente entrecruzada, por lo que son muy robustos.
9. Los polímeros impresos son compatibles con la micro-fabricación.



## **CAPÍTULO B.1**

### **Desarrollo de un optosensor fosforescente para la determinación de naptalan y su metabolito la 1-naftilamina**

El trabajo derivado del presente Capítulo ha sido publicado en la revista "Analytica Chimica Acta 522 (2004) 19" (ver ANEXO VI).





## CAPÍTULO B.1

### DESARROLLO DE UN OPTOSENSOR FOSFORESCENTE PARA LA DETERMINACIÓN DE NAPTALAN Y SU METABOLITO LA 1-NAFTILAMINA

<b>1. GENERALIDADES DEL NAPTALAN .....</b>	<b>251</b>
1.1. Nomenclatura y estructura molecular.....	251
1.2. Propiedades y uso.....	251
1.3. Toxicidad .....	251
1.4. Aspectos generales de la química del naptalan.....	252
1.4. Métodos de determinación .....	252
<b>2. OBJETIVO .....</b>	<b>254</b>
<b>3. CARACTERÍSTICAS ESPECTROSCÓPICAS DEL NAPTALAN Y LA 1-NAFTILAMINA .....</b>	<b>254</b>
3.1. Selección de la fase sensora: tipo y tamaño de partícula.....	254
3.2. Características espectroscópicas en fase sólida .....	256
3.3. Diseño del sistema de flujo .....	257
3.4. Elección del sistema de regeneración.....	258
<b>4. SELECCIÓN DE LOS PARÁMETROS INSTRUMENTALES DEL NAPTALAN Y LA 1-NAFTILAMINA .....</b>	<b>259</b>
4.1. Voltaje del detector .....	259
4.2. Tiempo de demora e integración .....	260
4.3. Ancho de rendijas.....	262
<b>5. SELECCIÓN DE VARIABLES EXPERIMENTALES DEL NAPTALAN Y LA 1-NAFTILAMINA .....</b>	<b>263</b>
5.1. Tipo y concentración de átomo pesado .....	263
5.2. Concentración de sulfito sódico .....	265
5.3. Influencia del pH .....	265
<b>6. VARIABLES DE FLUJO DEL NAPTALAN Y LA 1-NAFTILAMINA .....</b>	<b>266</b>
6.1. Velocidad de flujo.....	267
6.2. Volumen de muestra .....	267
<b>7. REOPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES PARA LA DETERMINACIÓN CONJUNTA DE NAPTALAN Y SU METABOLITO LA 1-NAFTILAMINA .....</b>	<b>268</b>
7.1. Resumen de las características de los optosensores propuestos .....	268
7.2. Selección del sistema de regeneración .....	269
7.3. Selección de las longitudes de onda de excitación y emisión .....	270
7.4. Estudio de la aditividad de las señales .....	273
<b>8. CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS DEL MÉTODO .....</b>	<b>274</b>
7.1. Procedimiento operatorio .....	274
7.2. Recta de calibrado .....	274
7.3. Parámetros de fiabilidad .....	276
<b>9. APLICACIONES DEL MÉTODO PROPUESTO AL ANÁLISIS DE AGUA.....</b>	<b>277</b>

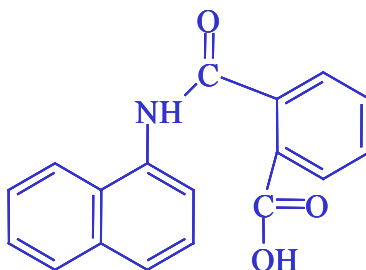


## 1. GENERALIDADES DEL NAPTALAN

### 1.1. Nomenclatura y estructura molecular

El naptalan (NAP) cuyo nombre IUPAC es ácido N-1-naftilalico, es un herbicida que controla las malas hiervas en preemergencia.

La formula molecular de este compuesto es  $C_{18}H_{13}NO_3$ , posee por lo tanto un peso molecular de 291.3 g/mol. En la Figura B.1-1 podemos observar la estructura de este compuesto.



**Figura B.1-1. Estructura molecular del naptalan.**

### 1.2. Propiedades y uso

Se trata de un sólido cristalino cuyo punto de fusión es de 185 °C, su solubilidad en agua es de 200 mg/L, en acetona de 5 mg/L, dimetilformamida 39 mg/L, mientras en benceno y hexano es prácticamente insoluble.

Se usa para el control de las malas hierbas en preemergencia y se aplica al suelo en pulverización a baja presión, diluido en la suficiente cantidad de agua para lograr un reparto homogéneo. La aplicación se efectúa inmediatamente después de la siembra, siendo muy conveniente dar un riego después del tratamiento.

### 1.3. Toxicidad

Se trata de un compuesto tóxico, presenta una dosis oral media ( $LD_{50}$ ) en ratas de 8200 mg de sustancia activa/Kg [1], pero el peligro viene también dado por la presencia del producto de degradación como es la 1-naftilamina (NNA), el cual es considerado mucho más tóxico que el propio naptalan, con un  $LD_{50}$  de 96 mg/Kg para ratas [2].

- 
1. The Pesticide Manual, a World Compendium, 8ª edn. The British Crop Protection Council, 1987.
  2. Base de datos en Dialog Corporation INC, Palo Alto, California, National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH).

#### 1.4. Aspectos generales de la química del naptalan

El conocimiento del comportamiento químico de la sustancia objeto de análisis es de gran importancia, sobre todo si se trata de compuestos de naturaleza orgánica relacionados con procesos biológicos que favorecen vías de degradación y que dan lugar a metabolitos de un comportamiento químico parecido aunque, a veces, de muy diferente actividad farmacológica o biológica.

Se puede dar la posible participación del analito en un proceso químico dinámico que lo transforme en otra especie. En este caso es importante conocer los aspectos cinéticos relacionados, para controlarlos y utilizarlos adecuadamente en beneficio de la fiabilidad del análisis.

Según los datos recogidos en bibliografía, para el NAP la principal vía de degradación [3] se puede observar en la Figura B.1-2, dando lugar a la 1-naftilamina como principal producto de degradación y que posee conocidos efectos carcinogénicos.

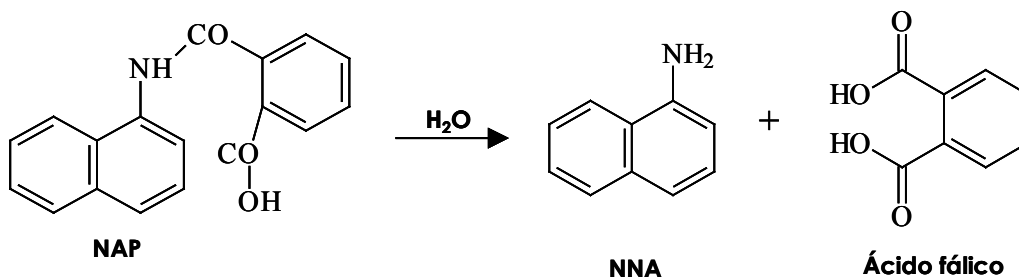


Figura B.1-2. Vía de degradación del naptalan.

#### 1.5. Métodos de determinación

Ya en 1987 Worobey y col. lo determinaron naptalan mediante cromatografía líquida con detección electroquímica [4].

En 1992 se desarrolla u método para el análisis del NAP en agua mediante cromatografía de gases con un proceso de extracción en fase sólida previa, obteniendo límites de detección del orden delos 3 ng/mL [5].

3. Z. Talebpour, A. Ghassempour, M. Shamsipur. *J. of Molecular Structure-theochem*, 629 (4) (2004) 43.
4. B.L. Worobey, J.B. Shields. *J. of the Associations of Official Anal. Chem.*, 70 (6) (1987) 1021.
5. M.F. Wolfe, J.N. Seiber. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 23 (1) (1992) 137.

También ha sido utilizado la cromatografía líquida de alta resolución para la determinación del NAP y NNA y otros pesticidas en agua [6], estudiando sus procesos de degradación, realizando una preconcentración con una C-18.

Díaz y col. desarrollaron un método espectrofotométrico para la determinación del pesticida y sus metabolitos en muestras de río con la ayuda de un método de calibración multivariante (PLS) [7].

Este mismo grupo llevó a cabo la determinación del naptalan mediante análisis de inyección en flujo con preconcentración en un C-18 y detección fluorimétrica basándose en la hidrólisis del naptalan [8], con unos límites de detección del orden de las ppb y aplicándolo con éxito a muestras de agua de río.

En 1999 se publicó la determinación del NAP y sus metabolitos utilizando la espectrometría de infrarrojos con transformada de Fourier en aguas naturales, usando una C-18 para preconcentrar y un modelo de calibración PLS, obteniendo unos límites de detección de 111, 72 y 90 ng/mL para el naptalan y sus metabolitos más importantes [9].

En el 2000 Gauch y col. desarrollaron un sensor de fibra óptica y fosforescencia a temperatura ambiente en superficie sólida para los pesticidas naptalan y warfarina. Como superficie sólida utilizaron el papel Whatman nº1, y llevaron a cabo el método con éxito a muestras ambientales reales [10].

La espectrometría de masas ha sido recientemente una de las técnicas utilizadas para la determinación del NAP y sus productos de degradación mediante su acoplamiento a cromatografía de gases, aplicándose con éxito a su determinación en aguas de río, con unos límites de detección del orden de las 250 ng/L [11].

- 
6. T.G. Díaz, M.I. Acedo, A.M. de la Peña, F. Salinas. *Analyst*, 119 (6) (1994) 1151.
  7. T.G. Díaz, M.I.A. Valenzuela, F. Salinas. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, 350 (12) (1994) 692.
  8. T.G. Díaz, M.I.A. Valenzuela, F. Salinas. *Anal. Chim. Acta*, 384 (2) (1999) 185.
  9. K. Cargos, S.H. Ahmadi, A. Ghassempour, M.R. Arshadi. *Analyst*, 124 (39) (1999) 367.
  10. Gauch, C. Fachinger, J. Suptil, C. Turnar, J. Rima, A. Charef, M. Martín Bouyer. *Anal. Letters*, 33 (4) (2000) 709.
  11. Ghassempour, M.R. Arshadi, F.S. Asghari. *Fresenius J. of Anal. Chemistry*, 369 (2) (2001) 176.

## 2. OBJETIVO

Revisando la bibliografía se puede comprobar que los métodos de determinación del NAP en medio acuoso en general determinan también sus metabolitos, y principalmente la NNA, por su conocido poder carcinogénico y ser el principal producto de degradación (hasta un 85% del NAP inicial al paso de 6 días) según estudios recientes [2]. Esto hace que si se pretende realizar un optosensor del NAP en disolución acuosa haya que tener en cuenta a su metabolito la NNA.

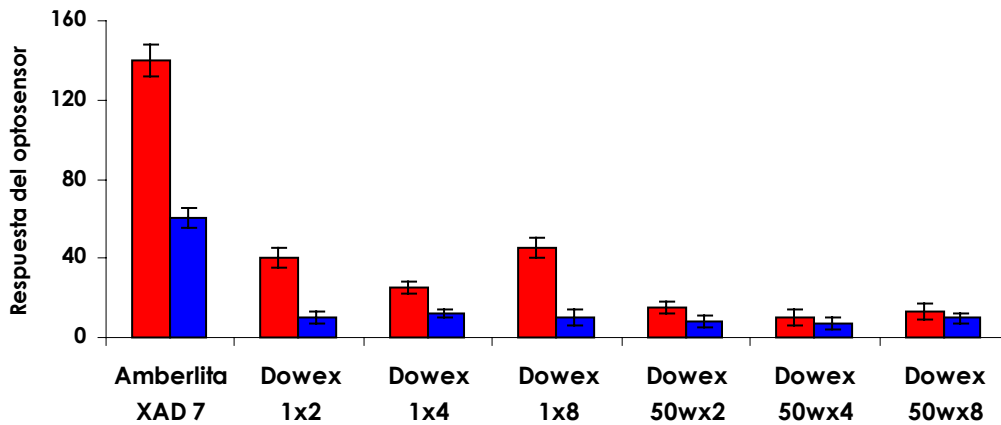
Es por este motivo que para la realización de este optosensor fosforescente, se vaya a realizar un estudio paralelo de las mejores condiciones tanto instrumentales como experimentales de forma individual tanto del NAP como de su metabolito la NNA, con el fin de obtener el mayor conocimiento del sistema de cara a obtener un optosensor fosforescente biparamétrico para la determinación simultánea de ambos compuestos.

## 3. CARACTERÍSTICAS ESPECTROSCÓPICAS

### 3.1. Selección de la fase sensora: tipo y tamaño de partícula

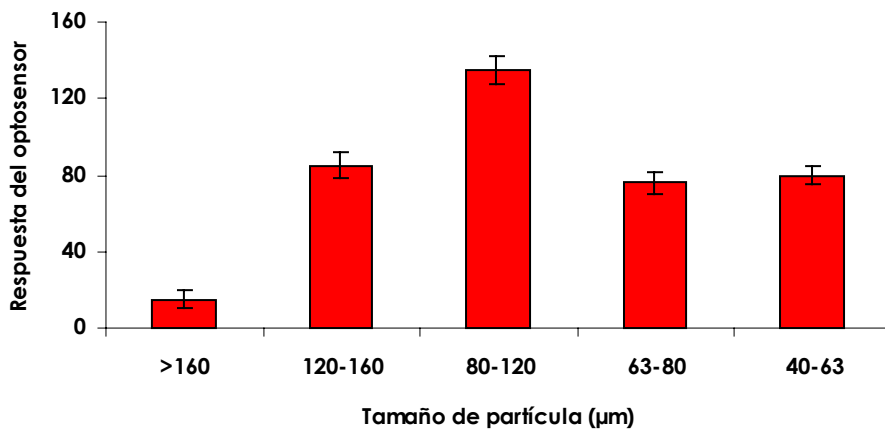
Para proceder a la selección de la fase sensora más adecuada, las quince resinas particuladas entre 80 y 120  $\mu\text{m}$  se empaquetaron en la célula de flujo y se evaluó la respuesta del optosensor obtenida por cada una de ellas así como el error de las medidas usando las siguientes condiciones instrumentales: voltaje del detector de 900 V, un ancho de rendija<sub>exc/em</sub> de 20/20 nm y valores de  $t_{d/g}$  de 0.12/5.00 ms, para una disolución de NAP y otra de NNA de 300 ng/mL conteniendo  $\text{TiNO}_3$  a una concentración de 0.2 M y  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  a una concentración de 0.015 M.

De las 15 resinas estudiadas, para ambos analitos, solo 7 presentaban señal analíticamente útil para la puesta a punto de un método. En la Figura B.1-3 se observan los resultados obtenidos para las siete resinas que ofrecían señal analíticamente útil, obteniéndose la mayor diferencia entre la señal y el ruido con la resina Amberlita XAD 7 tanto para el NAP como para la NNA.



**Figura B.1-3. Respuesta de los optosensores con las diferentes fases sensoras estudiadas para el NAP (■) y la NNA (■).**

El siguiente paso fue la optimización del tamaño de partícula de la resina Amberlita XAD 7. Se probaron los diferentes tamaños a las condiciones anteriormente citadas y los resultados para el caso del NAP se muestran en la Figura B.1-4.



**Figura B.1-4. Efecto del tamaño de partícula de la Amberlita XAD7 en la respuesta del optosensor para el caso del NAP.**

Se comprueba que a menor tamaño de partícula la sensibilidad es mayor hasta un valor de 80-120 µm, por encima de este tamaño la sensibilidad es menor, seguramente debido a problemas de sobrepresiones en el sistema; se eligió pues, como tamaño óptimo de partícula de la Amberlita XAD 7 de 80-120 µm para el NAP.

En el caso de la NNA el efecto en el tamaño de partícula de la Amberlita XAD 7 es análogo a lo comentado anteriormente.

Por lo tanto se eligió como resina y tamaño de partícula para ambos casos la Amberlita XAD 7 tamizada al tamaño de 80-120  $\mu\text{m}$ .

### 3.2. Características espectroscópicas en fase sólida

Con el objeto de determinar las longitudes de onda del NAP o NNA soportados en la fase sensora, que serán utilizadas en las posteriores optimizaciones de parámetros instrumentales y variables experimentales, se registraron los espectros de excitación y emisión a una disolución de 150 ng/mL de NAP o de NNA con  $\text{TINO}_3$  0.2 M y  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  0.015 M usando como fase sensora Amberlita XAD 7 a un tamaño de partícula de 80-120  $\mu\text{m}$ . Restándole la contribución de la resina se obtienen los espectros de excitación y emisión en fase sólida del pesticida y el metabolito (Figura B.1-5).

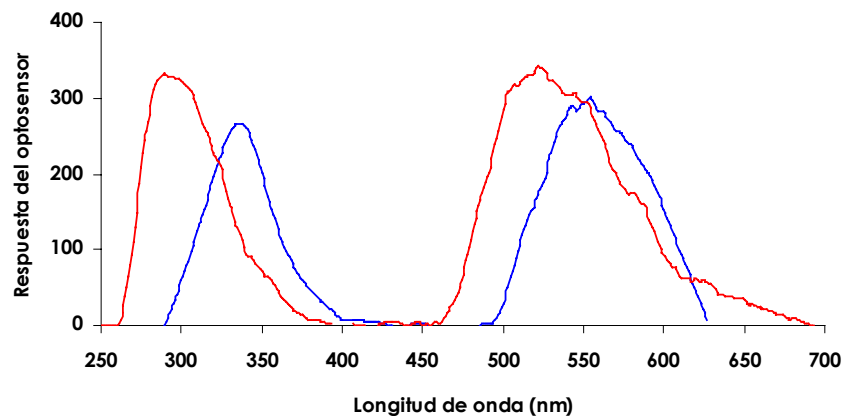


Figura B.1-5. Espectros de excitación y emisión del NAP (—) y la NNA (—) soportados en Amberlita XAD7.

Para el resto del trabajo se eligieron como óptimo  $\lambda_{exc/em} = 295/525$  nm y  $\lambda_{exc/em} = 325/555$  nm para el NAP y la NNA respectivamente.



### 3.3. Diseño del sistema de flujo

Para desarrollar un optosensor es necesario acoplar la fase sensora a un sistema de análisis por inyección en flujo (FIA). El sistema FIA propuesto, si bien ha sido descrito en la introducción y en la parte experimental, presenta una serie de particularidades propias del sistema en estudio. Concretamente consta de (véase Figura B.1-6):

- Un sistema de propulsión consistente en una bomba peristáltica que arrastra a una disolución portadora.
- Un sistema de inyección de muestra (válvula A), que consta de una válvula de inyección y un bucle de volumen definido.
- Un sistema de regeneración que consta de una válvula (válvula B) y un bucle.
- Una zona de medida, que al tratarse de un optosensor convencional es una cubeta de flujo convencional en la que se empaqueta la fase sensora seleccionada (Amberlita XAD7) y colocada en el paso óptico del espectrofotómetro.

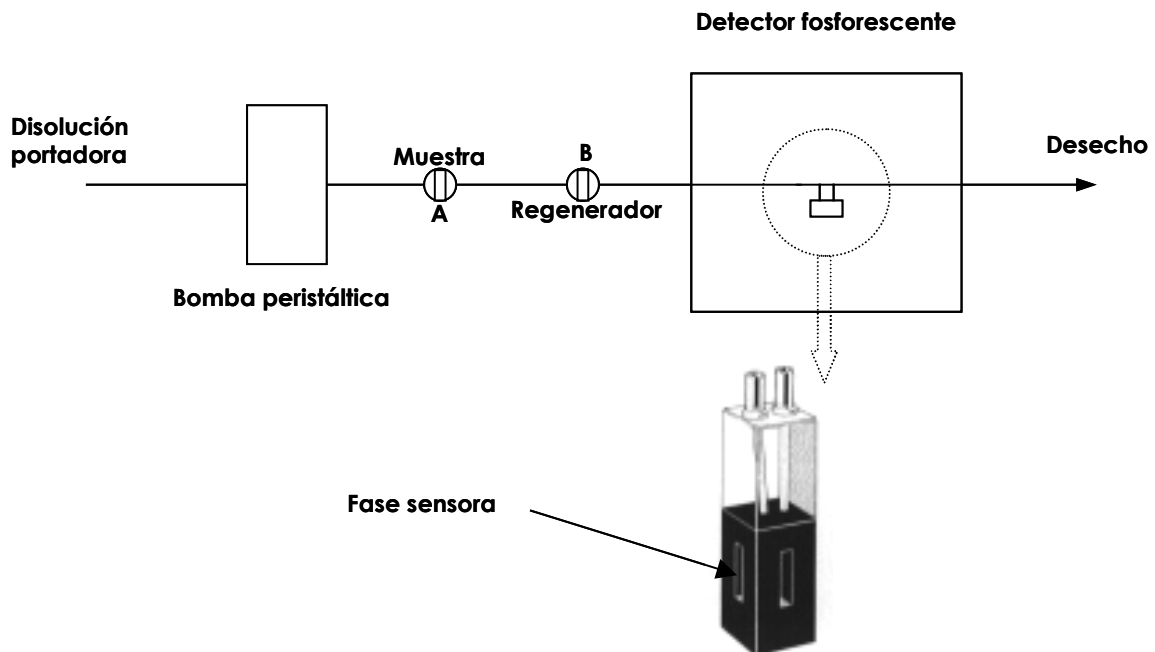
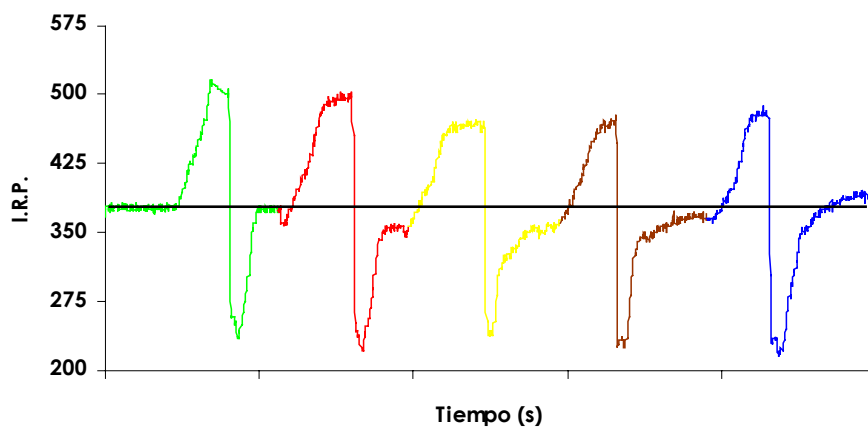


Figura B.1-6. Sistema de flujo utilizado.

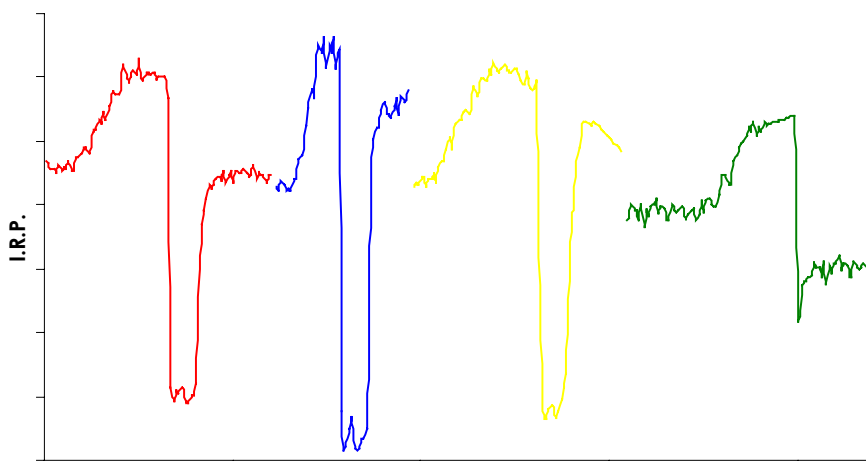
### 3.4. Elección del sistema de regeneración

Para hacer el sistema reutilizable es necesario que el NAP y la NNA se eluyan de la fase sensora. Por ello se utiliza la adición de disolventes orgánicos miscibles con agua como son: metanol, acetonitrilo, dimetilformamida, etanol y acetona. Éste último disolvente condujo a los mejores resultados para el caso del NAP, eluyendo el analito totalmente de la fase sensora (ver Figura B.1-7). Se realizó un estudio del porcentaje mínimo de acetona necesario para la completa regeneración, concluyendo que los mejores resultados se obtenían con una disolución acetona/H<sub>2</sub>O al 60% v/v.



**Figura B.1-7. Regeneración de la fase sensora con disolventes orgánicos. Acetona (—), dimetilformamida (—), etanol (—), metanol (—) y acetonitrilo (—).**

Para el caso de la NNA no se consiguieron resultados satisfactorios con los disolvente orgánicos probados, por lo que modificó el pH del medio con diferentes ácidos y bases fuertes: HCl, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, HNO<sub>3</sub> y NaOH, de todas ellas el mejor resultado se obtuvo con HNO<sub>3</sub>, siendo la concentración necesaria de éste para la elución del analito de 15 M (Figura B.1-8).



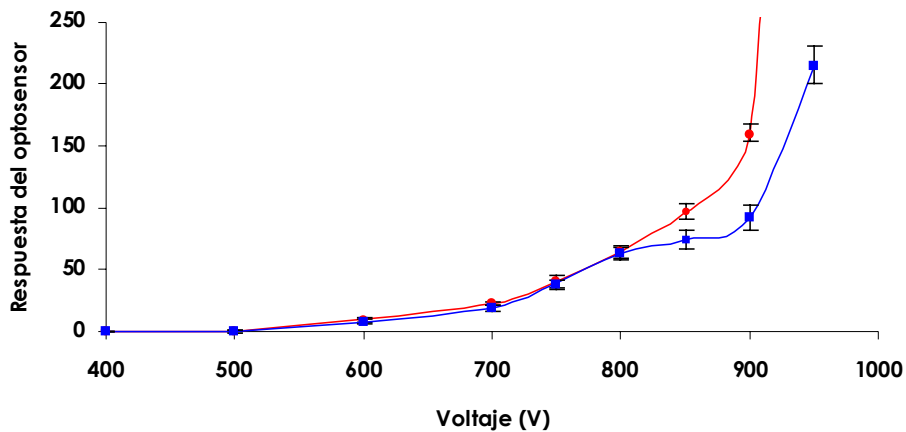
**Figura B.1-8. Regeneración de la fase sensora con ácidos y bases fuertes.  $\text{HNO}_3$  (—),  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (—),  $\text{HCl}$  (—) y  $\text{NaOH}$  (—).**

#### 4. SELECCIÓN DE LOS PARÁMETROS INSTRUMENTALES

Seleccionados la fase sensora, las longitudes de onda de trabajo y la disolución regenerante se procedió a estudiar los parámetros instrumentales para mejorar las señales analíticas de los optosensores propuestos.

##### 4.1. Voltaje del detector

Para optimizar este parámetro, se prepararon muestras individuales de concentración de 150 ng/mL de cada uno de los analitos con 0.2 M  $\text{TINO}_3$  y 0.015 M de  $\text{Na}_2\text{SO}_3$ , en una portadora con las mismas concentraciones de átomo pesado y desoxigenante y se midió cómo variaba la respuesta de los optosensores usando:  $\lambda_{\text{exc/em}} = 295/525$  nm y  $\lambda_{\text{exc/em}} = 325/555$  nm para el NAP o la NNA respectivamente, ancho de rendijas $_{\text{exc/em}}$  de 20 nm, valores de  $t_{d/g}$  de 0.12/5.00 ms, velocidad de flujo 0.75 mL/min, volumen de muestra 4 mL y de disolución regenerante 250  $\mu\text{L}$  para ambos casos. Los resultados obtenidos se exponen en la Figura B.1-9.



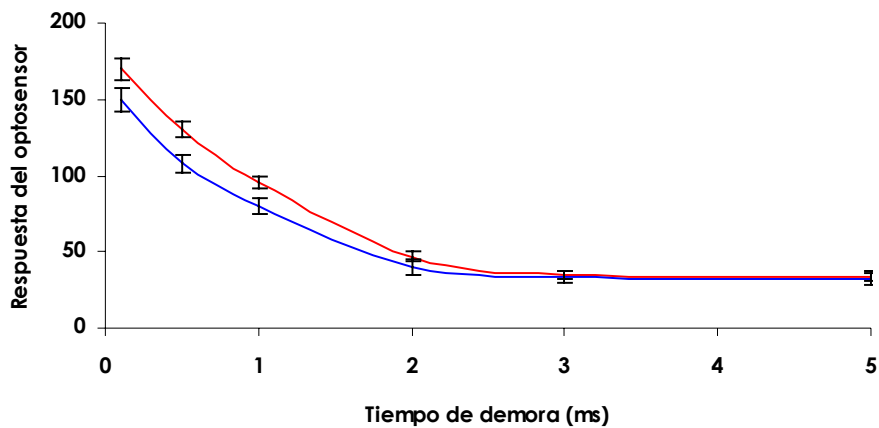
**Figura B.1-9. Influencia del voltaje del detector en la respuesta de los optosensores para el NAP (—) y la NNA (—).**

Se observa claramente que la respuesta de los optosensores para ambos analitos aumenta al incrementar el voltaje del detector, pero también lo hace el error asociado a las medidas, por tanto se eligió 900 V como valor óptimo para ambos analitos ya que la señal obtenida es adecuada y con un error aceptable.

#### 4.2. Tiempo de demora e integración

Tanto la intensidad de fosforescencia y la repetibilidad de las medidas dependen del tiempo de demora e integración que se establezcan y ambos a su vez del valor de vida media que para cada compuesto en las condiciones de medida.

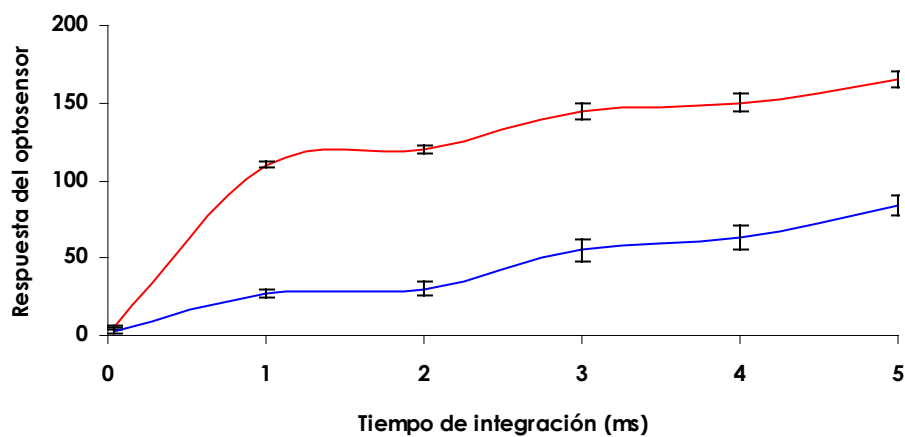
La Figura B.1-10 muestra cómo varía la respuesta de los optosensores cuando se inyectaron tres réplicas de cada uno de los analitos a una concentración de 150 ng/mL, con un tiempo de integración de 5 ms, variando el tiempo de demora entre 120  $\mu$ s y 5 ms.



**Figura B.1-10. Influencia del tiempo de demora en la respuesta de los optosensores para el NAP (—) y la NNA (—).**

Un aumento de  $t_d$  lleva consigo una disminución considerable de la respuesta del optosensor. Se eligió  $120 \mu\text{s}$  al dar la máxima intensidad de fosforescencia con un error aceptable.

A continuación, una vez fijado el  $t_d$  en  $120 \mu\text{s}$ , en las mismas condiciones anteriores se realizó el estudio de la influencia del  $t_g$  de la señal, variando este entre  $40 \mu\text{s}$  y  $5 \text{ ms}$ . La respuesta de los optosensores propuestos se muestran en la Figura B.1-11.



**Figura B.1-11. Influencia del tiempo de integración en la respuesta del optosensor del NAP (—) y de la NNA (—).**

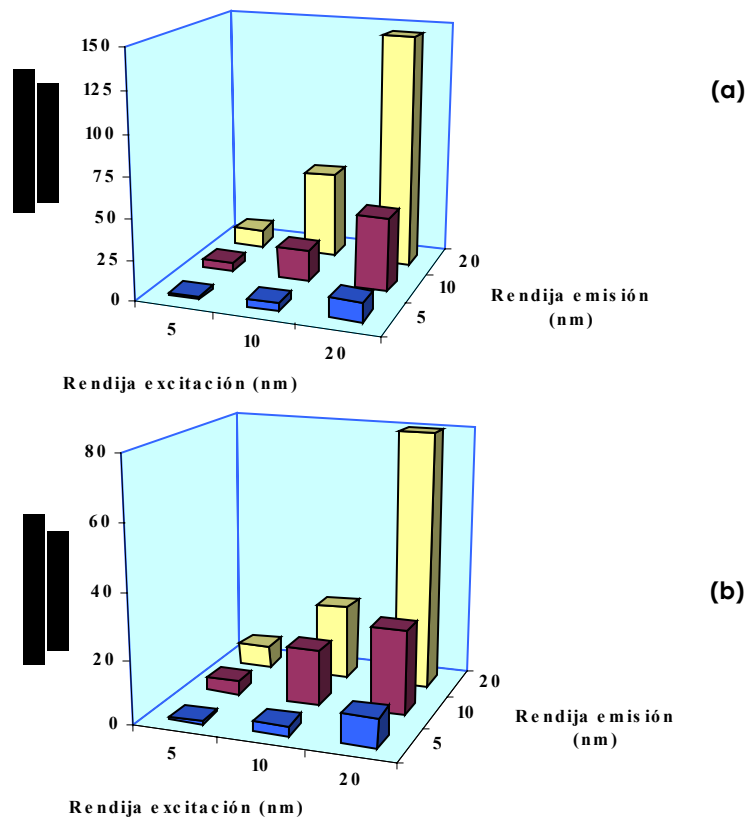
Podemos observar como un aumento del  $t_g$  implica un aumento de la respuesta del optosensor para cada uno de los dos analitos. Por tanto se eligió 5 ms para el resto del trabajo pues la respuesta de ambos optosensores es máxima y el error del mismo es aceptable.

### 4.3. Ancho de rendijas

La apertura de las rendijas de excitación influye sobre la cantidad de luz que incide sobre el analito soportado en la fase sensora y por tanto, sobre la intensidad de emisión de éste.

Para estudiar el efecto de la anchura de las rendijas sobre la respuesta del optosensor se inyectó en el sistema de flujo una muestra de 150 ng/mL de NAP o de NNA con 0.2 M en  $TiNO_3$  y 0.015 M en  $Na_2SO_3$ , en una portadora con las mismas concentraciones de átomo pesado y desoxigenante y se midió cómo variaba la respuesta del optosensor al variar el ancho de las rendijas<sub>exc/em</sub> usando:  $\lambda_{exc/em} = 295/525$  nm y  $\lambda_{exc/em} = 325/555$  nm para el NAP y la NNA respectivamente, voltaje del detector 900 V,  $t_{d/g}$  0.12/5.00 ms, velocidad de flujo 0.75 mL/min, volumen de muestra inyectado 2 mL y de disolución regenerante de 250  $\mu$ L.

Se realizaron las 9 combinaciones de anchuras posibles y tres réplicas para cada combinación y se obtuvo la dependencia mostrada en la Figura B.1-12.



**Figura B.1-12. Influencia del ancho de rendija sobre la respuesta de los optosensores para el NAP (a) y la NNA (b).**

Como se puede observar, el aumento de la anchura de las rendijas produce un aumento en la emisión fosforescente junto con el error asociado, observándose la mayor señal analítica con la mayor apertura de ambas rendijas tanto para el NAP como para la NNA, luego el ancho de rendijas elegido fue de 20/20 nm.

## 5. SELECCIÓN DE LAS VARIABLES EXPERIMENTALES

### 5.1. Tipo y concentración de átomo pesado

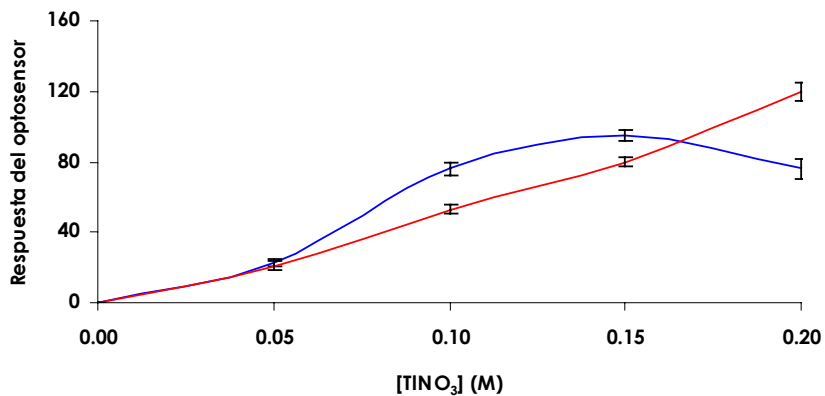
Se ha estudiado el efecto de dos átomos pesados, yoduro potásico y nitrato de talio sobre la intensidad de la señal fosforescente tanto del NAP como de su

metabolito. Sin embargo, sólo ofreció resultados analíticamente útiles el  $\text{TINO}_3$  para ambos analitos.

Se ensayaron tres posibilidades en el diseño de los optosensores: añadir  $\text{TINO}_3$  sólo en la muestra, añadir  $\text{TINO}_3$  sólo en la disolución portadora y, en tercer lugar, añadir la misma concentración de  $\text{TINO}_3$  en la muestra y en el portador. Tanto desde un punto de vista de la sensibilidad (mayor respuesta del optosensor) como de la repetibilidad los mejores resultados se obtuvieron usando las mismas condiciones en la muestra y en la disolución portadora.

Se optimizó la concentración de  $\text{TINO}_3$ , preparando diferentes muestras de pesticida o metabolito en portadoras con una concentración de  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  de 0.015 M y concentraciones variables de  $\text{TINO}_3$ . Las condiciones instrumentales fueron las optimizadas anteriormente.

En la Figura B.1-13 se refleja la influencia de la concentración de  $\text{TINO}_3$  en la respuesta de los optosensores.



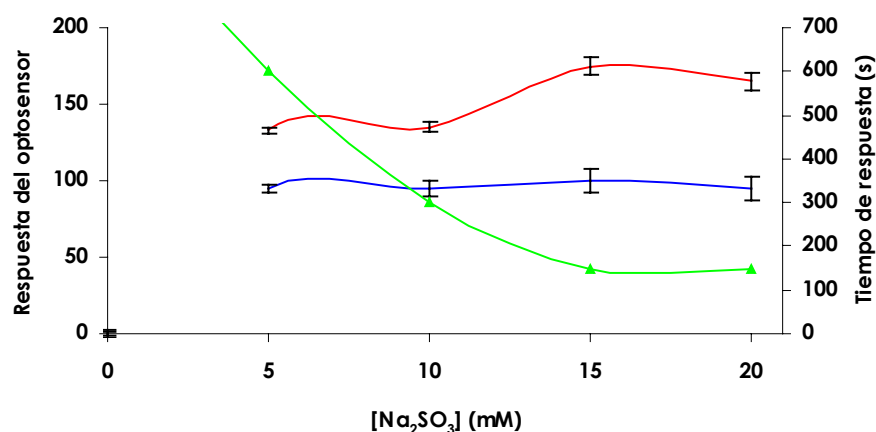
**Figura B.1-13. Influencia de la concentración de  $\text{TINO}_3$  en la respuesta de los optosensores para el NAP (—) y la NNA (—).**

En primer lugar cabe destacar que no se obtiene señal fosforescente en ausencia total de átomo pesado y que un aumento de la concentración de  $\text{TINO}_3$  provoca un aumento de la respuesta del optosensor para el caso del NAP, mientras que en el caso de NNA la señal comienza a estabilizarse a partir de 0.1 M. Se seleccionó una concentración de 0.2 M para ambos analitos, por dar una señal analítica alta y un error aceptable para los dos optosensores propuestos.



## 5.2. Concentración de sulfito sódico

Se estudió la influencia de este agente desoxigenante realizando tres réplicas de cada muestra y variando la concentración de sulfito sódico tanto en la muestra como en la portadora. La Figura B.1-14 refleja tal influencia, observando en primer lugar, que no se produce emisión fosforescente en ausencia de sulfito sódico. En segundo lugar, se puede ver que un aumento de la concentración de  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  provoca un aumento de la respuesta de los optosensores hasta una concentración de 5 mM, a partir de la cual la respuesta de los optosensores y el error de las medidas no varía, pero si podemos observar como el tiempo de respuesta del optosensor disminuye conforme seguimos aumentando la concentración de  $\text{Na}_2\text{SO}_3$ , manteniéndose constante a partir de una concentración de 15 mM. Por tanto, para asegurar que tanto la muestra como la disolución portadora permanecen desoxigenadas, incluso después de varias horas tras su preparación, se seleccionó una concentración de 20 mM.



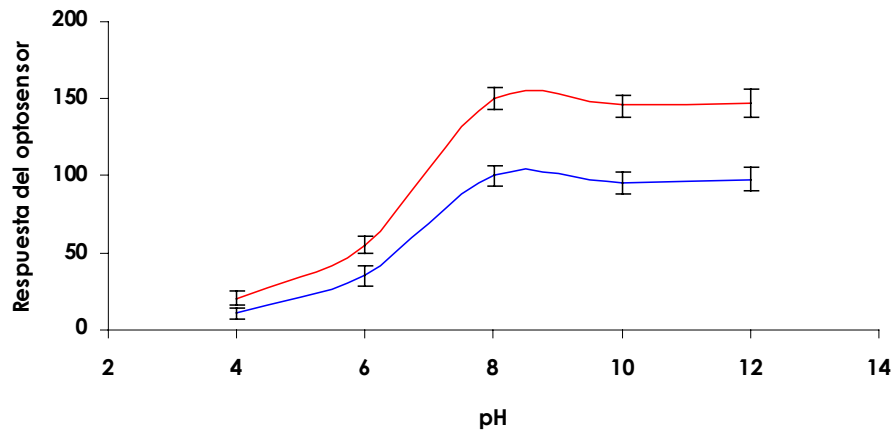
**Figura B.1-14. Influencia de la concentración de  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  en la respuesta del optosensor del NAP (—) y de la NNA (—) y en el tiempo de estabilización para ambos (—).**

## 5.3. Influencia del pH

El pH es una variable importante que limita la actuación desoxigenante (sulfito sódico) a pH superiores a 6. Además el pH afecta a la interacción de estos analitos con grupos activos de la fase sensora. Por todo ello es una variable experimental a optimizar.

Se varió el pH de la muestra y de la disolución portadora con HCl o NaOH desde 4 hasta 11, comprobando que hasta pH 8 la señal de los optosensores aumentaban

significativamente, mientras que a pH superiores a 8 las señales de los optosensores se estabilizan. Por esta razón los valores del pH deben de oscilar entre pH 8 y 9 para obtener los mejores resultados (Figura B.1-15).



**Figura B.1-15. Influencia del pH en la respuesta de los optosensores para el NAP (—) y la NNA (—).**

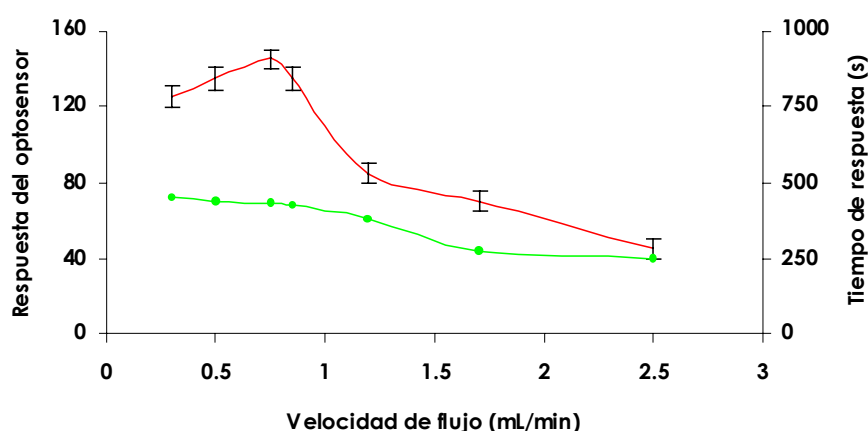
Hay que resaltar que el pH, tanto de la muestra como de la disolución portadora, tras adicionar el átomo pesado y el  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  está entreo a 8-9 aproximadamente. Por tanto, no es necesario utilizar ningún sistema de regulación del pH, simplificando y abaratando el optosensor propuesto, aunque los experimentos ponen de manifiesto que en caso de ser necesario regular el pH, esto podría hacerse sin interferir en la medida.

## 6. VARIABLES DE FLUJO

Optimizados los parámetros instrumentales y las variables experimentales se procedió a la selección de las dos variables de flujo que afectan tanto a la sensibilidad del método como al tiempo de respuesta: la velocidad de flujo y el volumen de muestra inyectado.

### 6.1. Velocidad de flujo

La velocidad de la disolución portadora puede ser controlada variando la velocidad de la bomba y el diámetro de los tubos utilizados. De esta forma, para estudiar la influencia de esta variable se realizaron variaciones en la velocidad de la bomba peristáltica manteniendo constante el diámetro del tubo. Fueron inyectadas tres réplicas sucesivas para cada valor de flujo y se midió la respuesta de los optosensores y el tiempo de respuesta de cada uno de ellos. Los resultados para el caso del NAP se muestran en la Figura B.1-16.



**Figura B.1-16.** Influencia de la velocidad de flujo en la respuesta de los optosensores para el NAP (—) y en el tiempo de estabilización (—).

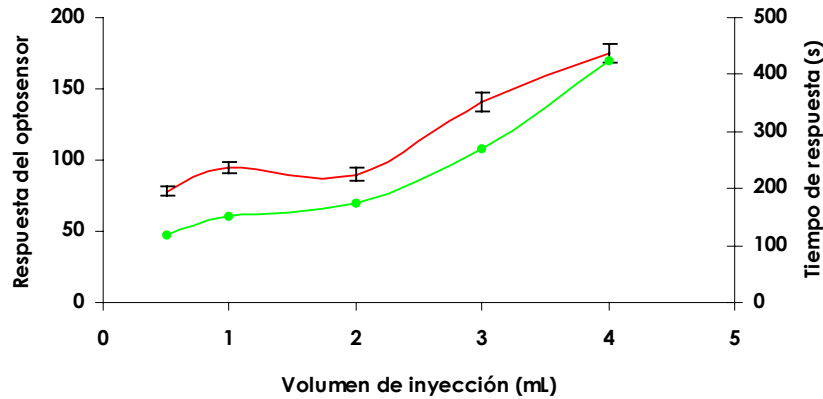
Como era de esperar, un aumento de la velocidad de flujo provoca una disminución de la respuesta del optosensor y a la vez una disminución del tiempo de respuesta del mismo.

El caso del a NNA es análogo al del NAP, por lo que se eligieron 0.75 mL/min como valor de compromiso entre tiempo de respuesta y señal obtenida para ambos analitos. Se comprueba claramente que el proceso es cinético y que está determinado por la velocidad a la que el bolo de analito pasa por la fase sensora.

### 6.2. Volumen de muestra

El volumen de muestra que se inyecta en el sistema va a condicionar la sensibilidad del optosensor y el tiempo de respuesta. Para estudiar la influencia de esta

variable se dispusieron diferentes volúmenes en el bucle de la válvula de inyección de la muestra y se registraron tres réplicas para cada volumen estudiado. Volúmenes mayores de 4 mL no se pudieron ensayar por problemas de sobrepresión. Los resultados para el optosensor del NAP pueden observarse en la Figura B.1-17.



**Figura B.1-17. Influencia del volumen de inyección de muestra en la respuesta del optosensor del NAP (→) y en el tiempo de estabilización (→).**

Un aumento del volumen de muestra, como era de esperar, provoca un aumento de la respuesta del optosensor y al mismo tiempo un aumento del tiempo de respuesta del mismo. Pero debido a que los incrementos en el error y en el tiempo de respuesta no eran muy acusados, se seleccionó el mayor volumen de inyección posible para así conseguir la mayor diferencia señal-ruido y obtener un menor límite de detección. Como ocurre con los parámetros anteriores los resultados obtenidos con la NNA son análogos.

## 7. REOPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES PARA LA DETERMINACIÓN CONJUNTA DE NAPTALAN Y SU METABOLITO LA 1-NAFTILAMINA

### 7.1. Resumen de la características de los optosensores propuestos

En primer lugar y antes de llevar a cabo la determinación conjunta de ambos analitos, es necesario elegir unas condiciones experimentales e instrumentales de compromiso entre los valores óptimos de cada optosensor propuesto. En la tabla B.1-1 se resumen los datos óptimos de las variables instrumentales, experimentales y parámetros de flujo de los optosensores.

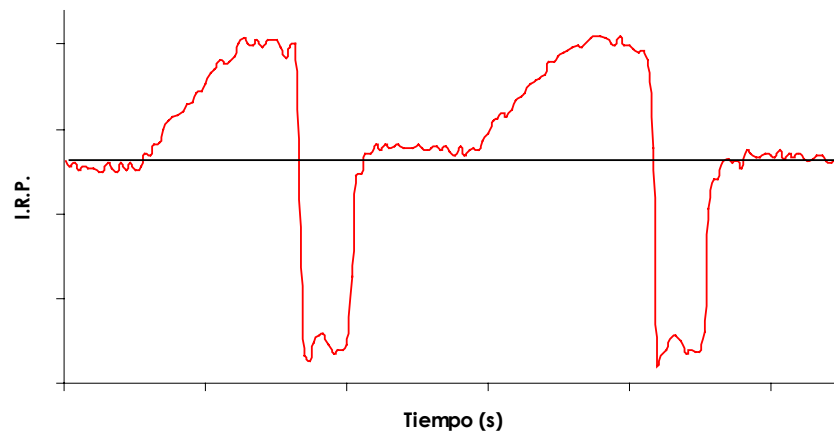
Tabla B.1-1. Características instrumentales, experimentales y parámetros de flujo

	Valores optimos	
	NAP	NNA
$\lambda_{exc/em}$ (nm)	295/525	325/555
Disolución regenerante (250 $\mu$ L)	Acetona/H <sub>2</sub> O 60% v/v	Ácido nítrico (15 M)
Voltaje del detector (V)	900	900
Anchura de rendijas <sub>exc/em</sub> (nm)	20/20	20/20
$t_{d/g}$ (ms)	0.12/5.00	0.12/5.00
[TiNO <sub>3</sub> ] (M)	0.20	0.20
[Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> ] (mM)	15	15
Velocidad de flujo (mL/min.)	0.75	0.75
Volumen de muestra (mL)	4	4

Por lo tanto se observa que para llevar a cabo la determinación conjunta debemos de llegar a unas condiciones de compromiso, debemos de elegir un sistema regenerante válido para los dos analitos y unas longitudes de onda de excitación y emisión de trabajo adecuadas.

## 7.2. Selección del sistema de regeneración

De los estudios realizados anteriormente podemos deducir que el uso de disolventes orgánicos miscibles con agua no es posible debido a que no consiguen eluir de la resina la NNA. Por el contrario con este analito se obtuvieron muy buenos resultados con la utilización de ácido nítrico a la concentración de 15 M, por este motivo se probara este ácido en la regeneración del NAP de nuestra fase sensora. Los resultados se muestran en la Figura B.1-18.



**Figura B.1-18. Regeneración del NAP de la fase sensora con el uso de HNO<sub>3</sub> 15 M.**

Podemos observar como la regeneración es buena, por lo que en la realización del optosensor biparamétrico se utilizara ácido nítrico 15 M (250  $\mu$ L) como sistema de regeneración.

### 7.3. Selección de las longitudes de onda de excitación y emisión

Para poder desarrollar un sensor capaz de detectar y/o cuantificar el NAP y NNA en estudio de forma simultánea, es necesario llevar a cabo una buena selección de las longitudes de onda de excitación y emisión.

Si observamos de nuevo los espectros en fase sólida de ambos analitos (Figura B.1-19), se puede comprobar que existen un par de longitudes de onda donde se podría determinar de forma independiente el NAP sin interferencia de la NNA (par 1). Además, otro par de longitudes de onda (par 2) donde se pueden determinar NAP y NNA de forma conjunta.

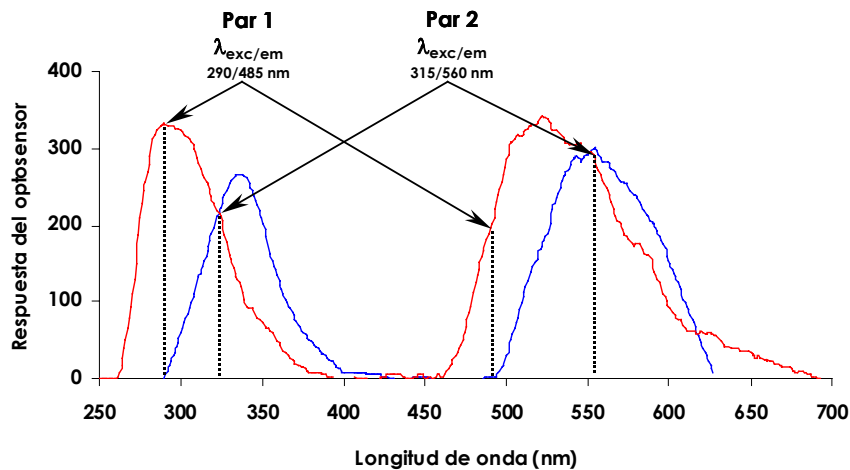


Figura B.1-19. Espectros de excitación y emisión del NAP (—) y la NNA (—) soportados en Anberlita XAD7.

Se planteó un sistema de dos ecuaciones con tres incógnitas y para poder cuantificar la cantidad de cada uno de los analitos. Estas ecuaciones serían:

$$I_1 = b_1 \cdot [\text{NAP}] + a_1$$

$$I_2 = b_2 \cdot [\text{NAP} + \text{NNA}] + a_2$$

donde  $I_1$  e  $I_2$  son la respuesta del optosensor registrada en los pares 1 y 2, respectivamente;  $b_1$  sería la pendiente de la recta de calibrado del NAP en el par 1;  $b_2$  sería la contribución del NAP y NNA, respectivamente, a la pendiente de la recta de calibrado conjunta de los dos analitos en el par 2.

Para simplificar esta expresión se puede elegir un par de longitudes de onda donde los dos compuestos emitan con la misma intensidad (isoemisivos) y así contribuyan en el mismo orden de magnitud a la respuesta del optosensor. Si esto se consigue, se podría decir que  $a_1 = a_2$  y permitiendo simplificar la expresión anterior:

$$I_1 = b_1 \cdot [\text{NAP}]$$

$$I_2 = b_2 \cdot ([\text{NAP}] + [\text{NNA}])$$

donde  $b_2$  sería la pendiente de la recta de calibrado de NAP + NNA

Así los factores  $b_1$  se puede calcular registrando la variación de la respuesta del optosensor con la concentración de NAP al par de longitudes de onda ( $\lambda_{exc/em}=290/485$  nm). Los factores  $b_2$  se puede establecer registrando la variación de la respuesta del optosensor con la suma de las concentraciones de NAP y NNA, a un par de longitudes de onda en los que sean isoemisivos ( $\lambda_{exc/em}=315/560$  nm).

Seleccionados los pares de  $\lambda_{exc/em}$  se comprobarán los supuestos anteriormente establecidos (en el par 1 debe emitir sólo el NAP y en el par 2 tienen que emitir con la misma intensidad NAP y NNA). Para ello, se hicieron sucesivas inyecciones de una disolución de 300 ng/mL de cada uno de los analitos en estudio, registrándose la señal independiente de cada uno de ellos a los dos valores de las parejas de  $\lambda_{exc/em}$  seleccionadas (véase Figura B.1-20).

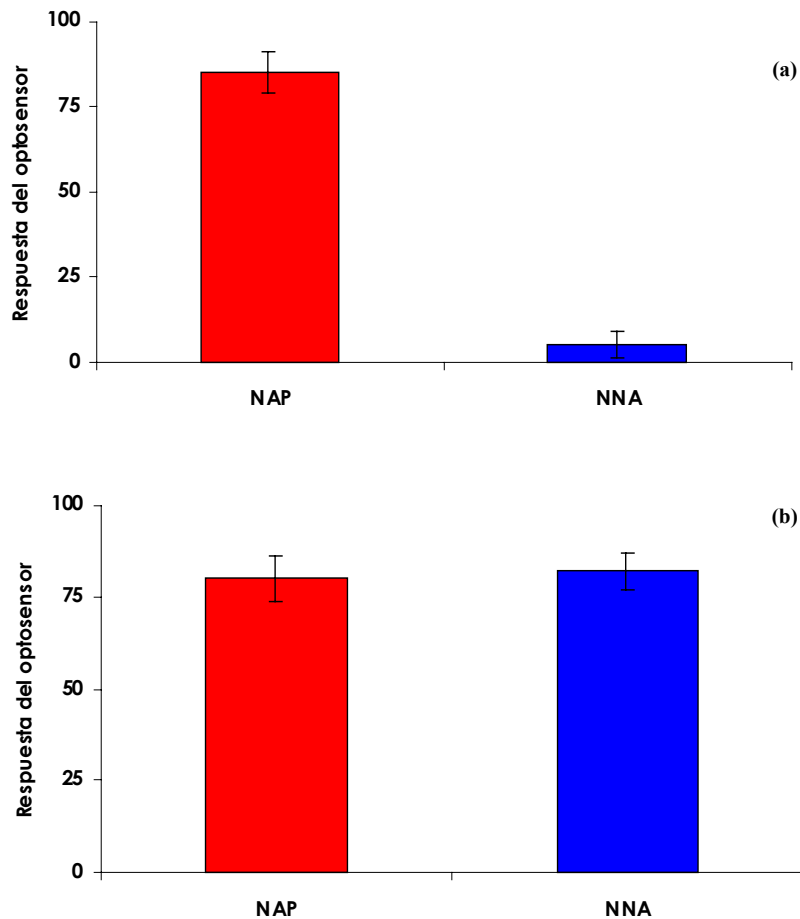


Figura B.1-20. Diferencias señal-ruido del optosensor a los pares de longitudes de onda 1 y 2 (a) 290/485 nm y (b) 315/560 nm (■ NAP, ■ NNA).

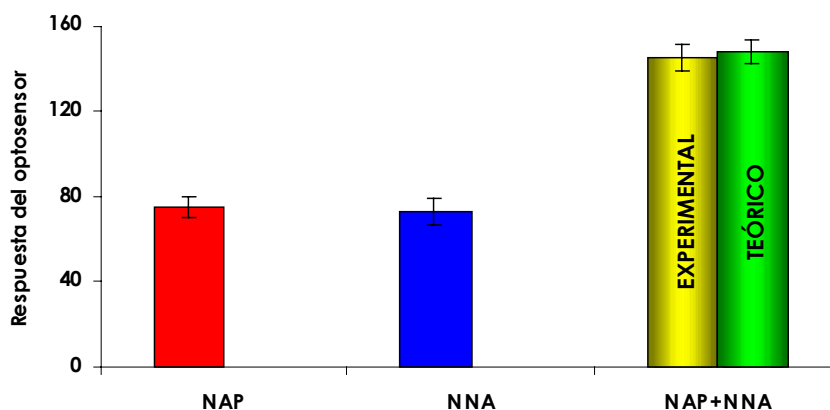


Como se puede observar en esta figura, en el par 1 ( $\lambda_{exc/em}=290/485$  nm) se puede cuantificar NAP sin la influencia de su metabolito y en el par 2 ( $\lambda_{exc/em}=315/560$  nm) se puede cuantificar NAP+NNA y además los dos emiten con intensidad similar, por lo tanto se cumple el supuesto establecido anteriormente.

#### 7.4. Estudio de aditividad de las señales

Para poder establecer una recta de calibrado usando los pares de longitudes de onda 2, en los que se evalúa conjuntamente ambos analitos, es necesario comprobar previamente que las señales son aditivas, para así, poder establecer una recta de calibrado en función de la concentración total de la mezcla.

Por ello se hicieron sucesivas inyecciones de disoluciones de NAP o NNA de 300 ng/mL y la combinación de ambos (de concentración total 600 ng/mL), registrándose la respuesta del optosensor a  $\lambda_{exc/em}=315/560$  nm (véase Figura B.1-21).



**Figura B.1-21. Estudio de la aditividad en el par de longitudes de onda 2 (315/560 nm) (■ NAP, ■ NNA).**

Como se puede observar en la figura, las señales del par de longitudes de onda 2 son aditivas, pues los valores experimentales son prácticamente iguales a los teóricos (obtenidos al sumar las respuestas del optosensor de cada uno de los analitos independientemente) por lo que se puede establecer una recta de calibrado en función de la concentración total de ambos compuestos presentes en la mezcla.

## 8. CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS DEL MÉTODO

Una vez establecidas las condiciones experimentales óptimas y las condiciones de medida para la determinación conjunta, se procedió al establecimiento del método analítico. En este apartado se ha establecido el procedimiento operatorio, las rectas de calibrado para cada uno de los pares de longitudes de onda previamente seleccionados y los parámetros de fiabilidad de cada una de las curvas, cuyo estudio se llevó a cabo mediante el protocolo del modelo de regresión lineal de la IUPAC.

### 8.1. Procedimiento operatorio

La fase sensora seleccionada (Amberlita XAD 7 particulada a 80-120  $\mu\text{m}$ ) se empaquetó en la cubeta de flujo convencional. Se preparó una disolución portadora conteniendo 0.2 M de  $\text{TINO}_3$  y 0.02 M de  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  y varias disoluciones de concentraciones crecientes de NAP (para llevar a cabo la recta de calibrado en el par 1) y de NAP + NNA (para llevar a cabo la recta de calibrado en el par 2) en las condiciones experimentales óptimas (0.2 M  $\text{TINO}_3$  y 0.02 mM  $\text{Na}_2\text{SO}_3$ ). Se ajustó la velocidad de flujo de la bomba peristáltica a 0.75 mL/min y se acondicionó la fase sensora dejando pasar la disolución portadora durante 5 min. Se fijaron las condiciones instrumentales en el equipo y se registró la señal analítica que se producía en la celda de flujo después de la inyección.

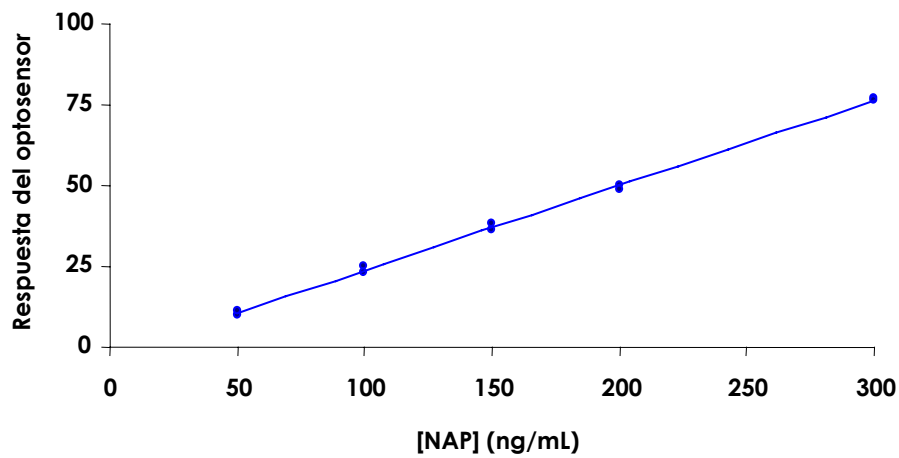
### 8.2. Recta de calibrado

Se establecieron las rectas de calibrado para cada una de las zonas de medida seleccionadas variando la concentración del analito o mezclas de ellos, realizando tres réplicas para cada nivel de concentración.

Los datos estadísticos de esta recta de calibrado se pueden observar en la Tabla B.1-2 y en la Figura B.1-22 y B.1-23 se muestran las influencias de las concentraciones sobre las respuestas del optosensor en los pares de longitudes de onda de medida.

Tabla B.1-2. Parámetros estadísticos de las rectas

Análitos detectados	Parámetro estadístico	Valor estimado
NAP	Ordenada en el origen (a)	-2.554
	Pendiente (b)	0.263
	Coefficiente de correlación (r)	0.998
	Coefficiente de determinación (r <sup>2</sup> ) (%)	0.997
NAP y NNA	Ordenada en el origen (a)	23.411
	Pendiente (b)	0.068
	Coefficiente de correlación (r)	0.997
	Coefficiente de determinación (r <sup>2</sup> ) (%)	0.996

Figura B.1-22. Recta de calibrado usando el par 1 ( $\lambda_{exc/em} = 290/485 \text{ nm}$ ).

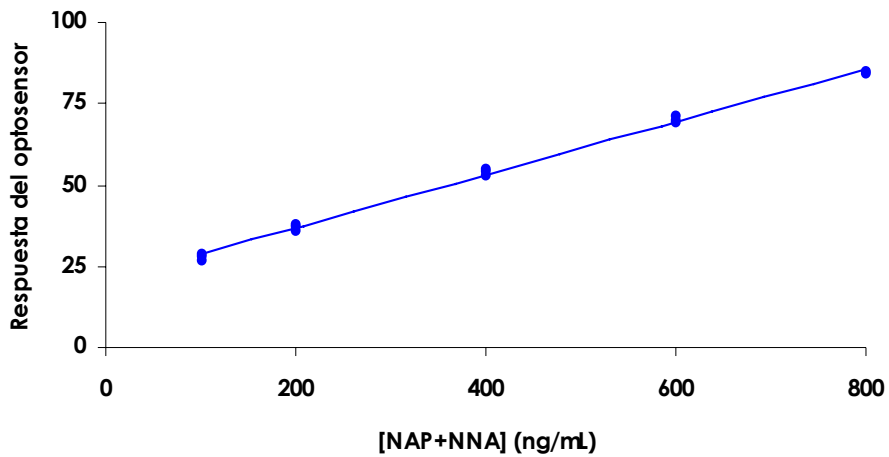


Figura B.1-23. Recta de calibrado usando el par 2 ( $\lambda_{exc/em} = 315/560 \text{ nm}$ ).

### 8.3. Parámetros de fiabilidad

Para calcular el límite de detección (L.D.) y el límite de cuantificación (L.C.) según el criterio IUPAC, se calculó la desviación estándar de un blanco ( $s_0$ ), para ello se registró la desviación estándar de la línea base del optosensor y a partir de ella se calculó el L.D. y el L.C. La Tabla B.1-3 muestran los resultados obtenidos.

Tabla B.1-3. Parámetros analíticos del optosensor propuesto

$\lambda_{exc/em}$ (nm)	Analitos detectados	Parámetro analítico	Valor estimado
290/485	NAP	Intervalo dinámico lineal (ng/mL)	8.1-300.0
		Límite de detección (ng/mL)	8.1
		Límite de cuantificación (ng/mL)	30.2
		D.E.R. (%) at 150 ng/mL	2.7
315/560	NAP y NNA	Intervalo dinámico lineal (ng/mL)	11.2-800.0
		Límite de detección (ng/mL)	11.2
		Límite de cuantificación (ng/mL)	50.1
		D.E.R. (%) at 400 ng/mL	1.0

## 9. APLICACION DEL MÉTODO PROPUESTO AL ANÁLISIS EN AGUA

Para comprobar la aplicabilidad del método propuesto se ha realizado un estudio de recuperación para distintas mezclas aleatorias de los dos compuestos en estudio en agua.

El procedimiento operatorio seguido fue: se tomaron 2 muestras diferentes de agua (agua superficial de consumo humano y agua mineral embotellada), se enriquecieron a distintos niveles de concentración de los analitos en estudio (véase Tabla B.1-4). Se tomó la cantidad adecuada de disolución de átomo pesado y de sulfito sódico para conseguir una concentración final de 0.2 M de  $\text{TINO}_3$  y 0.02 M de  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  y se enrasó con las muestras de agua a analizar.

Se realizaron tres réplicas para cada una de las muestras analizadas a cada nivel de concentración llevando a cabo el registro de la intensidad de fosforescencia a las condiciones instrumentales óptimas de cada una de las zonas de medida seleccionadas anteriormente, con una velocidad de flujo de 0.75 mL/min, inyectando 4 mL de muestra. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla B.1-4.

**Tabla B.1-4. Estudios de recuperación en muestras reales**

	Valor añadido (ng/mL)		Valor encontrado (ng/mL)		Porcentaje de recuperación (%)		D.E.R. (%)	
	NAP	NNA	NAP	NNA	NAP	NNA	NAP	NNA
<b>Agua 1</b>	400	-	383	-	95.7	-	2.5	-
<b>Agua 2</b>	400	600	362	530	98.2	102.8	1.9	3.1
<b>Agua 3</b>	-	300	-	257	-	97.2		1.6
<b>Mineral 1</b>	200	-	195	-	104.2	-	0.9	-
<b>Mineral 2</b>	-	400	-	413	-	82.8	-	2.4
<b>Mineral 3</b>	300	600	271	684	90.5	114.1	1.8	2.7

Se podría concluir de estos resultados que el optosensor propuesto puede usarse de forma simple, selectiva y sensible para la resolución de mezclas de NAP y NNA en muestras de agua, consiguiendo buenas características analíticas y la determinación simultánea de los dos analitos con una sola inyección de muestra en el sistema de flujo.



## **CAPÍTULO B.2**

### **Desarrollo de nuevas fases sensoras mediante la técnica de impresión molecular para la determinación de hidrocarburos aromáticos policíclicos**

El trabajo derivado del presente Capítulo ha sido enviado a la revista "Analytica Chimica Acta" (ver ANEXO VII).





## CAPÍTULO B.2

### CARACTERIZACIÓN FOSFORIMÉTRICA EN FASE SÓLIDA DE HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS. OPTOSENSOR SELECTIVO PARA LA DETERMINACIÓN DE BaP

<b>1. ESTUDIO POTENCIAL PARA EL DESARROLLO DE OPTOSENSORES FOSFORESCENTES PARA HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS</b> .....	<b>281</b>
1.1 Características fosforescentes en disolución (HAI-RTP).....	281
1.2. Parámetros instrumentales .....	281
1.3. Estudios preliminares de variables experimentales .....	281
1.4. Características espectroscópicas en fase sólida .....	282
1.5. Estudio de la interacción de HAPs con resinas .....	285
1.6. Conclusiones derivadas del anterior estudio experimental .....	288
<b>2. OPTOSENSOR SELECTIVO PARA LA DETERMINACIÓN DE BENZO(a)PIRENO</b> .....	<b>289</b>
2.1. Estudios previos.....	290
2.2. Selección de los parámetros instrumentales.....	291
2.2.1. Voltaje del detector. ....	291
2.2.2. Tiempo de demora e integración.....	292
2.2.3. Ancho de rendijas.....	294
2.3. Selección de las variables experimentales.....	294
2.3.1. Tipo y concentración de átomo pesado. ....	294
2.3.2. Concentración de sulfito sódico .....	295
2.3.3. Disolventes orgánicos.....	296
2.4. Variables de flujo.....	296
2.4.1. Velocidad de flujo .....	297
2.4.2. Volumen de muestra.....	297
2.5. Selectividad del optosensor propuesto .....	298
2.6. Características analíticas del método .....	300
2.6.1. Procedimiento operatorio .....	300
2.6.2. Recta de calibrado .....	300
2.6.2. Parámetros de fiabilidad .....	301
2.7. Aplicaciones del método propuesto al análisis de muestras reales .....	302



## 1. ESTUDIO POTENCIAL PARA EL DESARROLLO DE OPTOSENSORES FOSFORESCENTES PARA HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS

### 1.1. Características fosforescentes en disolución (HAI-RTP)

Para comenzar el estudio de optimización del resto de variables experimentales en este estudio de los HAPs, utilizamos como longitudes de onda las obtenidas mediante la metodología HAI-RTP estudiadas en el Capítulo A.3 de la presente Memoria (Tabla B.2-1), teniendo en cuenta que en los métodos desarrollados hasta ahora, las longitudes de onda de los HAPs en disolución coinciden prácticamente a las que presentan retenidos en fase sólida.

**Tabla B.2-1. Características espectroscópicas en condiciones experimentales de la metodología HAI-RTP de los HAPs**

Compuesto	$\lambda_{exc/em}$ (nm)*
NAPH	280/515
ACEN	290/500,530
ACE	290/525
FLU	290/455
PHE	285/505
ANT	355/680,750
FLT	280,355/555,590
PYR	280,330/593,650
CHRY	275/515,555
BaA	280/605,660
BkF	300/570,622
BbF	295,345/555,585
BaP	290,355/690,765
IcdP	295,326/525,665,725
BghiP	295,378/450,620,665
DBahA	315/470,505,555,605

\*Subrayados los máximos de excitación y emisión

### 1.2. Parámetros instrumentales

Para comenzar se han fijado unas condiciones instrumentales de partida. Los parámetros instrumentales afectan a la diferencia señal-ruido y por tanto, a las características analíticas del método, sin embargo, no afectan a la capacidad de los analitos a interaccionar con las fases sensoras seleccionadas. Estos valores se muestran en la Tabla B.2-2.

Tabla B.2-2. Parámetros instrumentales seleccionados

Parámetro instrumental	Valor seleccionado
Voltaje del detector	850 V
Tiempo de demora/integración	0.1/5.0 ms
Ancho de rendijas <sub>exc/em</sub>	20/20 nm

### 1.3. Estudios preliminares de variables experimentales

Las variables experimentales más importantes que pueden afectar a la emisión fosforescente en fase sólida de los HAPs son: fase sensora, átomo pesado externo utilizado, necesidad de desoxigenación y disolvente orgánico presente en el medio.

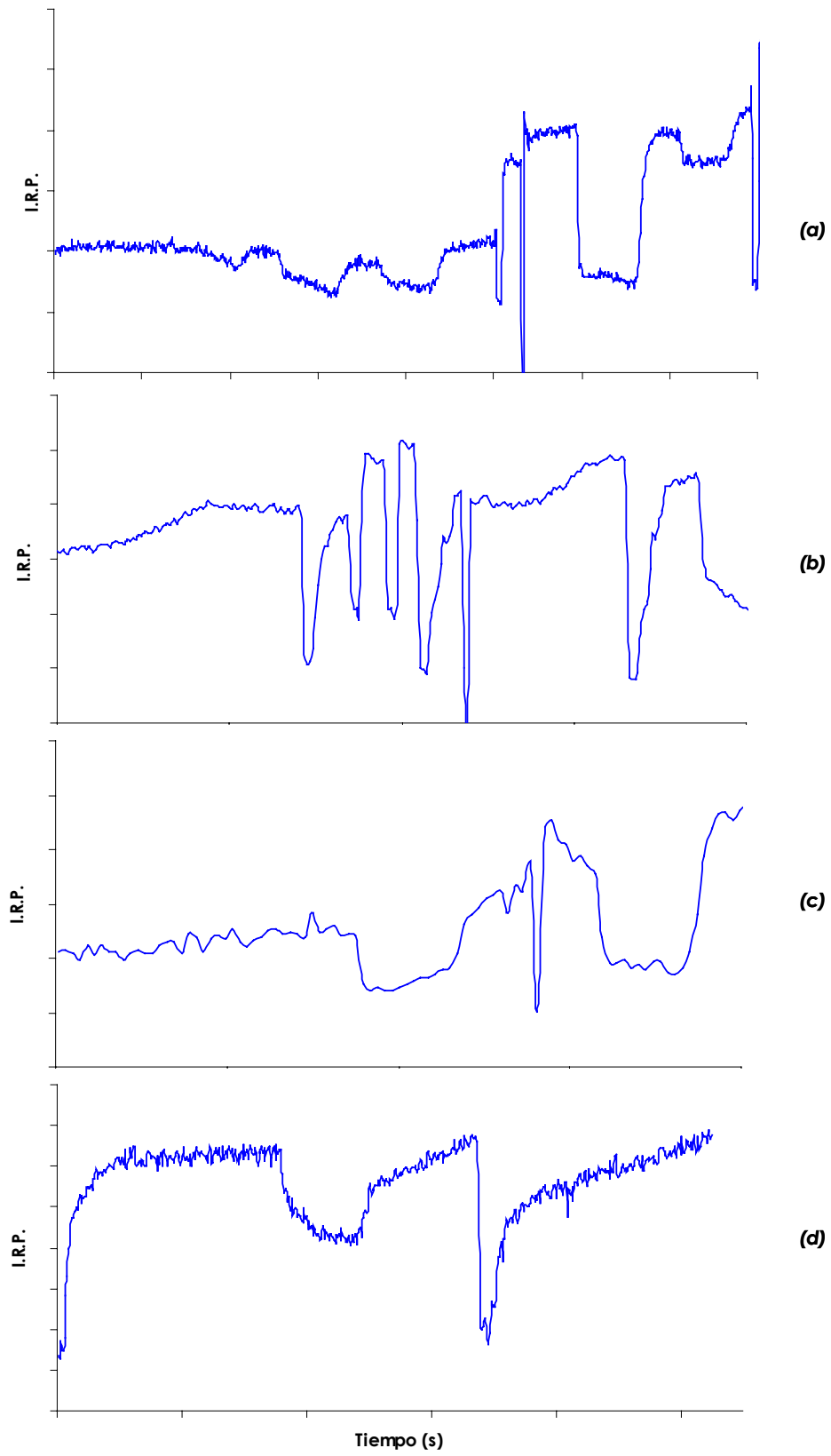
- a) Una variable experimental fundamental que afecta a la fosforescencia en fase sólida es el tipo de soporte sólido usado. En este tipo de dispositivos, los soportes sólidos actúan provocando una preconcentración de los analitos en una pequeña región del mismo que es donde se mide la emisión fosforescente. Para evaluar las características fosforescentes de los 16 HAPs de la EPA en fase sólida, se probaron 5 resinas no iónicas (Amberlita XAD 2, Amberlita XAD 4, Amberlita XAD 7, Gel de Sílica Davisil y Gel de Sílica Merck).
- b) El átomo pesado externo es una variable muy importante en fosforescencia, ya que este va a ser necesario en este caso para la obtención de señal fosforescente de los HAPs soportados en nuestra resina. Se han probado los dos átomos pesados que hasta ahora nos han ofrecido mejores resultados como fueron el KI y el TINO<sub>3</sub>.
- c) Es necesaria la desoxigenación del medio para evitar la atenuación causado que produce el oxígeno en la señal de fosforescencia. Se utilizó el sulfito sódico como agente desoxigenante.
- d) Por otro lado, debido a que los HAPs son altamente insolubles en agua, es necesario añadir un disolvente orgánico a las muestras que ayude a su solubilización y evite que queden retenidos en las tuberías de teflón usadas para diseñar los sistemas de análisis por inyección en flujo. Por tanto, se estudió el efecto que produce la presencia de cinco disolventes orgánicos miscibles con agua (etanol, metanol, acetonitrilo, 1,4-dioxano y acetona) en las muestras.

Como se puede deducir de lo comentado anteriormente, se estudiaría la interacción de 15 analitos, con 5 resinas, dos átomos pesados y en presencia de 5 disolventes orgánicos miscibles con agua, lo cual nos supondría llevar a cabo un gran número de experiencias. Para disminuir el número de experiencias preliminares, se eligieron 4 HAPs y se llevo a cabo un estudio preliminar de estos y en todos los casos se utilizo una concentración de sulfito sódico de 10 mM, estimando que esta concentración es suficiente para la desoxigenación total del sistema y las condiciones instrumentales dadas en el apartado anterior. Se prepararon diferentes disoluciones de 600 ng/mL de FLT, BkF, BbF y BaP, añadiendo la cantidad adecuada de cada uno de los disolventes orgánicos para conseguir un porcentaje final del 30% v/v al trabajar con KI y de 10% v/v en el caso de trabajar con  $\text{TINO}_3$ , y la cantidad necesaria de KI ó  $\text{TINO}_3$  para fijar una concentración de 3.0 M ó 0.2 M respectivamente.

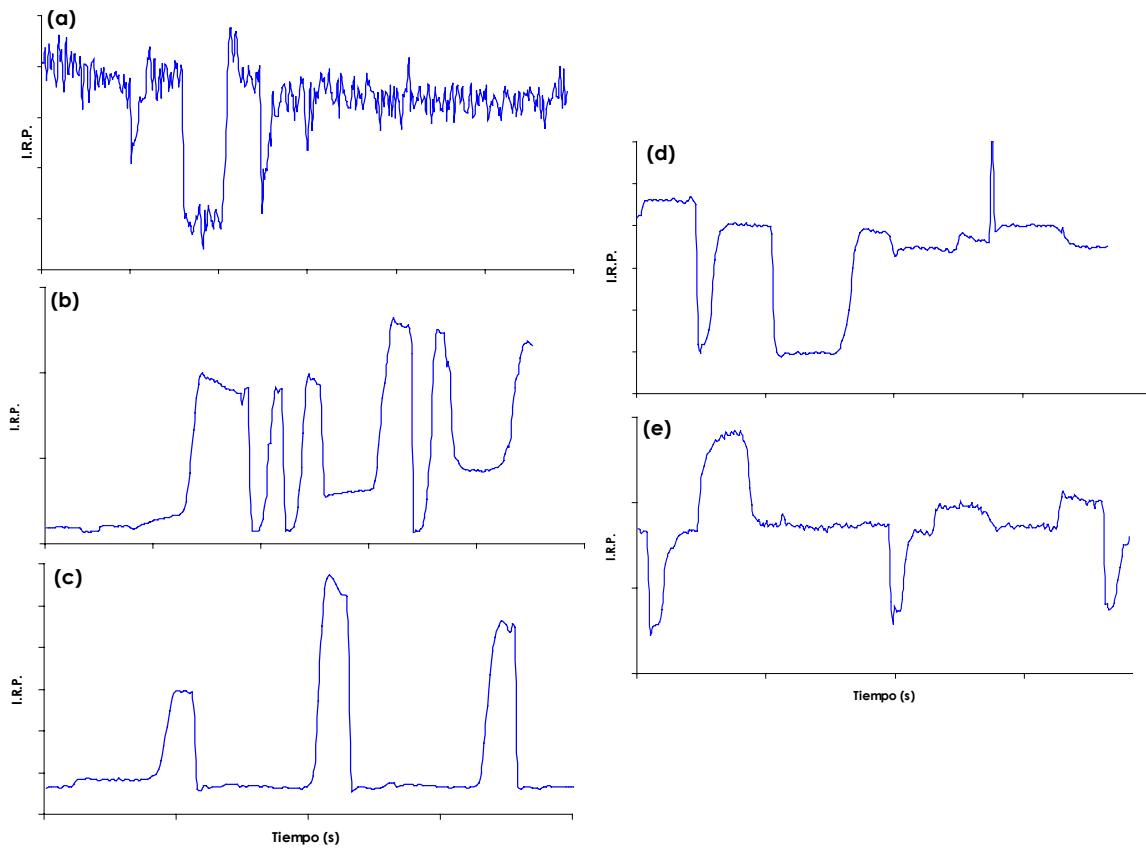
Para llevar a cabo las medidas se empaquetaron las resinas en la cubeta de flujo convencional. Posteriormente se hicieron pasar 4 mL de cada una de las disoluciones preparadas de los HAPs y se registro la emisión fosforescente. Las medidas luminiscentes se realizaron a las longitudes de onda apropiadas para cada tipo de compuesto seleccionado fijando las condiciones instrumentales de la Tabla B.2-1.

De estos estudios preliminares se deduce una seria de conclusiones que nos ayudan a concretar más el estudio sobre todos los HAPs:

- a) De los dos átomos pesados probados (KI y  $\text{TINO}_3$ ), el único que en nuestras condiciones hemos obtenido señales analíticamente útiles, es decir, detectables, reproducibles y estables ha sido utilizando el KI (ver Figura B.2-1).
- b) En cuanto a las resinas estudiados, se puede concluir que los analitos objeto de estudio no interaccionan de forma significativa con las resinas Gel de Sílica Merck, Amberlita XAD 2 y Amberlita XAD 4 en nuestra metodología de trabajo, pero por lo contrario, sí interaccionan satisfactoriamente con la Gel de Sílica Davisil y Amberlita XAD 7 (ver Figura B.2-2).
- c) Con respecto a los disolventes orgánicos presentes en las muestras, se puede decir, que la presencia de éstos afecta en gran medida a la diferencia señal-ruido. Por tanto, los seis disolventes orgánicos miscibles con agua (etanol, metanol, acetona, acetonitrilo y 1,4-dioxano) deben ser evaluados en la caracterización fosforescente de los 15 HAPs en superficie sólida.



**Figura B.2-1. Diagramas obtenidos utilizando como átomo pesado  $TiNO_3$ . (a) Amberlita XAD 7, FLT; (b) Amberlita XAD 4, BbF; (c) Gel de Silica Davisil, BbF; (d) Gel de Silica Merk, BkF.**



**Figura B.2-2. Respuestas del BbF utilizando como átomo pesado KI con distintas resinas. (a) Amberlita XAD 2, (b) Amberlita XAD 4, (c) Amberlita XAD 7, (d) Gel de Silica Merk, (e) Gel de Silica Davisil.**

#### 1.4. Características espectroscópicas en fase sólida

Con objeto de comprobar que las longitudes de onda de trabajo eran las adecuadas, se registraron los espectros de excitación y emisión al pasar 4 mL de una disolución de 600 ng/mL de FLT, BkF, BbF y BaP con KI 3 M, Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> 0.01 M y un 30% v/v de acetonitrilo, usando como fase sensora la Amberlita XAD 7 a un tamaño de partícula de 80-120 μm. Restándole la contribución de la resina se obtienen los espectros de emisión en fase sólida de los HAPs. Los resultados obtenidos para los HAPs se muestran en la Tabla B.2-3 y algunos espectros a modo de ejemplo se muestran en la Figura B.2-3.

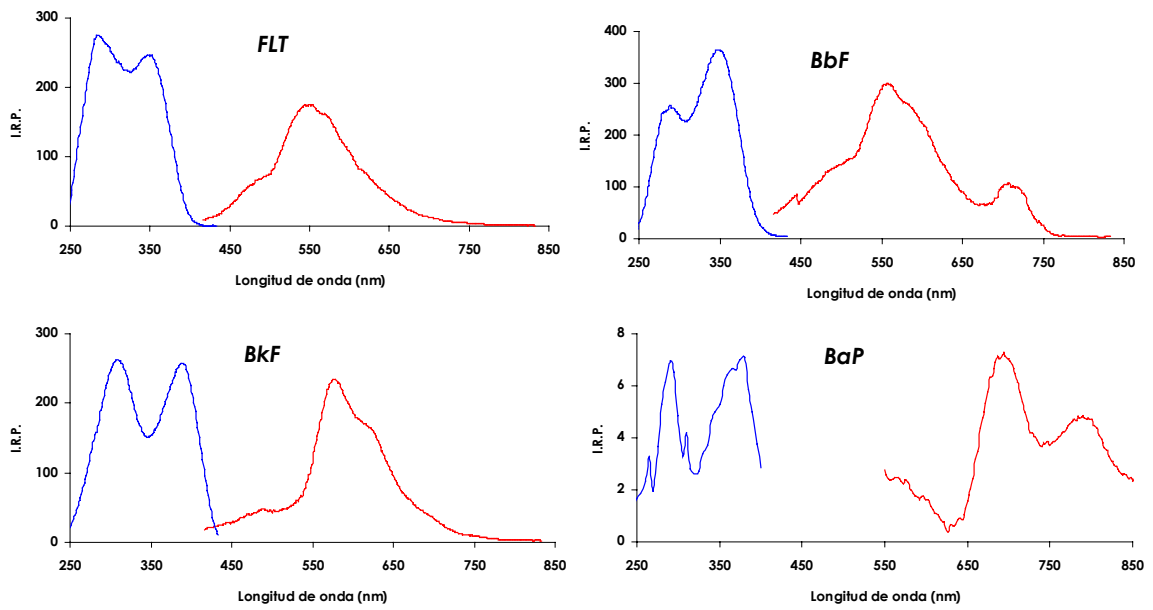


Figura B.2-3. Espectros de excitación (—) y emisión (—) de HAPs soportados en Anberlita XAD7.

Del mismo modo y una vez que hemos realizado los espectros, a esas longitudes de onda de trabajo se calculo el tiempo de vida de los HAPs soportados en nuestra resina. Los resultados se muestran en la Tabla B.2-3. Podemos observar como solo hemos podido calcular los de aquellos HAPs que poseen altos tiempos de vida, ya que en el caso de que los tiempos de vida media sean muy bajos se solapan con la propia señal de nuestra resina, no siendo capaces de diferenciarlos. Podemos observar en la Figura B.2-2 algunos de las curvas de decaimiento de los analitos estudiados.

Tabla B.2-3. Características espectroscópicas de los 15 HAPs

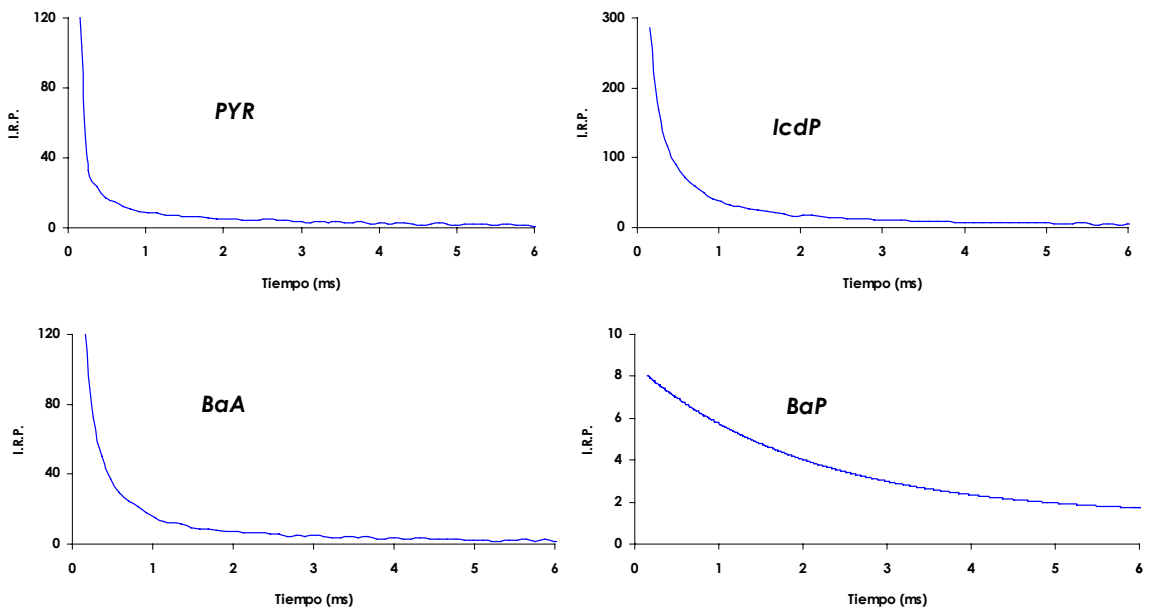



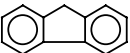
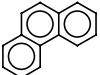
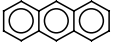
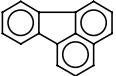

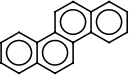
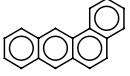
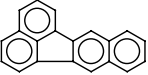
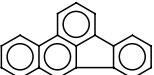
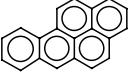
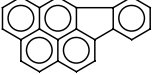



Figura B.2-4. Curvas de decaimiento de HAPs soportados en Anberlita XAD7.



Tabla B.2-3. Características espectroscópicas de los 15 HAPs

Nombre y abreviaciones	Estructura	Longitud de onda excitación/emisión (nm)	Tiempo de vida media ( $\mu$ s)
Naphthalene (NAPH)		285/515	-
Acenaphthylene (ACEN)		290/530	-
Acenaphthene (ACE)		290/525	-
Fluorene (FLU)		290/455	-
Phenanthrene (PHE)		285/505	-
Anthracene (ANT)		355/680	-
Fluoranthene (FLT)		280/555	-
Pyrene (PYR)		330/593	2666
Chrysene (CHRY)		275/515	-
Benzo(a)anthracene (BaA)		280/605	1430
Benzo(k)fluoranthene (BkF)		300/570	-
Benzo(b)fluoranthene (BbF)		295/555	-
Benzo(a)pyrene (BaP)		390/690	3300
Indeno(1,2,3-cd)pyrene (IcdP)		295/665	1079
Benzo(g,h,i)perylene (BghiP)		295/620	1531

### 1.5. Estudio de la interacción de HAPs con resinas

Establecidos los parámetros instrumentales y variables experimentales se procedió a la caracterización fosforescente en fase sólida de los 15 HAPs de la EPA.

Para ello, se prepararon diferentes disoluciones de 600 ng/mL de los 15 HAPs, añadiendo la cantidad adecuada de cada uno de los disolventes orgánicos (etanol, metanol, acetonitrilo, 1,4-dioxano y acetona) para que se encontraran en un porcentaje final del 30% en volumen, la cantidad adecuada de KI y de Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> para que se encontraran en la concentración de 3 M y 0.01 M respectivamente.

Para llevar a cabo las medidas, se empaquetaron las resinas (Gel de Sílica Davisil y Amberlita XAD 7) en una cubeta de flujo convencional, que se situó en el compartimiento de muestra, registrándose la emisión fosforescente de la resina o ruido de fondo. Posteriormente, se hicieron pasar 4 mL de cada una de las disoluciones de los HAPs preparadas y se registró la emisión fosforescente o señal de los analitos retenidos en la fase sólida. Las medidas luminiscentes tanto del ruido como de la señal se realizaron a las longitudes de onda apropiadas para cada compuesto seleccionado fijando las condiciones instrumentales anteriormente citadas.

En las Figuras B.2-5 y B.2-6 se muestran la interacción analito-fase sensora que se produce entre los 15 HAPs y los soportes sólidos seleccionados en las condiciones experimentales ensayadas con los distintos disolventes.

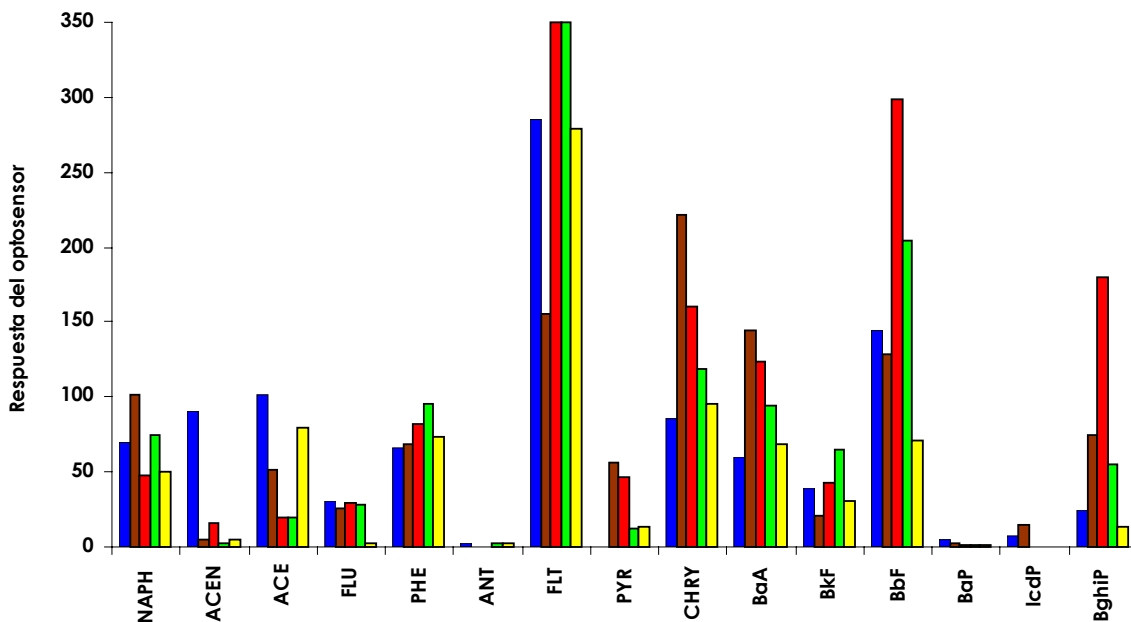


Figura B.2-5. Caracterización fosforescente en fase sólida de los HAPs para la resina Amberlita XAD 7.   
■ etanol, ■ acetonitrilo, ■ acetona, ■ metanol, ■ dioxano).

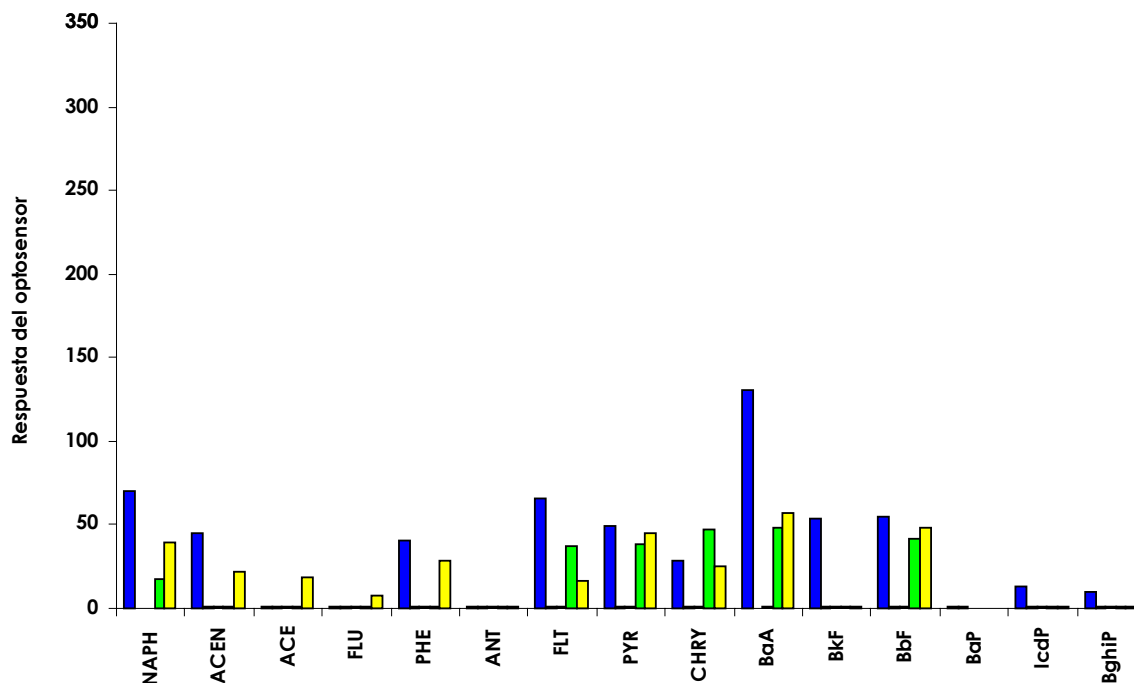


Figura B.2-6. Caracterización fosforescente en fase sólida de los HAPs para la resina Amberlita XAD 7. (■ etanol, ■ acetonitrilo, ■ acetona, ■ metanol, ■ dioxano).

## 2. OPTOSENSOR SELECTIVO PARA LA DETERMINACIÓN DE BENZO(a)PIRENO

El BaP es uno de los HAPs con mayor actividad cancerígena y ha sido elegido por la nueva normativa como uno de los indicadores más importantes de los HAPs en agua. De hay la importancia en su determinación selectiva.

En este caso vamos a comprobar claramente las ventajas que ofrecen los optosensores fosforescentes, en concreto este analito debido a sus  $\lambda_{exc/em}$  y a su tiempo de vida media, podemos conseguir la selectividad frente al resto de HAPs.

## 2.1. Estudios previos

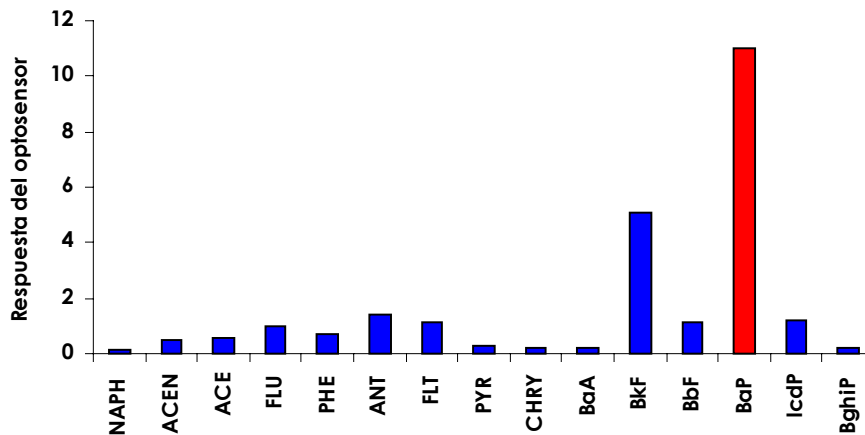
Vamos a recordar toda la información recopilada hasta el momento del BaP (ver Tabla B.2-4).

**Tabla B.2-4. Características instrumentales, experimentales y parámetros de flujo**

	Valores preliminares
Resina	Amberlita XAD 7
$\lambda_{exc/em}$ (nm)	390/690
Disolución regenerante (250 $\mu$ L)	Acetonitrilo
Voltaje del detector (V)	850
Anchura de rendijas $_{exc/em}$ (nm)	20/20
$t_{d/g}$ (ms)	0.1/5.0
[KI] (M)	3
[Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> ] (mM)	10
Disolvente orgánico	30% v/v acetonitrilo
Velocidad de flujo (mL/min.)	0.75
Volumen de inyección de muestra (mL)	4

Y con los datos obtenidos de estos estudios previos, vamos a comprobar verdaderamente que si queremos hacer una determinación selectiva de BaP, debido a sus características espectroscópicas evitamos la interferencia del resto de HAPs, para ello en las condiciones de la Tabla B.2-4 se preparan disoluciones de los 15 HAPs en relación 1:1 con el BaP.

Los resultados se muestran en la Figura B.2-7, y podemos observar como verdaderamente las características espectroscópicas del BaP hacen posible que se pueda desarrollar un optosensor fosforescente selectivo.



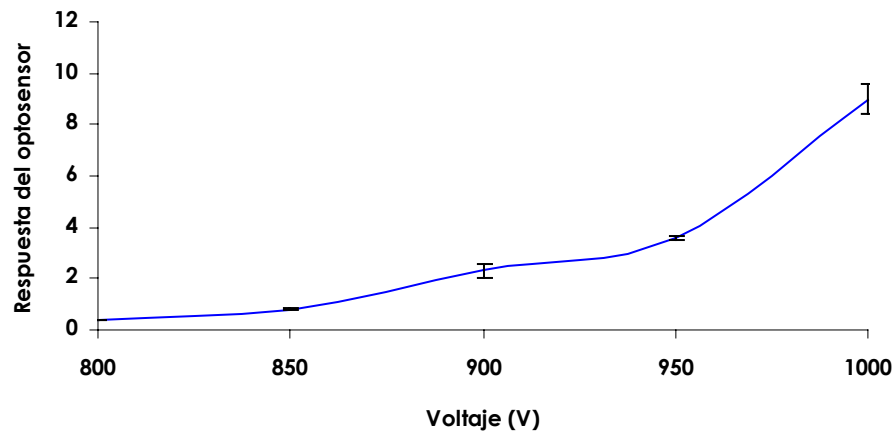
**Figura B.2-7. Estudios previos de la interferencia de los HAPs en la respuesta del optosensor fosforescente de BaP. [HAP] = 500 ng/mL.**

## 2.2. Selección de los parámetros instrumentales

Seleccionados la fase sensora, las longitudes de onda de trabajo y la disolución regenerante se procedió a estudiar los parámetros instrumentales para mejorar las señales analíticas.

### 2.2.1. Voltaje del detector

Para optimizar este parámetro, se prepararon muestras individuales de concentración de 100 ng/mL de BaP con 3 M KI y 0.01 M de  $\text{Na}_2\text{SO}_3$ , en una portadora con las mismas concentraciones de átomo pesado y desoxigenante y se midió cómo variaba la respuesta de los optosensores usando:  $\lambda_{\text{exc/em}} = 390/690$  nm, ancho de rendijas<sub>exc/em</sub> de 20/20 nm, valores de  $t_{d/g}$  de 0.1/5.0 ms, velocidad de flujo 0.75 mL/min, volumen de muestra 4 mL y de disolución regenerante 250  $\mu\text{L}$ . Los resultados obtenidos se exponen en la Figura B.2-8.



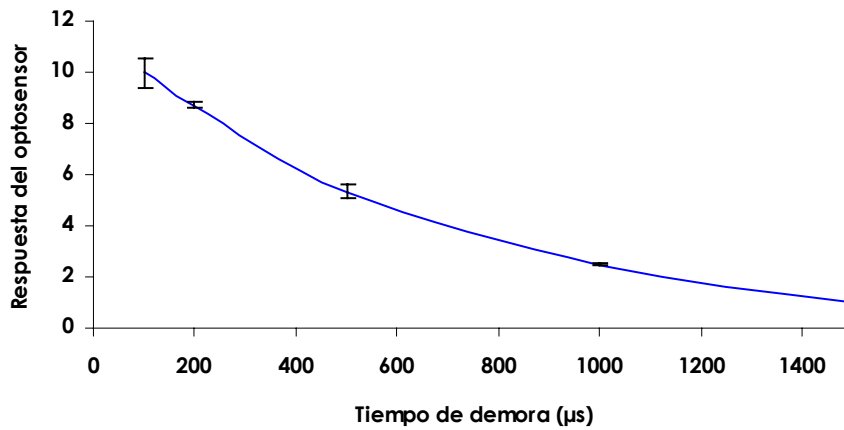
**Figura B.2-8. Influencia del voltaje del detector en la respuesta del optosensor para el BaP.**

Se observa claramente que la respuesta del optosensor aumenta al incrementar el voltaje del detector, se eligió 1000 V como valor óptimo para ambos analitos ya que la señal obtenida es adecuada y con un error aceptable.

### 2.2.2. Tiempo de demora e integración

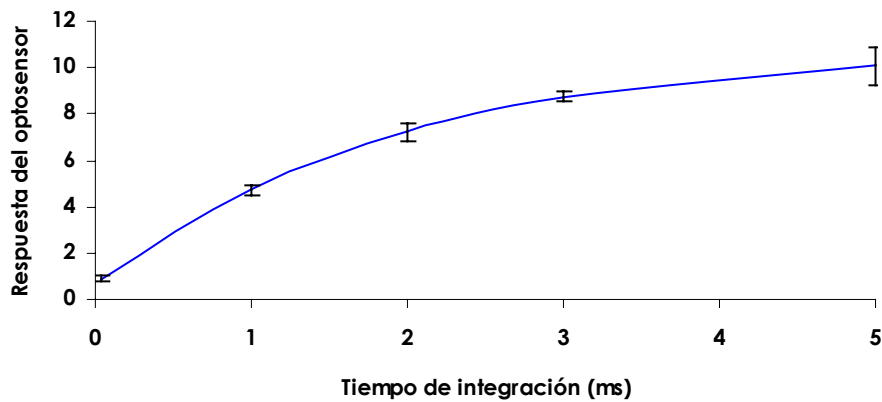
La Figura B.2-9 muestra cómo varía la respuesta de los optosensores cuando se inyectaron tres réplicas del analito a una concentración de 100 ng/mL, con un tiempo de integración de 5 ms, variando el tiempo de demora entre 100  $\mu$ s y 5 ms.

Un aumento de  $t_d$  lleva consigo una disminución considerable de la respuesta del optosensor. Se eligió 100  $\mu$ s al dar la máxima intensidad de fosforescencia con un error aceptable.



**Figura B.2-9. Influencia del tiempo de demora en la respuesta del optosensor para el BaP.**

A continuación, una vez fijado el  $t_d$  en 100  $\mu\text{s}$ , en las mismas condiciones anteriores se realizó el estudio de la influencia del  $t_g$  de la señal, variando este entre 40  $\mu\text{s}$  y 5 ms. La respuesta del optosensor propuestos se muestran en la Figura B.2-10.



**Figura B.2-10. Influencia del tiempo de integración en la respuesta del optosensor del BaP.**

Podemos observar como un aumento del  $t_g$  implica un aumento de la respuesta del optosensor. Por tanto se eligió 5 ms para el resto del trabajo pues la respuesta del optosensor es máxima a este valor.

### 2.2.3. Ancho de rendijas

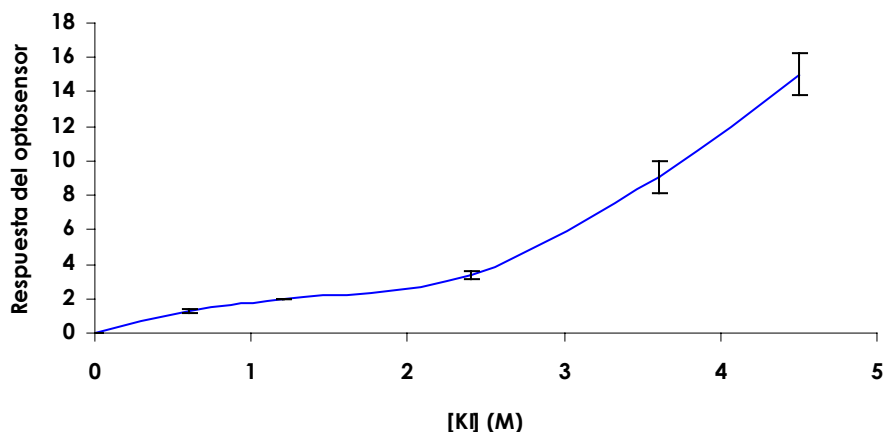
Para estudiar el efecto de la anchura de las rendijas sobre la respuesta del optosensor se inyectó en el sistema de flujo una muestra de 100 ng/mL de BaP con 3 M en KI y 0.01 M en  $\text{Na}_2\text{SO}_3$ , en una portadora con las mismas concentraciones de átomo pesado y desoxigenante y se midió cómo variaba la respuesta del optosensor al variar el ancho de rendijas  $S_{exc/em}$  usando:  $\lambda_{exc/em}$  390/690 nm, voltaje del detector 1000 V,  $t_{d/g}$  0.1/5.0 ms, velocidad de flujo 0.75 mL/min, volumen de muestra de 4 mL y de disolución regenerante de 250  $\mu\text{L}$ .

Se realizaron las 9 combinaciones de anchuras posibles y tres réplicas para cada combinación. Se pudo observar, el aumento de la anchura de las rendijas produce un aumento en la emisión fosforescente junto con el error asociado, observándose la mayor señal analítica con la mayor apertura de ambas rendijas que fue de 20/20 nm.

## 2.3. Selección de las variables experimentales

### 2.3.1. Tipo y concentración de átomo pesado

Se optimizó la concentración de KI, preparando diferentes muestras de BaP y portadoras de concentración de  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  de 0.01 M y concentraciones variables de KI. Las condiciones instrumentales fueron las optimizadas anteriormente. En la Figura B.2-11 se refleja la influencia de esta concentración en la respuesta del optosensor.



**Figura B.2-11. Influencia de la concentración de KI en la respuesta del optosensor para el BaP.**



En primer lugar destacar que no se obtiene señal fosforescente en ausencia de átomo pesado y que un aumento de la concentración de KI provoca un aumento de la respuesta del optosensor. Se seleccionó una concentración de 4 M, por dar una señal analítica alta y un error aceptable para el método propuesto.

### 2.3.2. Concentración de sulfito sódico

Se estudió la influencia de este agente desoxigenante variando la concentración de sulfito sódico tanto en la muestra como en la portadora. La Figura B.2-12 refleja tal influencia, observando que no se produce emisión fosforescente en ausencia de sulfito sódico y que un aumento de la concentración de  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  provoca un aumento de la respuesta del optosensor pero si podemos observar como el tiempo de respuesta del optosensor disminuye conforme seguimos aumentando la concentración de  $\text{Na}_2\text{SO}_3$ , manteniéndose constante a partir de una concentración de 15 mM. Por tanto, para asegurar que tanto la muestra como la disolución portadora permanecen desoxigenadas, incluso después de varias horas tras su preparación, se seleccionó una concentración de 20 mM.

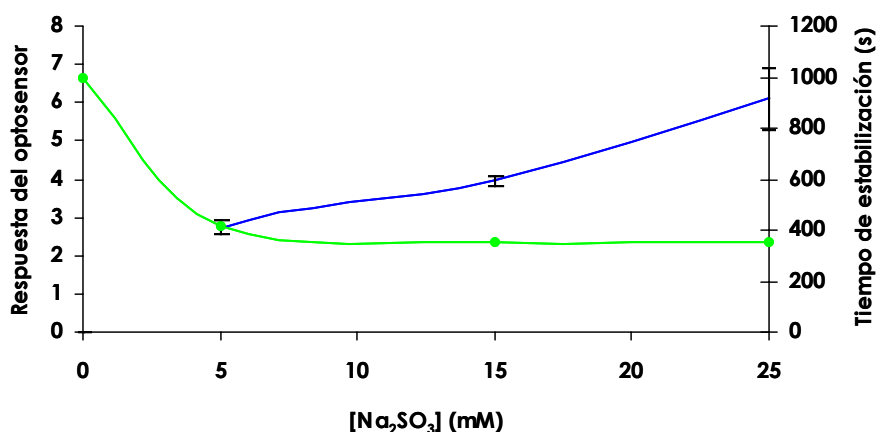
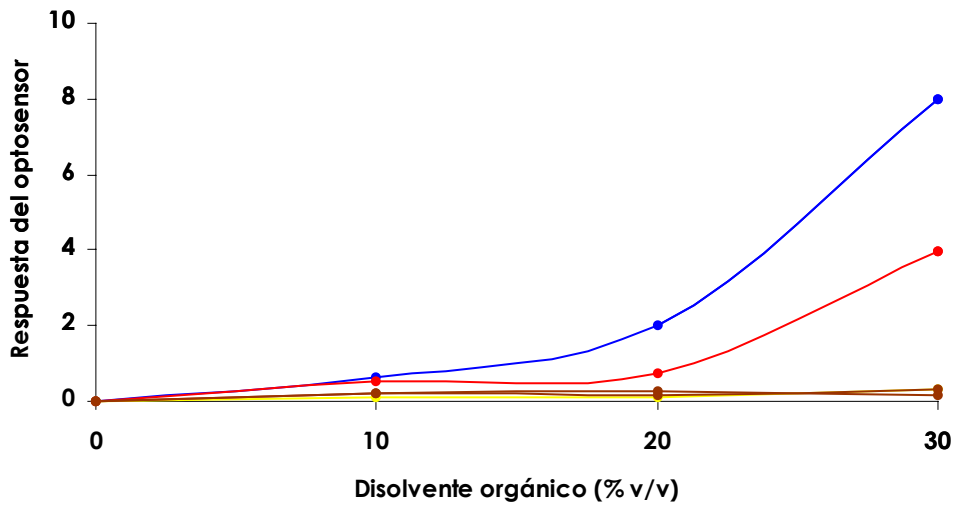


Figura B.2-12. Influencia de la concentración de  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  en la respuesta del optosensor del BaP (—) y en el tiempo de estabilización (—).

### 2.3.3. Disolventes orgánicos

Para ampliar el estudio realizado en el Capítulo anterior, se ha realizado el estudio de la adición de distintos disolventes orgánicos miscibles con agua, midiendo en las condiciones optimizadas hasta ahora la respuesta del optosensor en presencia de diferentes porcentajes de disolvente (ver Figura B.2-13).



**Figura B.2-13. Efecto de disolventes orgánicos sobre la señal de fosforescencia para el BaP. Etanol (—), metanol (—) acetonitrilo (—), dioxano (—) y acetona (—).**

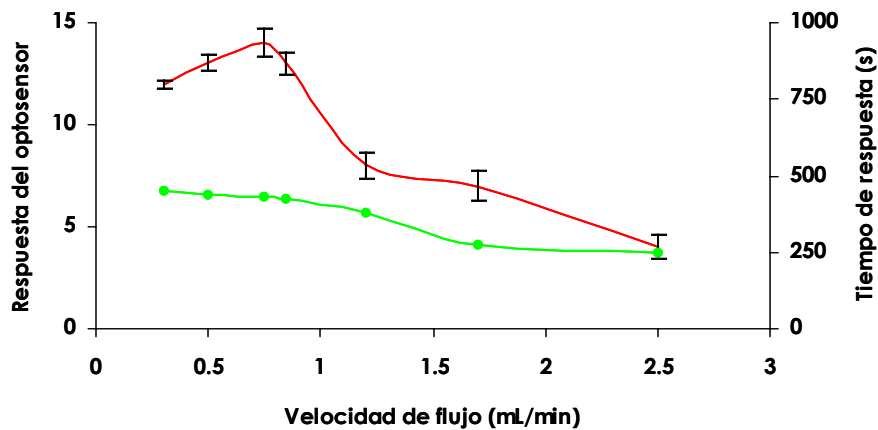
Podemos observar como la presencia de etanol, metanol y acetona hace que no obtengamos ninguna respuesta del optosensor, sin embargo la presencia de acetonitrilo o dioxano en porcentajes superiores al 20% v/v hacen que la respuesta del optosensor aumente considerablemente. Obteniendo los mejores resultados con la adición de un 30% v/v de acetonitrilo a nuestra muestra.

### 2.4. Variables de flujo

Optimizados los parámetros instrumentales y las variables experimentales se procedió a la selección de las dos variables de flujo que afectan tanto a la sensibilidad del método como al tiempo de respuesta.

### 2.4.1. Velocidad de flujo

De esta forma, para estudiar la influencia de esta variable se realizaron variaciones en la velocidad de la bomba peristáltica manteniendo constante el diámetro del tubo. Fueron inyectadas tres réplicas sucesivas para cada valor de flujo y se midió la respuesta de los optosensores y el tiempo de respuesta de cada uno de ellos (ver Figura B.2-14). Como era de esperar, un aumento de la velocidad de flujo provoca una disminución de la respuesta del optosensor y a la vez una disminución del tiempo de respuesta del mismo. Se eligió 0.75 mL/min como valor de compromiso entre tiempo de respuesta y señal obtenida.

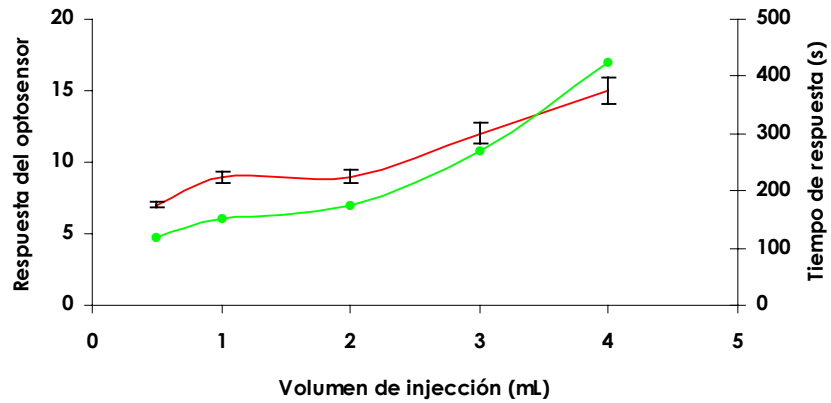


**Figura B.2-14.** Influencia de la velocidad de flujo en la respuesta del optosensor para el BaP (—) y en el tiempo de estabilización (—).

### 2.4.2. Volumen de muestra

El volumen de muestra que se inyecta en el sistema va a condicionar la sensibilidad del optosensor y el tiempo de respuesta. Para estudiar la influencia de esta variable se dispusieron diferentes volúmenes en el bucle de la válvula de inyección de la muestra y se registraron tres réplicas para cada volumen estudiado. Volúmenes mayores de 4 mL no se pudieron ensayar por problemas de sobrepresión. Los resultados se muestran en la Figura B.2-15, podemos ver como un aumento del volumen de muestra, como era de esperar, provoca un aumento de la respuesta del optosensor y al mismo tiempo un aumento del tiempo de respuesta del mismo. Pero debido a que los incrementos en el error y en el tiempo de respuesta no eran muy

acusados, se seleccionó el mayor volumen de inyección posible para así conseguir la mayor diferencia señal-ruido y obtener un menor límite de detección.



**Figura B.2-15. Influencia del volumen de inyección de muestra en la respuesta del optosensor del BaP (—) y en el tiempo de estabilización (—).**

## 2.5. Selectividad del optosensor propuesto

El optosensor desarrollado se pretende aplicar al análisis de aguas de consumo humano. Por tanto, el resto de HAPs que puedan estar presentes en las aguas y que puedan interferir en la medida de la concentración del BaP deben de ser evaluados, al igual que un gran número de iones comunes en agua.

Para llevar a cabo el estudio de la interferencia de los HAPs, se prepararon disoluciones de 100 ng/mL de BaP y se les adicionó diferentes cantidades de los distintos HAPs. El estudio sistemático se comenzó estudiando las relaciones 1:150 y si se producía interferencia de la especie se disminuía la relación progresivamente hasta que ésta cesara. En la Tabla B.2-5 se muestran los resultados obtenidos.

Tabla B.2-5. Efecto de aniones, cationes y HAPs en la determinación de 100 ng/mL de BaP

		Valores usuales en agua (mg/L) [18]	Nivel de tolerancia (ng/mL)*	Relación
Aniones	Cl <sup>-</sup>	8.0	>150× 10 <sup>-3</sup>	1:10 <sup>9</sup>
	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	24.0	>150× 10 <sup>-3</sup>	1:10 <sup>9</sup>
	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	2.4	>150× 10 <sup>-3</sup>	1:10 <sup>9</sup>
	HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	185.0	>1500× 10 <sup>-3</sup>	1:10 <sup>10</sup>
Cationes	Na <sup>+</sup>	< 2	>150× 10 <sup>-3</sup>	1:10 <sup>9</sup>
	K <sup>+</sup>	< 2	>150× 10 <sup>-3</sup>	1:10 <sup>9</sup>
	Ca <sup>2+</sup>	40	>150× 10 <sup>-3</sup>	1:10 <sup>9</sup>
	Mg <sup>2+</sup>	16	>150× 10 <sup>-3</sup>	1:10 <sup>9</sup>
HAPs	NAPH	-	>15 × 10 <sup>-3</sup>	1:150
	ACEN	-	>10 × 10 <sup>-3</sup>	1:100
	ACE	-	>15 × 10 <sup>-3</sup>	1:150
	FLU	-	>15 × 10 <sup>-3</sup>	1:150
	PHE	-	>15 × 10 <sup>-3</sup>	1:150
	ANT	-	>10 × 10 <sup>-3</sup>	1:100
	FLT	-	>2 × 10 <sup>-3</sup>	1:20
	PYR	-	>15 × 10 <sup>-3</sup>	1:150
	CHRY	-	>10 × 10 <sup>-3</sup>	1:100
	BaA	-	>10 × 10 <sup>-3</sup>	1:100
	BkF	-	>2 × 10 <sup>-3</sup>	1:20
	BbF	-	>10 × 10 <sup>-3</sup>	1:100
	IcdP	-	>10 × 10 <sup>-3</sup>	1:100
	BghiP	-	>2 × 10 <sup>-3</sup>	1:20

\* un error del 5% fue usado para establecer los niveles de tolerancia.

Como se puede deducir de este estudio, la presencia de altas concentraciones de inones o cationes no interfieren en nuestra determinación, sin embargo otros HAPs interfieren si lo hacen en diferentes relaciones. Si bien, este dato por exceso aporta información de altas concentraciones de otros HAPs, que aun no teniendo un elevado poder cancerígeno, a esas concentraciones son potentes contaminantes en las aguas.

## 2.6. Características analíticas del método

Una vez establecidas las condiciones experimentales óptimas y las condiciones de medida para la determinación conjunta, se procedió al establecimiento del método analítico. En este apartado se ha establecido el procedimiento operatorio, las rectas de calibrado para cada uno de los pares de longitudes de onda previamente seleccionados y los parámetros de fiabilidad de cada una de las curvas, cuyo estudio se llevó a cabo mediante el protocolo del modelo de regresión lineal de la IUPAC.

### 2.6.1. Procedimiento operatorio

La fase sensora seleccionada (Amberlita XAD 7 particulada a 80-120  $\mu\text{m}$ ) se empaquetó en la cubeta de flujo convencional. Se preparó una disolución portadora conteniendo 4 M de KI y 0.02 M de  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  y varias disoluciones de concentraciones crecientes de BaP en las condiciones experimentales óptimas (4 M KI, 0.02 M  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  y 30% v/v de acetonitrilo). Se ajustó la velocidad de flujo de la bomba peristáltica a 0.75 mL/min y se acondicionó la fase sensora dejando pasar la disolución portadora durante 5 min. Se fijaron las condiciones instrumentales en el equipo y se registró la señal analítica que se producía en la celda de flujo después de la inyección.

### 2.6.2. Recta de calibrado

Se establecieron las rectas de calibrado para cada una de las zonas de medida seleccionadas variando la concentración del analito o mezclas de ellos, realizando tres réplicas para cada nivel de concentración.

Los datos estadísticos de esta recta de calibrado se pueden observar en la Tabla B.2-6 y en la Figura B.2-16 se muestra la influencia de la concentración sobre la respuesta del optosensor en los pares de longitudes de onda de medida.

Tabla B.2-6. Parámetros estadísticos de la recta

Parámetro analítico	Valor estimado
Ordenada en el origen (a)	-2.916
Pendiente (b)	0.153
Coefficiente de correlación (r)	0.995
Coefficiente de determinación (r <sup>2</sup> ) (%)	99.0

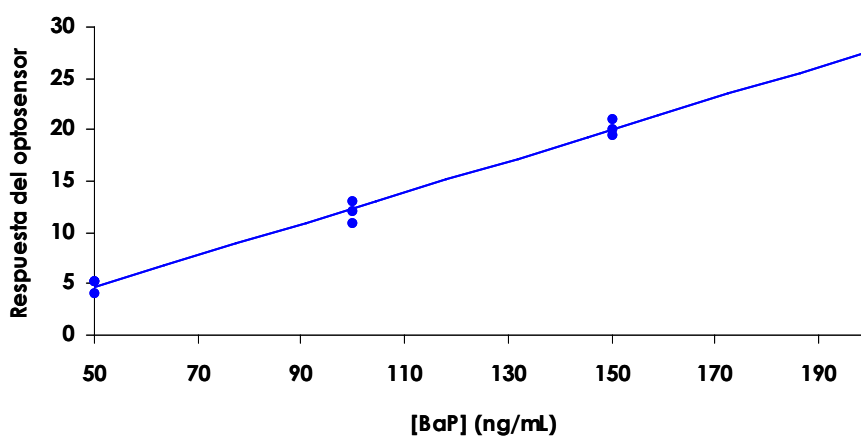


Figura B.2-16. Recta de calibrado del optosensor de BaP.

### 2.6.3. Parámetros de fiabilidad

Para calcular el límite de detección (L.D.) y el límite de cuantificación (L.C.) según el criterio IUPAC, se calculó la desviación estándar de un blanco ( $s_0$ ), para ello se registró la desviación estándar de la línea base del optosensor y a partir de ella se calculó el L.D. y el L.C. La Tabla B.2-7 muestran los resultados obtenidos.

Tabla B.2-7. Parámetros analíticos del optosensor propuesto

Parámetro analítico	Valor estimado	
Intervalo dinámico lineal (ng/mL)	11.7-200	
Límite de detección (ng/mL)	11.7	
Límite de cuantificación (ng/mL)	39.1	
D.E.R. (%)	50 ng/mL	4.6
	100 ng/mL	3.3
	150 ng/mL	4.1
	200 ng/mL	3.9

## 2.7. Aplicaciones del método propuesto al análisis de muestras reales

Para comprobar la exactitud del método propuesto se ha realizado un estudio de recuperación. Dicho estudio se llevó a cabo para distintas mezclas aleatorias de los dos compuestos en estudio, siempre con valores que están dentro del intervalo lineal del método propuesto.

El procedimiento operatorio seguido fue: se tomaron 2 muestras diferentes de agua (agua superficial de consumo humano y agua mineral embotellada), se enriquecieron a distintos niveles de concentración de los analitos en estudio (véase Tabla B.1-4). Se tomó la cantidad adecuada de disolución de átomo pesado y de sulfito sódico para conseguir una concentración final de 4 M de KI y 0.02 M de Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> y se enrasó con las muestras de agua a analizar.

Se realizaron tres réplicas para cada una de las muestras analizadas a cada nivel de concentración llevando a cabo el registro de la intensidad de fosforescencia a las condiciones instrumentales óptimas de cada una de las zonas de medida seleccionadas anteriormente, con una velocidad de flujo de 0.75 mL/min, inyectando 4 mL de muestra. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla B.2-8.



Table B.2-8. Estudios de recuperación en muestras de agua

	Valor añadido (ng/mL)	Valor encontrado (ng/mL)	Porcentaje de recuperación (%) (D.E.R. %)
<b>Agua 1</b>	400	390	97.5 (2.5)
<b>Agua 2</b>	400	287	95.6 (4.2)
<b>Agua 3</b>	100	88	88.0 (3.5)
<b>Mineral 1</b>	400	387	96.7 (2.8)
<b>Mineral 2</b>	200	195	97.5 (1.9)
<b>Mineral 3</b>	100	92	92.0 (3.7)

Se podría concluir de estos resultados que el optosensor propuesto puede usarse de forma simple, selectiva y sensible para la determinación de BaP en muestras de agua.



## **CAPÍTULO B.3**

### **Desarrollo de nuevas fases sensoras mediante la técnica de impresión molecular para la determinación de hidrocarburos aromáticos policíclicos**

El trabajo derivado del presente Capítulo ha sido publicado en la revista "Chemical Communication (aceptado con revisión)" (ver ANEXO VIII).



## CAPÍTULO B.3

### DESARROLLO DE NUEVAS FASES SENSORAS MEDIANTE LA TÉCNICA DE IMPRESIÓN MOLECULAR PARA LA DETERMINACIÓN DE HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS

<b>1. DE RESINAS COMERCIALES AL DISEÑO DE POLÍMEROS</b> .....	<b>309</b>
<b>2. ELECCIÓN DE COMPONENTES DE POLÍMEROS IMPRESOS MOLECULARES</b> .....	<b>309</b>
<b>3. SÍNTESIS DE POLÍMEROS IMPRESOS MOLECULARES</b> .....	<b>313</b>
<b>4. EVALUACIÓN DE LOS POLÍMEROS IMPRESOS FABRICADOS</b> .....	<b>315</b>
4.1. Diseño del sistema de flujo .....	315
4.2. Extracción de la molécula molde .....	316
4.3. Capacidad de reconocimiento.....	319
4.4. Selectividad del MIP .....	320
4.5. Características analíticas del método .....	321
4.6.1. Procedimiento operatorio .....	321
4.6.2. Recta de calibrado .....	321
4.6.2. Parámetros de fiabilidad .....	322



## 1. DE RESINAS COMERCIALES AL DISEÑO DE POLÍMEROS

En el Capítulo B.2 de la presente Memoria se ha puesto de manifiesto el potencial que ofrece la utilización de resinas comerciales como fases sensoras en el desarrollo de optosensores fosforescentes de HAPs, pero del mismo modo se han visto las dificultades que ofrecen las resinas comerciales a la hora de conseguir selectividad con esta familia de analitos. Para intentar solventar este tipo de problemas en este último Capítulo, lo que se ha pretendido es abarcar aplicar la tecnología de la impresión molecular ("molecularly imprinted polymers" MIPs) para el desarrollo de nuevas fases sensoras más selectivas y sensibles para el desarrollo de optosensores fosforescentes, con la intención de acoplar todas las ventajas que ofrecen los polímeros de impresión molecular (selectividad y sensibilidad) junto con todas las que ofrece el utilizar la emisión. Es de destacar que en bibliografía no existe ninguna referencia hasta la actualidad de optosensores fosforescentes basados en la utilización de MIPs.

En concreto en este último Capítulo de la presente Memoria se ha pretendido desarrollar una fase sensora implementable en optosensores fosforescentes para la determinación selectiva de uno de los HAPs considerados en la lista de contaminantes prioritaria de la Comunidad Europea [1] como es el fluoranteno (FLT).

## 2. ELECCIÓN DE COMPONENTES DE POLÍMEROS IMPRESOS MOLECULARES

Para la preparación de los polímeros impresos se ha seguido la línea de trabajo reseñada en las publicaciones del Grupo de Investigación de Dickert y col. [2-4] en las que ha utilizado MIPs de poliuretanos para el desarrollo de sensores másicos del tipo Onda Acústica de Superficie o Micro Balanza de Cuarzo integrados en sistemas de flujo, obteniendo límites de detección de hasta 2 µg/L para criseno y perileno. Del mismo modo, utilizando estos mismos MIPs ha desarrollado un sensor fluorescente acoplado a sistema de flujo con el que ha obtenido límites detección de hasta 30 ng/mL para acenafteno.

- 
1. Official Journal of European Communities, 15.12.2001. L331.
  2. F.L. Dickert, O. Hayden. *Trac Trends Anal. Chem.*, 18 (1999) 192.
  3. F.L. Dickert, M. Tortschanoff, W.E. Bulst, G. Fischerauer. *Anal. Chem.*, 71 (1999) 4559.
  4. F.L. Dickert, P. Achatz, K. Halikias. *Fresenius J. Anal. Chem.*, 371 (2001) 11.

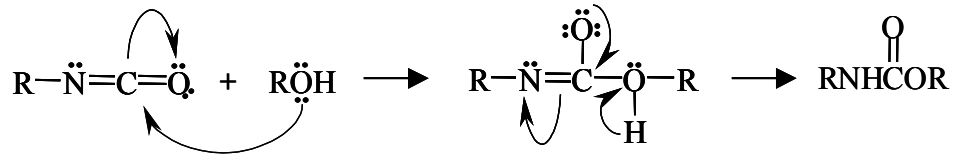
Los poliuretanos, llamados así porque en su cadena principal contienen enlaces uretano, es decir que tienen un grupo funcional que es simultáneamente un éster y una amida:



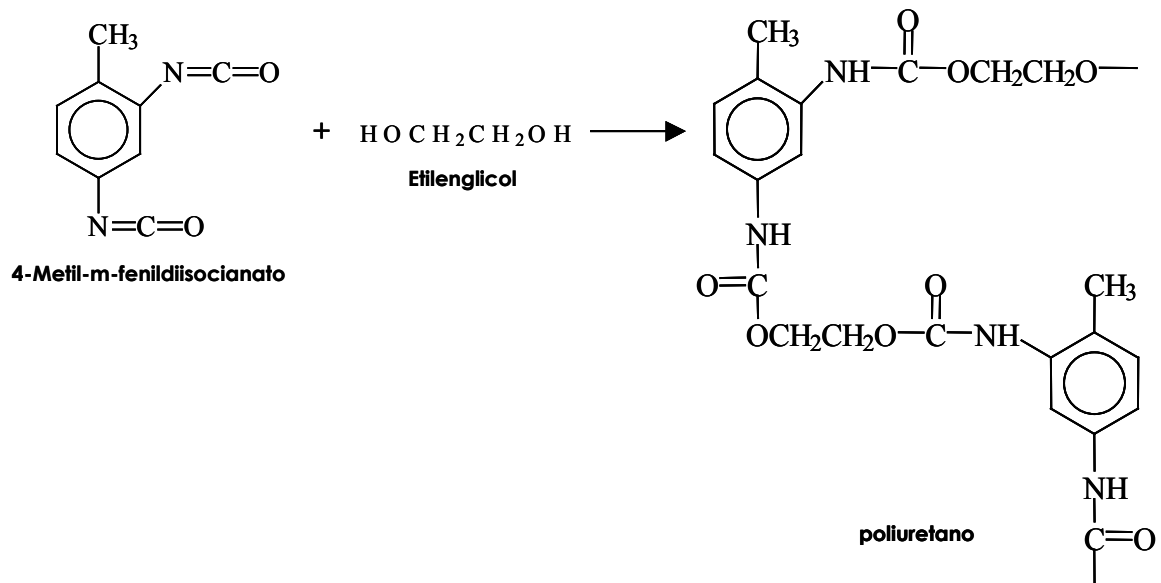
y que se suelen obtener a partir de la reacción entre un grupo isocianato y un grupo alcohol:



La reacción es un ejemplo claro de una reacción de adición nucleofílica al carbonilo:



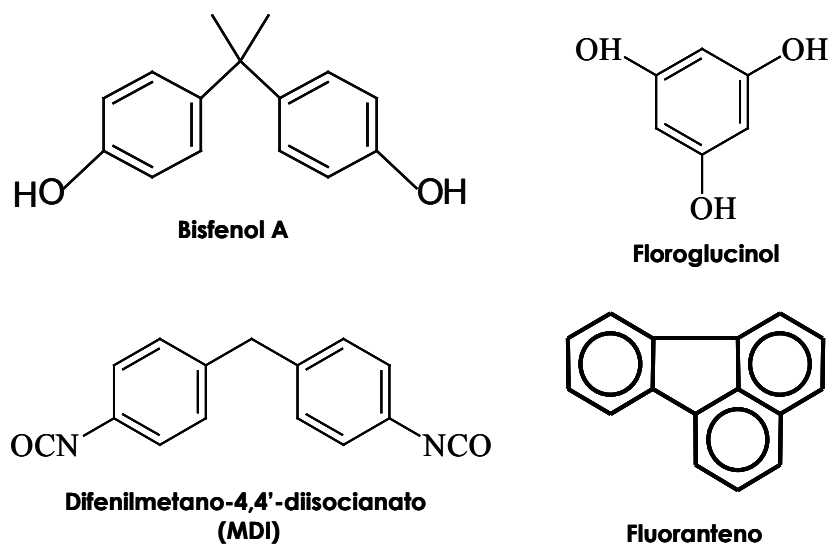
Por tanto los poliuretanos se obtienen a partir de diisocianatos y dioles:





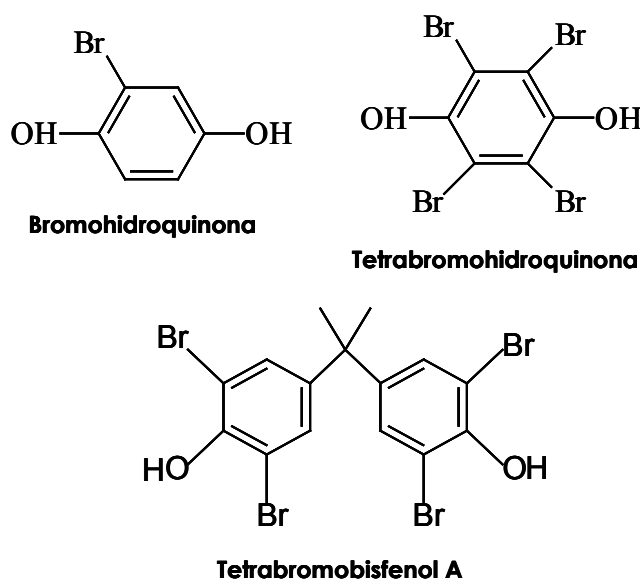
Los componentes fundamentales para la preparación de MIPs son: los monómeros funcionales, los cuales en nuestro caso producen la reacción de formación del poliuretano, el entrecruzador que hace que se produzca un entramado en el polímero, este debe de tener un alto grado de entrecruzamiento ya que es necesario para asegurar la especificidad del polímero y por último el disolvente que juega un papel muy importante en la preparación del polímero ya que gobierna la fuerza de las interacciones no covalentes e influye en la morfología del polímero (tamaño y distribución de poros) y además debe de disolver a todos los componentes del polímero. Y no podemos olvidar como más importante la inclusión en el MIP la molécula molde, que de forma general suele el propio analito en estudio o un compuesto de estructura muy parecida.

De forma general se ha utilizado para la obtención de MIPs el bisfenol A como monómero diol, difenilmetano 4,4' diisocianato (MDI) como monómero isocianato, como entrecruzador el floroglucinol y como disolvente se utilizo el tetrahidrofurano (THF) y por último en nuestro caso hemos escogido como molécula molde el propio analito en estudio, el FLT. En la Figura B.3-1 podemos observar las estructuras de estos compuestos.



**Figure B.3-1. Estructura de los monómeros, entrecruzador y molde utilizados para la preparación de los MIPs.**

Debido a que la finalidad es la obtención de una fase sensora para el futuro desarrollo de sensores fosforescentes, y conocida la necesidad de un átomo pesado cerca de nuestro analito, se pensó para mejorar los sistemas anteriormente estudiados, en la inclusión dentro del MIPs del átomo pesado (Br, I, Tl) para favorecer el cruce entre sistemas, para ello en primer lugar se realizó la búsqueda de monómeros conteniendo átomos pesados internos, encontrando que comercialmente se dispone de la bromohidroquinona, tetrabromohidroquinona y el tetrabromobisfenol A (ver Figura B.3-2).

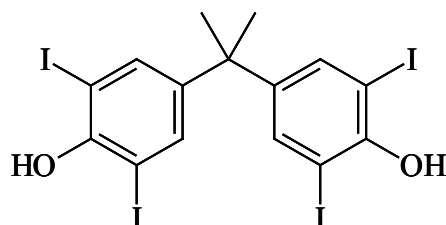


**Figure B.3-2. Estructura de los monómeros comerciales bromados.**

En segundo lugar, pensando que hasta ahora los mejores resultados se obtenían utilizando como átomo pesado externo el I, se realizó una colaboración con el Grupo del Catedrático José Barluenga del Departamento de Química Orgánica de la Universidad de Oviedo para llevar a cabo la yodación del bisfenol A para la obtención del Tetraidodobisfenol A (ver estructura en Figura B.3-3).

El Proceso de iodación del bisfenol A fue el siguiente: el Bisfenol A (5 gr.) es suspendido en 200 mL de diclorometano, el agente de iodación la  $\text{IPy}_2\text{BF}_4$  (33.48 gr.) es añadido a la mezcla y se deja agitando durante toda la noche. Al día siguiente agua destilada y HCl (1%) es añadido para asegurarnos de que la disolución esta a pH ácido. Posteriormente se separa la fase orgánica y es lavada con agua (3 x 100 mL), tiosulfato (5%, 100mL), nuevamente con agua (2 x 100 mL) y posteriormente es secado con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  para eliminar todo posible resto de agua. Por último la disolución se lleva al

rotavapor y el sólido recuperado se lava con éter (2 x 10 mL), obteniendo el tetraiodobisfenol A puro en un 85 % aproximadamente. Se confirmó la estructura resultante mediante datos espectroscópicos de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ .



**Tetraiodobisfenol A**

*Figure B.3-3. Estructura del tetraiodobisfenol A.*

### 3. SÍNTESIS DE LOS POLÍMEROS IMPRESOS

El proceso de síntesis el cual puede observarse completo en la Figura B.3-4 consistió en disolver el peso correspondiente de molécula molde en el volumen de disolvente y añadir a la disolución los monómeros y el entrecruzador. La mezcla es agitada hasta disolver completamente todos los componentes y en viales de un volumen aproximado de 10 mL es conservada en oscuridad durante 4 días hasta la total evaporación del disolvente. Posteriormente los bloques de polímero obtenidos se muelen y se tamizan, utilizándose para los estudios posteriores las partículas de tamaño comprendidas entre 80-160  $\mu\text{m}$ , adecuadas para lograr un empaquetamiento efectivo en la celda de flujo sin generar grandes presiones. Las fases sensoras así obtenidas fueron lavadas en un primer paso con acetonitrilo (3 x 5 mL) y llevados a sequedad en una temperatura de 30-35  $^{\circ}\text{C}$ , por último fueron almacenados en oscuridad hasta su posterior uso.

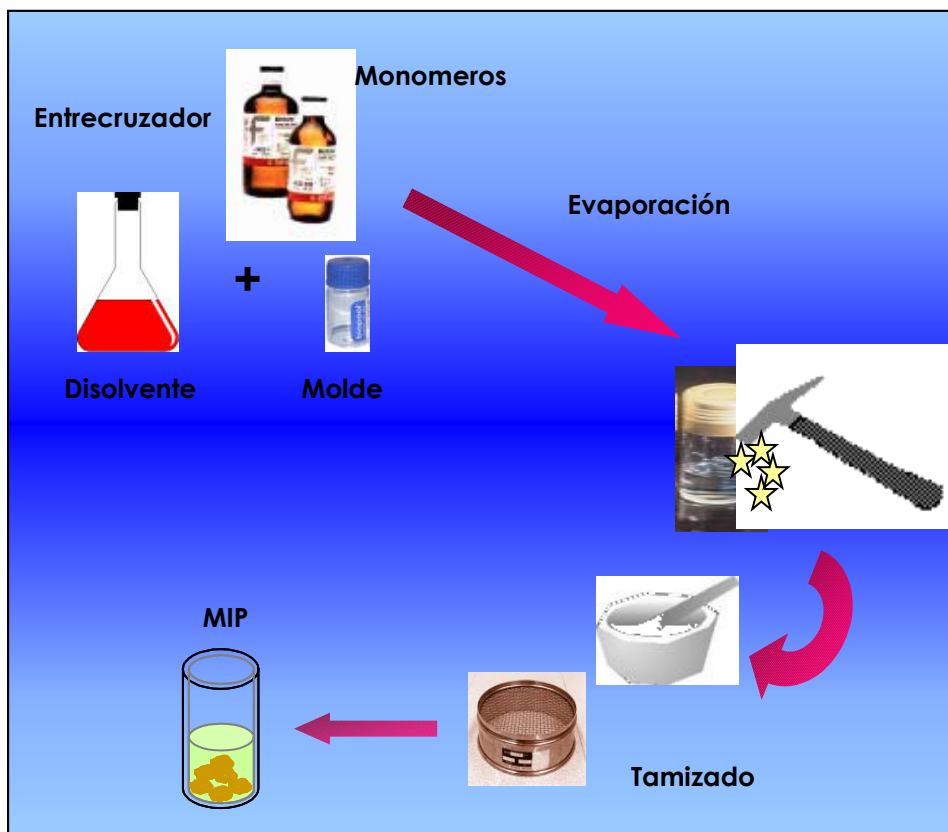


Figure B.3-4. Proceso de síntesis de los MIPs.

La composición de los distintos polímeros impresos fabricados se muestra en la Tabla B.3-1. En todos ellos hemos mantenido fijo el monómero diisocianato (MDI), el entrecruzador (floroglucinol) y el disolvente utilizado (THF), variando en solo el monómero diol utilizado.

Tabla B.3-1. Composición de los polímeros impresos fabricados

	Molde (FLT)	Monómeros(a)						Entrecruzador (floroglucinol)	Disolvente (THF)
		0	1	2	3	4	MDI		
MIP0	20	190	-	-	-	-	174	70	5
MIP1	20		158	-	-	-	174	70	5
MIP2	20		-	355	-	-	174	70	5
MIP3	20		-	-	454	-	174	70	5
MIP4	20		-	-	-	612	174	70	5

(0) Bisfenol A; (1) Bromohidroquinona; (2) Tetrabromohidroquinona; (3) Tetrabromobisfenol A; (4) Tetraiodobisfenol A.

Para cada uno de los polímeros sintetizados se hace a su vez un polímero "blanco", preparado siguiendo el mismo protocolo pero en ausencia de molécula molde, llamado polímero no impreso ("non imprinted polymer" NIP), con esto lo que se pretende es evaluar las absorciones inespecíficas que produce la propia matriz de nuestro polímero frente a la de los polímeros que contienen molécula molde. Los NIP deberán de ser tratados y sometidos en todo momento a los mismos procesos que los MIP.

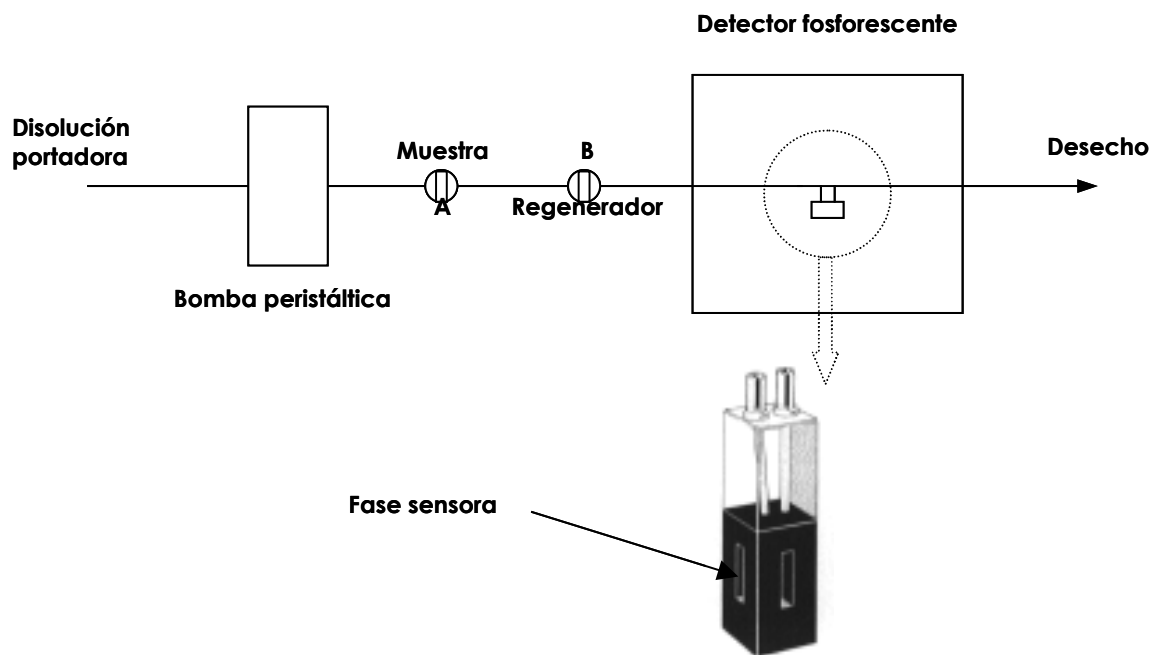
#### **4. EVALUACIÓN DE LOS POLÍMEROS IMPRESOS FABRICADOS**

##### **4.1. Diseño del sistema de flujo**

Para desarrollar un optosensor es necesario acoplar la fase sensora a un sistema de análisis por inyección en flujo (FIA).

El sistema FIA propuesto es análogo al convencional descrito en la introducción y a los utilizados en los capítulos anteriores (véase Figura B.3-5) y consta de:

- Un sistema de propulsión consistente en una bomba peristáltica que arrastra a una disolución portadora.
- Un sistema de inyección de muestra (válvula A), que consta de una válvula de inyección y un bucle de volumen definido.
- Un sistema de regeneración que consta de una válvula (válvula B) y un bucle.
- Una zona de medida, que al tratarse de un optosensor convencional es una cubeta de flujo convencional en la que se empaqueta el MIP seleccionado y colocada en el paso óptico del fosforímetro.



*Figura B.3-5. Sistema de flujo utilizado.*

#### 4.2. Extracción de la molécula molde

La capacidad de reconocimiento de los polímeros impresos sintetizados se evaluó siguiendo la variación de la señal fosforescente, llevando a cabo ensayos por inyección en flujo.

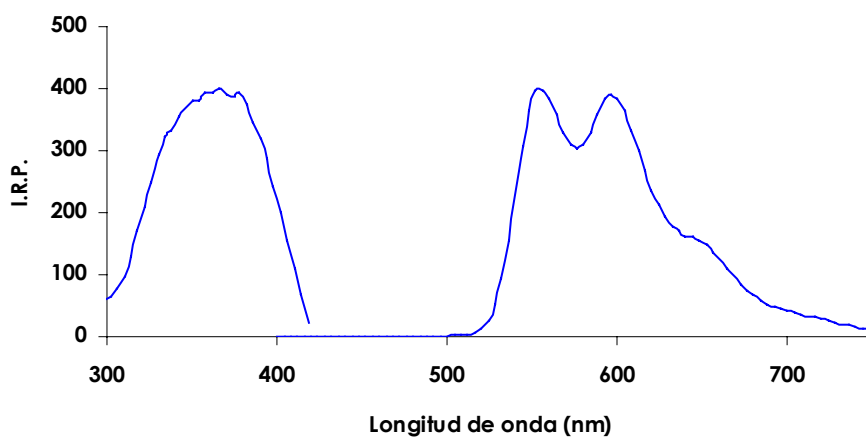
En todos los polímeros impresos evaluados pudimos observar claramente la señal fluorescente del fluoranteno, pero tan solo en uno de ellos se consiguió obtener señal de emisión fosforescente del fluoranteno.

Antes de empezar a determinar la capacidad de reconocimiento de los distintos materiales poliméricos sintetizados, fue necesario eliminar la molécula molde del polímero impreso. Con tal fin se empaquetaron las partículas del polímero en la celda de flujo y se empleó el sistema de flujo anteriormente citado, utilizando como portador la disolución de lavado. El proceso de lavado se siguió fluorimetricamente hasta la no detección del molde en las disoluciones de lavado.

Se ensayaron diferentes disolventes orgánicos como fueron el acetonitrilo, acetona, metanol y etanol. Con este procedimiento tan solo se consiguió extraer la molécula molde del MIP0, en el resto de MIPs la extracción del FLT fue nula.

Tras la extracción del FLT en el MIP0, se procedió al empaquetamiento del polímero en la cubeta de flujo convencional y a su evaluación, para ello siguiendo los procedimientos descritos en los Capítulos anteriores, se hizo pasar una disolución portadora conteniendo sulfito sódico como desoxigenante y KI como átomo pesado para favorecer el cruce entre sistemas, y se pincharon distintas disoluciones de FLT conteniendo un 2 % (v/v) de acetonitrilo y las mismas concentraciones de átomo pesado y sulfito sódico que la portadora. No siendo capaces de obtener ninguna señal de emisión fosforescente del FLT.

Por lo que continuamos trabajando con los MIPs que contienen un átomo pesado en la estructura, una vez lavados y tamizados al tamaño adecuado, pasamos a ver si observamos la molécula de FLT, tan solo el MIP4, el cual fue fabricado utilizando como monómero el tetraiodobisfenol A dio resultados satisfactorios (ver Figura B.3-6).



**Figura B.3-6. Espectro del molde (FLT) retenido en el MIP4.**

En el se podía observar claramente dos máximos de emisión fosforescente a 550 y 593 nm y un máximo de excitación fosforescente a 365 nm, que se corresponden perfectamente con las longitudes de onda del fluoranteno, esto pone de manifiesto que en el MIP4 se produce una interacción favorable del FLT con el átomo pesado utilizado que hace que se favorezca el cruce entre sistemas y por lo tanto la emisión fosforescente.

El siguiente paso fue la eliminación de la molécula molde (FLT) del MIP4 con la intención de dejar los huecos libres, los resultados anteriores demostraron que el sistema empleado no era eficiente y no conseguía extraer nada de nuestra molécula molde, por lo que se sustituyó por un sistema de extracción más potente como es el sistema de extracción con disolventes asistido por microondas.

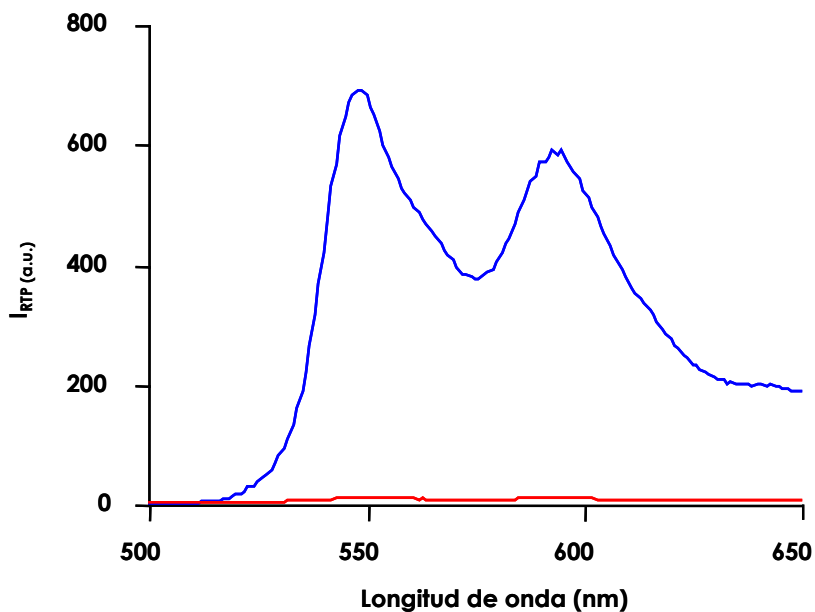
El proceso seguido para la realización de la extracción mediante microondas fue el siguiente: 100 mg del MIP4 se introdujeron en las bombas de trabajo\_ y se adicionaron 4 mL de distintas mezclas de extracción (1:1), como fueron metanol:hexano, metanol:acetonitrilo y metanol:tolueno, se introdujeron en el microondas y se sometieron a diferentes programas, variando la potencia y el tiempo de irradiación del polímero (ver Tabla B.3-2).

**Tabla B.3-2. Diferentes disoluciones extractantes y programas utilizados en el tratamiento pos microondas.**

Programa	Disolventes	Potencia (W)	Tiempo (min.)
1	Metanol:hexano Metanol:acetonitrilo Metanol:tolueno	300	5
2	Metanol:hexano Metanol:acetonitrilo Metanol:tolueno	150	5
3	Metanol:hexano Metanol:acetonitrilo Metanol:tolueno	100	5
4	Metanol:hexano Metanol:acetonitrilo Metanol:tolueno	30	5

De los resultados podemos concluir que si utilizamos programas de ataque muy agresivos (alta potencia y tiempo de irradiación) destruimos por completo la matriz polimérica creada, y por lo tanto el polímero impreso pierde todas sus propiedades de reconocimiento. Luego se eligió como óptimo un tratamiento de 30 W durante 5 minutos y utilizando como mezcla extractora metanol:hexano (1:1), pues fue con esta con la que se consiguió extraer mayor cantidad de FLT del polímero impreso sin destruir la estructura del mismo. En la Figura B.3-7 podemos observar claramente la emisión fosforescente del polímero impreso original y después del tratamiento de extracción mediante microondas.

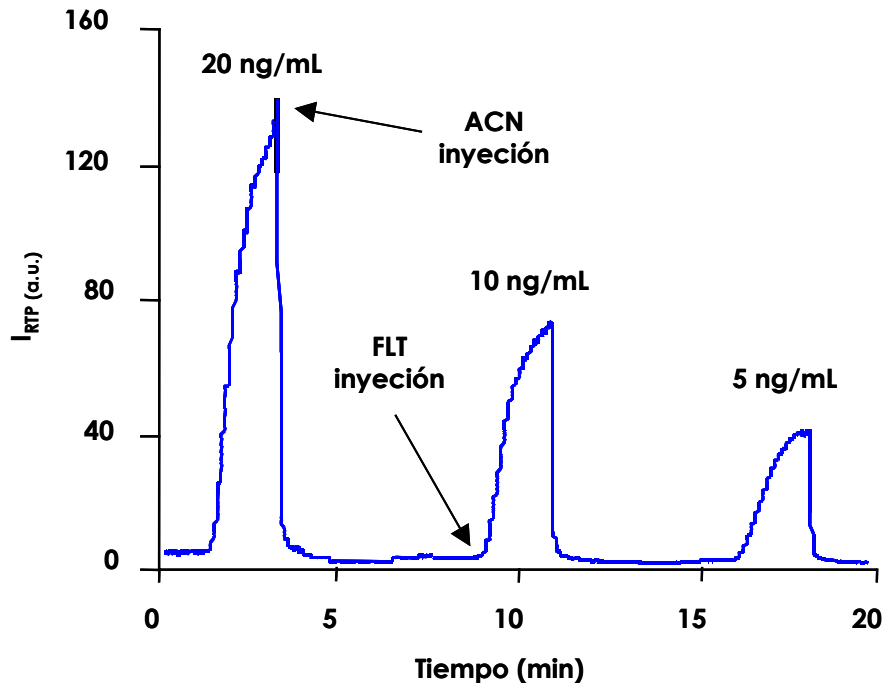




**Figura B.3-7. Espectros de emisión fosforescente ( $\lambda_{exc} = 365 \text{ nm}$ ) del FLT en el MIP4 (—) y espectro de emisión fosforescente después de la extracción del FLT con el tratamiento con microondas (—).**

#### 4.3. Capacidad de reconocimiento

Una vez extraída la molécula de fluoranteno se procedió a la evaluación de la capacidad de reconocimiento de la fase sensora desarrollada, para ello se empaquetó el polímero en la cubeta de flujo y se le hizo pasar diferentes disoluciones de fluoranteno a distintas concentraciones y desoxigenadas con sulfito sódico para aumentar la señal de fosforescencia (se utilizó una concentración de este de 6 mM en la muestra, concentración suficiente para eliminar el oxígeno), utilizamos las mismas variables instrumentales que el apartado anterior. En la Figura B.3-8 puede observarse la respuesta del MIP4 a sucesivas inyecciones de distintas concentraciones de fluoranteno en agua (2 mL de muestra). Una vez ha sido retenido el fluoranteno en el MIP y detectado este es eliminado del polímero con el simple paso de una disolución de acetonitrilo (2 mL), quedando el MIP4 listo para su nuevo uso.

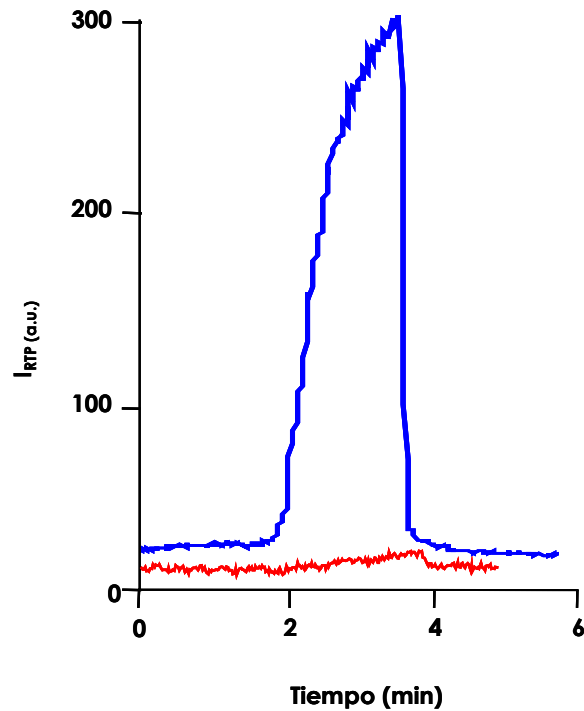


**Figura B.3-8. Respuesta del optosensor propuesto ( $\lambda_{exc} = 365 \text{ nm}$ ) frente a diferentes concentración de FLT en el MIP4 (—).**

Podemos observar como la regeneración es perfecta, y los tiempos de respuesta del optosensor propuesto son aproximadamente de unos 5 minutos.

Algo que hay que tener claro cuando se trabaja con polímeros impresos es verificar que las señales de emisión fosforescentes obtenidas son debidas a la retención del fluoranteno dentro de los huecos específicos que hemos creados especialmente para el y no a una absorción inespecífica de nuestra matriz polimérica, para comprobar esto se procedió a la inyección de una muestra de FLT de 50 ng/mL utilizando el MIP4 como fase sensora y con el mismo procedimiento se inyectó en el polímero no impreso (NIP4) que se ha sido tratado en todo momento de la misma forma que el MIP4. Los resultados se muestran en la Figura B.3-9.

Podemos ver claramente como la señal del MIP4 frente al NIP4 es de una relación de 1:300 aproximadamente, por lo cual podemos ratificar que la señal que obtenemos no es debida a interacciones inespecíficas con nuestra matriz polimérica sino a la introducción del FLT dentro de los huecos específicos creados para el FLT.

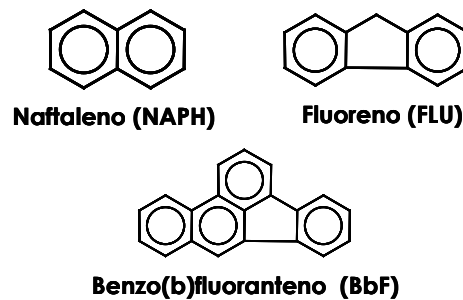


**Figura B.3-9.** Respuesta del optosensor propuesto ( $\lambda_{exc} = 365 \text{ nm}$ ) frente a una concentración de 50 ng/mL en FLT en el MIP4 (—) y en el NIP4 (—).

#### 4.4. Selectividad del MIP

La fase sensora desarrollada se pretende aplicar al futuro desarrollo de un optosensor fosforescente selectivo para la determinación de fluoranteno en agua, por ello debemos de comprobar la selectividad que ofrece la fase sensora frente a otros HAPs que pueden estar presentes en la muestra.

Para llevar a cabo este estudio, se prepararon disoluciones de 40 ng/mL de FLT y se le adicióno 100 ng/mL de NAPH, FLU y BbF (cuyas estructuras recordamos en la Figura B.3-10).



**Figure B.3-10.** Estructura de los PAHs ensayados como interferentes.

## 4.5. Características analíticas del método

Una vez establecidas las condiciones experimentales óptimas y las condiciones de medida para la determinación conjunta, se procedió al establecimiento del método analítico. En este apartado se ha establecido el procedimiento operatorio, las rectas de calibrado para cada uno de los pares de longitudes de onda previamente seleccionados y los parámetros de fiabilidad de cada una de las curvas, cuyo estudio se llevó a cabo mediante el protocolo del modelo de regresión lineal de la IUPAC.

### 4.5.1. Procedimiento operatorio

El polímero impreso seleccionado (MIP4 particulado a 80-160  $\mu\text{m}$ ) se empaquetó en la cubeta de flujo convencional. Se prepararon varias disoluciones de concentraciones crecientes de FLT en con 6 mM  $\text{Na}_2\text{SO}_3$ . Se ajustó la velocidad de flujo de la bomba peristáltica a 0.75 mL/min. Se fijaron las condiciones instrumentales en el equipo y se registró la señal analítica que se producía en la celda de flujo después de la inyección.

### 4.5.2. Recta de calibrado

Se establecieron las rectas de calibrado para cada una de las zonas de medida seleccionadas variando la concentración del analito o mezclas de ellos, realizando tres réplicas para cada nivel de concentración.

Los datos estadísticos de esta recta de calibrado se pueden observar en la Tabla B.3-3 y en la Figura B.3-11 se muestra la influencia de la concentración sobre la respuesta del optosensor en los pares de longitudes de onda de medida.

Tabla B.3-3. Parámetros estadísticos de la recta

Parámetro analítico	Valor estimado
Ordenada en el origen (a)	0.419
Pendiente (b)	3.262
Coefficiente de correlación (r)	0.999
Coefficiente de determinación (r <sup>2</sup> ) (%)	0.998

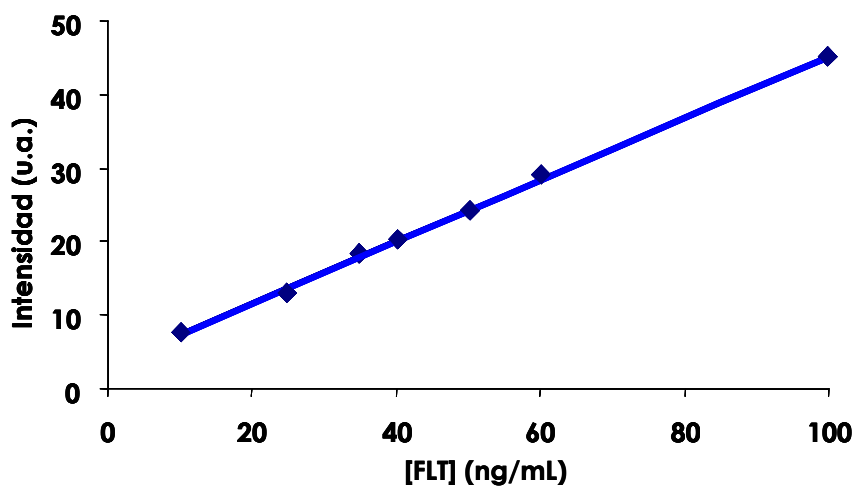


Figura B.3-11. Recta de calibrado del optosensor de FLT.

#### 4.5.3. Parámetros de fiabilidad

Para calcular el límite de detección (L.D.) y el límite de cuantificación (L.C.) según el criterio IUPAC, se calculó la desviación estándar de un blanco ( $s_0$ ), para ello se registró la desviación estándar de la línea base del optosensor y a partir de ella se calculó el L.D. y el L.C. La Tabla B.3-4 muestran los resultados obtenidos.

**Tabla B.3-4. Parámetros analíticos del optosensor propuesto.**

<b>Parámetro analítico</b>	<b>Valor estimado</b>
Intervalo dinámico lineal (ng/mL)	3.33-100
Límite de detección (ng/mL)	1.00
Límite de cuantificación (ng/mL)	3.33
	10 ng/mL
	2.8
	20 ng/mL
	2.5
	40 ng/mL
	2.9
D.E.R. (%)	60 ng/mL
	3.0
	80 ng/mL
	3.7
	100 ng/mL
	3.5

Por lo que podemos concluir que hemos desarrollado una nueva fase sensora mediante la técnica de impresión molecular usando un nuevo monómero iodado (tetraiodobisfenol A) y has sido propuesto para el reconocimiento de FLT mediante detección fosforescente.

**CONCLUSIONES**





## CONCLUSIONES

Las principales conclusiones derivadas de la investigación descrita en la presente Memoria se pueden resumir en los siguientes puntos:

**Parte A.** La utilidad y el potencial de la fosforescencia inducida por átomos pesados se ha demostrado en el control de procesos industriales de dos principios farmacológicos (dipiridamol y nafcilina), así como en el control ambiental de dos pesticidas (fuberidazole y napropamida) y de los dieciséis hidrocarburos aromáticos policíclicos seleccionados por la EPA como los más representativos y contaminantes. Se han obtenido las características espectroscópicas (longitudes de onda de excitación y emisión) fosforescentes y tiempos de vida en disolución acuosa. Además se han optimizado variables experimentales (tipo y concentración de átomo pesado, concentración de sulfito sódico y tipo y concentración de disolvente orgánico). Se ha establecido las curvas de calibrado y los parámetros analíticos (intervalo dinámico lineal, límite de detección y cuantificación, desviación estándar relativa) de cada uno de los analitos en estudio. Concretamente se han desarrollado los siguientes métodos:

**A1.** Se ha establecido dos métodos mediante la metodología HAI-RTP para la determinación de dipiridamol y nafcilina, empleando 0.25 M de  $\text{TlNO}_3$  como átomo pesado junto con 8 mM de sulfito sódico como desoxigenante y 1.00 M de KI junto con 2 mM en sulfito sódico respectivamente, obteniendo unos métodos con unos límites de detección de 0.94 ng/mL y 10.59 ng/mL para dipiridamol y nafcilina respectivamente. Uno de los métodos fue aplicado con éxito a la determinación de dipiridamol en un preparado farmacéutico obteniendo un 101.6% de porcentaje de recuperación con una desviación estándar relativa del 6.5%.

**A2.** Un método mediante la metodología HAI-RTP para la determinación de los pesticidas fuberidazol y napropamida. En ambos métodos se utilizó como átomo pesado KI y sulfito sódico como desoxigenante siendo las concentraciones utilizadas de 0.4 M de KI junto con 8 mM en sulfito sódico y 1.0 M de y 4 mM en sulfito sódico para fuberidazol y napropamida respectivamente, utilizando en ambos casos un 30% de acetonitrilo. Obteniendo dos métodos con un límite de detección de 0.095 ng/mL y 3.2 ng/mL para fuberidazol y napropamida respectivamente. El método para la determinación de fuberidazol fue aplicado con éxito en aguas de consumo humano con porcentajes de recuperación que oscilan entre el 90.5% y el 108.3% y desviaciones estándar relativas entre el 1.7% y

el 6.8%. Mientras el método desarrollado para la determinación de napropamida se evaluó para la determinación de este pesticida en aguas de consumo humano y suelo, con porcentajes de recuperación que oscilan entre el 88.8% y el 94.8% y desviaciones estándar relativas entre el 2.35% y el 6.34%.

**A3.** Se ha realizado una caracterización fosforescente en disolución acuosa de los HAPs seleccionados, concluyendo que esta metodología fosforescente va a permitir establecer métodos de determinación de los distintos analitos con buenas características analíticas (obteniendo límites de detección de hasta 0.15 ng/mL), y que jugando con todas las variables que nos permite esta metodología podemos establecer futuros métodos de determinación de los HAPs tanto de forma individual como conjunta.

**Parte B.** En el ámbito del uso de los optosensores fosforescentes en el control ambiental de analitos contaminantes, como son algunos pesticidas y los HAPs se ha realizado un estudio de las características fosforescentes a temperatura ambiente y en superficie sólida del pesticida naptalan y su principal producto de degradación la 1-naftilamina, así como de los dieciséis hidrocarburos aromáticos policíclicos antes citados. Se ha establecido el tipo de soporte sólido con el que interaccionan, los máximos de excitación y emisión fosforescentes en fase sólida, el tipo y concentración tanto de átomo pesado como de agente desoxigenante, así como el tipo y porcentaje de disolvente orgánico que es necesario adicionar a las muestras, concluyendo qué fases sensoras se pueden usar en el desarrollo de sensores mono o multiparamétricos en el análisis de pesticidas y HAPs. Esto ha permitido el desarrollo de los siguientes optosensores:

**B1.** Un optosensor biparamétrico para la determinación de naptalan y su metabolito la 1-naftilamina, utilizando la amberlita XAD 7 como fase sensora y una disolución portador de 0.2 M de  $\text{TiNO}_3$  y 15 mM en sulfito sódico. Aplicando el optosensor a la determinación en agua superficial y embotellada con porcentajes de recuperación que oscilan entre 82.8 y 114.1% con desviaciones estándar relativas inferiores al 3.1% en todos los casos.

**B2.** Un optosensor selectivo para la determinación de benzo(a)pireno en muestras de agua de consumo humano, basada en la interacción de este analito con la fase sensora Amberlita XAD 7 y sus características fosforescentes en lo referente a longitudes de onda de excitación/emisión y tiempo de vida. Este optosensor ha sido aplicado con éxito a la determinación en distintas muestras

de agua, obteniendo porcentajes de recuperación que oscilan entre el 88.0 y 97.5%, con desviaciones estándar relativas inferiores a 4.2% en todos los casos.

**B3.** Se han sintetizado distintos polímeros impresos molecularmente incorporando la presencia de átomos pesados en su estructura polimérica con el fin de aunar las ventajas ofrecidas por este tipo de materiales para llevar a cabo un reconocimiento molecular de especies químicas con una detección fosforescente. Siguiendo esta aproximación se ha desarrollado y caracterizado analíticamente un optosensor para la detección fosforescente altamente sensible y selectiva de la especie tóxica fluoranteno en aguas mediante su inmovilización reversible en un polímero de impresión molecular conteniendo en su estructura átomos de yodo, obteniendo unos límites de detección de hasta 1 ng/mL.



**PUBLICACIONES DERIVADAS**



## PUBLICACIONES DERIVADAS DE ESTA MEMORIA

- ANEXO I:** A. Segura Carretero, **A. Salinas Castillo**, A. Fernández Gutiérrez. "A review of heavy-atom-induced room-temperature phosphorescence a straightforward phosphorimetric method". *Critical Reviews in Analytical Chemistry* 35 (2005) 1-10.
- ANEXO II:** **A. Salinas Castillo**, A. Segura Carretero, A. Fernández Gutiérrez. "Sensitive and simple determination of the vasodilator agent dipyridamole in pharmaceutical preparations by phosphorimetry". *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 376 (2003) 1111-1114.
- ANEXO III:** **A. Salinas Castillo**, J.F. Fernández Sánchez, A. Segura Carretero, A. Fernández Gutiérrez. "A simple and rapid phosphorimetric method for the determination of the fungicide fuberidazole in water samples". *International Journal of Environmental and Analytical Chemistry* (2005) en prensa.
- ANEXO IV:** **A. Salinas Castillo**, J.F. Fernández Sánchez, A. Segura Carretero, A. Fernández Gutiérrez. "Simple determination of the herbicide napropamide in water and soil samples by room temperature phosphorescence". *Pest Management Science* (2005) en prensa.
- ANEXO V:** **A. Salinas Castillo**, A. Segura Carretero, J.M Costa Fernández, Wei Jun Jin A. Fernández Gutiérrez. "Heavy atom induced room temperature phosphorescence: a tool for the analytical characterization of polycyclic aromatic hydrocarbons". *Analytica Chimica Acta* 516 (2004) 213-220.
- ANEXO VI:** **A. Salinas Castillo**, J.F. Fernández Sánchez, A. Segura Carretero, A. Fernández Gutiérrez. "A facile flow-through phosphorimetric sensing device for simultaneous determination of naptalam and its metabolite 1-naphthylamine". *Analytica Chimica Acta* 522 (2004) 19-24.
- ANEXO VII:** **A. Salinas Castillo**, J.F. Fernández Sánchez, A. Segura Carretero, A. Fernández Gutiérrez. "Solid-surface phosphorescence characterization of polycyclic aromatic hydrocarbons and selective determination of benzo(a)pirene in water sample". *Analytica Chimica Acta*, enviado.
- ANEXO VIII:** **A. Salinas Castillo**, I. Sánchez Barragán, J.M Costa Fernández, R. Pereiro, A. Segura Carretero, A. Fernández Gutiérrez, A. Sanz Medel. "Iodinated molecularly imprinted polymer for room temperature phosphorescence optosensing of fluoranthene". *Chemical Communication* (2005) aceptado.





**ANEXO I**





# **A Review of Heavy-Atom-Induced Room-Temperature Phosphorescence a Straightforward Phosphorimetric Method**

**Antonio Segura Carretero, Alfonso Salinas Castillo,  
and Alberto Fernández Gutiérrez**

## **QUERY SHEET**

- Q1:** Au: Pls. provide recd. & accd. dates.
- Q2:** Au: Pls. provide full postal address.
- Q3:** Au: Edit correct?
- Q4:** Au: RRH Ok?
- Q5:** Au: Ref. no. needed?
- Q6:** Au: Ref. 36 is Pulgarín.
- Q7:** Au: Ref. no. needed.
- Q8:** Au: For all Refs. give Article title, full page range, and full title of journal.
- Q9:** Au: Give full pub. details.

# A Review of Heavy-Atom-Induced Room-Temperature Phosphorescence a Straightforward Phosphorimetric Method

Antonio Segura Carretero, Alfonso Salinas Castillo,  
 and Alberto Fernández Gutiérrez

Department of Analytical Chemistry, Faculty of Sciences, University of Granada, Granada, Spain

This review discusses the development of heavy-atom-induced, room-temperature phosphorescence (HAI-RTP), a new technique based on the use of RTP emitted directly from the analyte in a fluid solution with no protective medium except the presence of high concentrations of a heavy-atom perturber. These experimental conditions permit sufficient interaction between the perturber and the analytes to produce an effective population of their triplet states and thus emit intense phosphorescence.

**Keywords** heavy-atom-induced, room-temperature phosphorescence

## 15 INTRODUCTION

Luminescence is a branch of spectroscopy that deals primarily with the electronic states of an atom or molecule as opposed to its vibrational, rotational, or nuclear energy states. Fluorescence and phosphorescence, both of which involve the optical detection and spectral analysis of light emitted, are the two sister techniques of luminescence spectroscopy.

The sensitivity of phosphorimetry is slightly lower than that of fluorimetry but phosphorimetry gains in that phosphorescence emission wavelengths are generally far removed from the excitation wavelength and the time scales are longer and therefore more manageable. Furthermore, the equipment needed to measure fluorescence lifetime ( $\sim 10^{-8}$  s) is more sophisticated than that required to measure phosphorescence lifetime ( $10^{-4}$ –10 s). Thus, the advantages of phosphorimetry for lifetime measurements mean that it can be used to study various molecular motions in biological samples and polymers that cannot be studied by fluorimetry because of the very short lifetime of fluorescence. Finally, it is possible to achieve much higher selectivity with phosphorimetry than with spectrophotometry and fluorimetry because only a few compounds phosphoresce compared to the much larger number which fluoresce or absorb radiation.

Until 1980, room-temperature phosphorescence (RTP) in solution was only observed under certain special conditions in a

few compounds dissolved in organic solvents (1–4). Parker (1, 2) demonstrated for the first time that phosphorescence could be observed at room temperature with benzophenone in fluorocarbon solvents. Clark et al. (3) went on to demonstrate the possibility of obtaining phosphorescent emission with benzophenone and acetophenone in benzene and isooctane at 23°C, and in 1972 Bonner et al. (4), by comparing their results with those reported in the literature for experiments made at 77 K, confirmed the RTP in solution of biphenyls using either ethanol or alkanes as solvents. This was put down to the specific rigidity of the luminophor or the existence of a spin-forbidden transition enhancer and was regarded as a phenomenon proper to this kind of compound.

These pioneering studies were conducted mainly in the realm of physics. The phosphorimetric signal was used on a theoretical basis and considered to be of interest but no special regard was paid to its potential value in detection systems in analytical chemistry.

Phosphorescence quantum efficiency ( $\phi_p$ ) is defined as the ratio between the number of photons absorbed and the number of phosphorescence photons emitted. This is an intrinsic parameter for any compound studied experimentally (5–7). For solutions of low concentration, where photochemical reactions such as dimerization can be neglected, phosphorescence quantum efficiency is given by

$$\phi_p = \phi_{ISC} \frac{k_p}{k_p + k_{IC} + \sum_Q k_Q [Q]}$$

where  $\phi_{ISC}$  is the intersystem-crossing quantum efficiency,  $k_p$  and  $k_{IC}$  are the first-order rate constants ( $s^{-1}$ ) of the

Received ; accepted .

Address correspondence to Antonio Segura Carretero, Department of Analytical Chemistry, Faculty of Sciences, University of Granada, 18071, Granada, Spain. E-mail: ansegura@ugr.es

phosphorescence process and of the intramolecular radiationless deactivation of the triplet state, respectively,  $k_Q[Q]$  gives the rate of deactivation by bimolecular quenching,  $k_q$  is the second-order rate constant ( $\text{l mol}^{-1} \text{s}^{-1}$ ) (where this parameter is directly proportional to temperature and inversely proportional to the viscosity of medium), and  $[Q]$  is the concentration of the quencher. For fluid solutions at room temperature, where  $k_Q$  will be in the order of  $10^9 - 10^{10} \text{ l/mol s}$ ,  $\Sigma_Q k_Q[Q]$  will be the dominant term. To obtain emission signals this term needs to be made as small as possible by diminishing  $[Q]$  (dissolved molecular oxygen has to be removed almost completely) and/or diminishing  $k_Q$  (by decreasing the temperature or increasing the viscosity).

Turro (8) pointed out that if phosphorescence can be obtained at 77 K it can also usually be seen in a fluid solution at room temperature, if two conditions are fulfilled: (1) any impurities capable of quenching the triplet states are rigorously excluded; (2) the triplet state does not undergo activated unimolecular deactivation, thus having a rate constant ( ${}^3K_m$ ) greater than or equal to  $10^4$  times the phosphorescence rate constant ( $K_p$ ). In other words, phosphorescence can be seen at room temperature in a fluid solution provided that  ${}^3K_m < 10^4 K_p$  and the phosphorescence quantum yield ( $\phi_p$ ) can be expressed approximately by equation based on the dynamic graph,

$$\phi_p = \frac{K_p}{{}^3K_m + K_q[q]},$$

where  $K_q$  is the rate constant for the bimolecular deactivation of the triplet state and  $[q]$  the concentration of the quencher. A typical value of  $K_p$  for a molecule in an  $n, \pi^*$  triplet state ( $T_1$ ) is  $10^2 \text{ s}$ , whilst in a  $\pi, \pi^*$  triplet state it is  $10^{-1} \text{ s}$  (13). With these  $K_p$  values, the limiting concentrations of quencher for the observation of phosphorescence can be calculated if the quenching is diffusionally controlled. For phosphorescence to be seen  $\phi_p$  should be at least  $10^{-4}$ , while for nonviscous, organic solvents the rate constant of diffusion ( $K_{\text{dif}}$ ) is about  $10^{10} \text{ l/mol s}$ . In general it can be assumed that  $K_{\text{dif}} = K_q$  and so the conditions for observing phosphorescence are: for  $T_1(n, \pi^*)$ ,  $K_{\text{dif}}[q] < 10^6 \text{ s}$ , therefore  $[q] < 10^{-4} \text{ mol/l}$ ; and for  $T_1(\pi, \pi^*)$ ,  $K_{\text{dif}}[q] < 10^3 \text{ s}$ , therefore  $[q] < 10^{-7} \text{ mol/l}$ .

A concentration of  $10^{-4} \text{ mol/l}$  for  $q$  can be readily obtained experimentally but a concentration of  $10^{-7} \text{ mol/l}$  is more difficult. Thus, it is easy to observe fluid RTP of compounds with  $T_1(n, \pi^*)$  states whereas it is quite difficult with  $T_1(\pi, \pi^*)$  states. This conclusion concurs with our experimental results. For example, the NP-RTP emissions of naphthalene, anthracene phenanthrene and pyrene are very weak or cannot be seen at all because their triplet states are  $T_1(\pi, \pi^*)$ , in which, even in very pure solvents (impurity level including oxygen below  $10^{-9} \text{ mol/l}$ ), the quantum yields of phosphorescence ( $\phi_p$ ) are in the order of  $10^{-6}$ .

For molecules with no heteroatom present, electronic transitions generally involve the promotion of an electron from a bonding  $\pi$  orbital to an anti-bonding  $\pi^*$  one. For conjugated systems with N, O or S heteroatoms in the conjugated system or

with substituents containing N, O, or S atoms, an electronic state may result from the promotion of an electron from a bonding  $\pi$  orbital to an antibonding  $\pi^*$  orbital.

Another way to increase the quantum efficiency of phosphorescence in HAI-RTP is by decreasing  $[Q]$  and/or increasing intersystem crossing efficiency,  $\phi_{ISC}$ , by adding high concentrations of a heavy-atom salt. The latter permits greater interaction with the analyte (larger number and more effective interactions, but the interaction distances are closer than with cyclodextrins, micelles or microemulsions), producing an effective population of the triplet state and thus intense phosphorescence.

Surfactants and cyclodextrins have been found to produce some very interesting photophysical phenomena and have formed the basis of several new analytical approaches. Organized aggregates have the ability to arrange reagents at the molecular level, bringing interacting species together with high specificity.

Micellar-stabilized, room-temperature phosphorescence (MS-RTP) is based on the use of micellar solutions to observe phosphorescence emitted by aromatic molecules in fluid solutions at room temperature. In a micellar solution the analytes included in the micelle are apparently protected from the quenchers present in the solution. Nevertheless any attempt to shield the solutes is ineffective due to the dynamic nature of micelles and the association-dissociation processes between the analyte and the micelles. Quenchers can either enter the micelles or may be excluded, as in the electrostatic repulsion of anionic quenchers from anionic micelles. RTP in a micellar solution usually requires the presence of a heavy atom, which is situated as a counter ion outside the micelle, thus being in proximity to the hydrophobic molecules associated with the micelle. The high local concentration of the heavy atoms produces an efficient spin-orbit coupling which can diminish fluorescence and increase phosphorescence by an additional internal heavy-atom effect. Furthermore, phosphorescence can only be observed in oxygen-free solutions, as oxygen is an effective quencher that easily penetrates into the micelles. Aqueous solutions are usually deoxygenated by bubbling nitrogen through them, but it is difficult to do this with a micellar solution because of foaming.

Microemulsions are homogeneous dispersions of very small drops of water in oil (W/O) or of oil in water (O/W) in the presence of large amounts of a surfactant and co-surfactant (usually a medium-sized alcohol with an alkyl group of C-4 to C-8). Water in oil microemulsions contain an aqueous core and are similar to inverted micelles. Oil in water microemulsions, on the other hand, contain a sizeable hydrocarbon core and are similar to normal micelles. The advantage of microemulsions compared to normal micelles is that the hydrophobic core itself is propitious for dissolving relatively high concentrations of hydrophobic molecules and also large organic molecules with dimensions approaching those of many micelles in the aggregate.

Cyclodextrins are host molecules for inclusion compounds, capable of trapping or complexing both small and large

molecules depending on their cavity sizes. The formation of an inclusion compound is similar to the dynamic solubilization of molecules in micelles. One different feature of these systems, however, is the existence of cavities of finite dimensions which necessarily leads to certain limits in the size and/or shape of guest molecules. The inclusion causes restrictions in the mobility of the molecule and/or alterations in local polarity. The main advantage deriving from this is an increase in emission with extra sensitivity.

As can be seen, with these methods it is essential to provide a protective ordered medium to minimize self-quenching and to arrange the reagents at the molecular level in order to increase the proximity of the heavy atoms and analytes. Although a micellar medium is capable of dissolving apolar compounds, these organized media have several concomitant problems, including the formation of foams during the homogenization of the samples, clean-up of the flask, precipitation with different heavy atoms, and delays in the elimination of oxygen dissolved within the micelles. Added to this, most phosphorimetric methods, because they use cyclodextrins, require time-consuming deoxygenation of the samples and give rather poor detection limits. Neither can these methods be easily adapted to detection in liquid chromatography or flow-injection analysis.

New studies were carried out in order to discover whether phosphorescence could be achieved in solution without organized media. Donkerbroek et al. (9, 10) demonstrated the analytical potential of sensitized RTP in fluid solutions by using triplet-triplet energy transfer from the donor (analyte of interest) to the acceptor (biacetyl or 1,4-dibromonaphthalene).

## HEAVY-ATOM-INDUCED, ROOM-TEMPERATURE PHOSPHORESCENCE

Until 1998, it was customary in phosphorimetry to use organized media (micelle, microemulsion or cyclodextrin) to increase the viscosity of the microenvironment and avoid intermolecular collision, plus heavy atoms to help intersystem crossing and deoxygenators to eliminate any dissolved oxygen.

### A New Phosphorescence Method in Solution

In 1995 Li and Huang (11), at Tsing Hua University (Beijing, China), studied the emission conditions and spectral properties of 5-dimethylaminonaphthalene sulphonylchloride (DNS-Cl) and derivative products from amino acids by micelle-stabilized, room-temperature phosphorescence (MS-RTP) and solid-substrate, room-temperature phosphorescence (SS-RTP). Subsequently this research group (12, 13) confirmed that it was possible to obtain a phosphorescent signal from these compounds in aqueous solutions with no organised medium and established the phosphorescence characteristics (wavelengths, intensity and life time) for each compound (see Table 1). The authors proposed using a phosphorimetric method to determine dansyl chloride in an aqueous system by adding thallium nitrate as heavy-atom perturber and sodium sulphite as deoxygenator. They obtained satisfactory linearity between RTP intensity and

the concentration of DNS-Cl in the range of  $2.0 \cdot 10^{-7}$  to  $1.0 \cdot 10^{-5}$  M, with a detection limit of  $1.9 \cdot 10^{-8}$  M.

The fluid RTP method reported is different from other kinds of fluid RTP methods developed previously, such as CD-RTP or MS-RTP, and has many advantages over these methods:

1. As it does not require a microscopically ordered protective medium the method is not only simple but also avoids the detrimental effects to the analyte frequently caused by the addition of such a medium.
2. Several important advantages to the system in question are the transparency of the solution, no precipitate (as with CD-RTP) and no foam (as with MS-RTP), together with the fact that the RTP signal can be induced directly within the aqueous phase, which makes it possible to combine with other analytical techniques such as liquid chromatography (LC), flow-injection analysis (FIA) and capillary electrophoresis (CE), and to perform automatic on-line analyses.
3. Chemical deoxygenation with  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  is simple and precise and may also be used to adjust the pH level of the system, thus simplifying the experimental procedure.

In 1996 the authors of this review (14) reported the determination of  $\beta$ -naphthoxyacetic acid using TX-100 as micellar medium at a concentration fifteen times lower than the critical micellar concentration. Two years later they confirmed that it was possible to obtain phosphorescence signals in solution by using aqueous solutions of the analytes alone in the presence of a heavy atom (KI and  $\text{TlNO}_3$ ) and sodium sulphite as oxygen scavenger. The technique was called "heavy-atom-induced, room-temperature phosphorescence" (HAI-RTP) (15) and demonstrated this innovative analytical technique by obtaining RTP signals in solution with three naphthalene derivatives, a pharmaceutical compound (naphazoline, NPZ), a plant growth regulator (naphthoxyacetic acid, NOA) and a polycyclic aromatic hydrocarbon (acenaphthene, ACE) (see Table 1). Different heavy-atom salts were assayed (KI, NaI, KBr, NaBr, KCl,  $\text{TlNO}_3$ ,  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ , and  $\text{AgNO}_3$ ) at several concentrations. In all cases, it was proved that nonphosphorescence responses could be obtained from the analytes in the complete absence of a heavy atom while, in general, HAI-RTP intensity increased concomitantly with the heavy-atom concentration. Concentrations of 1 M for KI and 0.25 and 0.05 M for  $\text{TlNO}_3$  were found to be optimum for the three compounds, NPZ, NOA, and Ace, respectively. Three analytical methods were proposed, with detection limits of 167, 44, and 65 ng/ml for  $\beta$ -naphthoxyacetic acid, naphazoline, and acenaphthene, respectively. This work demonstrated that this method can be used to determine derivative naphthalenes and confirmed the possibility of using another salt (KI) as heavy-atom perturber.

Li et al. (16) then reported that many naphthalene derivatives also emit RTP in aqueous solutions under similar conditions in the absence of a protective medium. Such an RTP emission was referred to as non-protected, fluid room-temperature

TABLE 1  
Compounds, spectroscopic characteristics, experimental conditions, detection limits and references

Compound	Spectroscopic characteristics		Experimental conditions				Reference
	Wavelengths (nm)	Lifetime ( $\mu$ s)	Heavy atom perturber			Detection limit (ng/ml)	
			Type	Concentration (M)	[Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> ] (M)		
Acenaphthene	290/500	307	TiNO <sub>3</sub>	0.050	0.0100	65.0 <sup>a</sup>	15
	286/493,520	—	KI	—	—	13.9 <sup>b</sup>	29
1,5-Dinaphthalensulfonic acid	331/534	464	TiNO <sub>3</sub>	0.050	0.0100	—	16
1-Hidroxi-2-naftanoic acid	340/510	240	TiNO <sub>3</sub>	0.050	0.0100	28.2 <sup>b</sup>	16
3-Indol butyric (IBA)	288/458	145	KI	1.6	0.0015	24.9 <sup>a</sup>	27
$\alpha$ -Naphthylacetic acid (NAA)	290/495,523	418	TiNO <sub>3</sub>	0.050	0.0100	109.9 <sup>b</sup>	16
	292/490,520	236	TiNO <sub>3</sub>	0.025	0.0015	14.6 <sup>a</sup>	27
$\alpha$ -Naphthoxyacetic acid ( $\alpha$ -NOA)	312/499,525	324	TiNO <sub>3</sub>	0.050	0.0100	—	16
	287/495,521	—	KI	—	—	—	26
	297/494,521	—	TiNO <sub>3</sub>	—	—	—	26
	287/524	350	KI	0.3	0.0100	2.0 <sup>b</sup>	30
	297/494,522	340	TiNO <sub>3</sub>	0.040	0.0100	2.0 <sup>b</sup>	30
$\beta$ -Naphthoxyacetic acid ( $\beta$ -NOA)	336/500	307	TiNO <sub>3</sub>	0.250	0.0100	167.0 <sup>a</sup>	15
	286,323/505,534	332	TiNO <sub>3</sub>	0.050	0.0100	—	16
	277,320/503,530	670	KI	0.4	0.0100	2.4 <sup>b</sup>	30
	284,322/503,529	1230	TiNO <sub>3</sub>	0.050	0.0100	2.2 <sup>b</sup>	30
1-Naphthoxylactic acid (NA)	295/491,527	—	TiNO <sub>3</sub>	0.065	0.0150	9.6 <sup>b</sup>	28
Sodium 1-amino-4-naphthalenosulfonate (1,4-ANS)	—	—	TiNO <sub>3</sub>	—	—	0.8 <sup>b</sup>	22
Sodium 1-amino-5-naphthalenosulfonate (1,5-ANS)	331/534	464	TiNO <sub>3</sub>	0.050	0.0100	9.3 <sup>b</sup>	16
	—	—	TiNO <sub>3</sub>	—	—	31.3 <sup>b</sup>	22
Sodium 1-amino-7-naphthalenosulfonate (1,7-ANS)	—	—	TiNO <sub>3</sub>	—	—	—	22
Sodium 2-amino-1-naphthalenosulfonate (2,1-ANS)	—	—	TiNO <sub>3</sub>	—	—	6.3 <sup>b</sup>	22
Sodium 2-amino-8-naphthalenosulfonate (2,8-ANS)	—	—	TiNO <sub>3</sub>	—	—	—	22
$\alpha$ -Bromo naphthalene (alfa-BrN)	299/523,540	446	TiNO <sub>3</sub>	0.050	0.0100	—	16
	—	—	TiNO <sub>3</sub>	—	—	—	35
$\beta$ -Bromonaphthalene (beta-BrN)	275/494,518	—	TiNO <sub>3</sub>	0.050	0.0100	9.7 <sup>b</sup>	21
Carbaryl (CBL)	288/488,526	180	KI	1.4	0.0015	10.6 <sup>a</sup>	27
	285/495,523	—	KI	—	—	0.9 <sup>b</sup>	41

(Continued on next page)



TABLE 1  
Compounds, spectroscopic characteristics, experimental conditions, detection limits and references (*Continued*)

Compound	Spectroscopic characteristics		Experimental conditions				Reference
			Heavy atom perturber				
	Wavelengths (nm)	Lifetime ( $\mu$ s)	Type	Concentration (M)	[Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> ] (M)	Detection limit (ng/ml)	
Carbazole (CBZ)	290/440	255	KI	0.6	0.0020	3.8 <sup>a</sup>	27
Clorhidrato de 1-naphthylamine	325/545	279	TiNO <sub>3</sub>	0.050	0.0100	—	16
$\alpha$ -Chloro naphthalene	300/525	398	TiNO <sub>3</sub>	0.050	0.0100	—	16
Dansyl chloride	—	—	TiNO <sub>3</sub>	—	—	—	35
	326/574	—	TiNO <sub>3</sub>	0.050	0.0100	5.1 <sup>b</sup>	13
	328/574	541	TiNO <sub>3</sub>	0.050	0.0100	—	16
Hydroxilated dansyl chloride (DNS-OH)	330/579	—	TiNO <sub>3</sub>	0.050	0.0100	—	13
Dansylamide (DNSD)	334/620	222	TiNO <sub>3</sub>	0.200	0.0100	85.7 <sup>a</sup>	27
	331/591	778	TiNO <sub>3</sub>	0.050	0.0100	—	16
Dansyl derivate of aspartic acid (DNS-Asp)	331/590	364	TiNO <sub>3</sub>	0.050	0.0100	—	13
Dansyl derivate of alanine (DNS-Ala)	330/593	409	TiNO <sub>3</sub>	0.050	0.0100	—	13
Dansyl derivate of arginine (DNS-Arg)	330/589	60	TiNO <sub>3</sub>	0.050	0.0100	—	13
Dansyl derivate of asparigine (DNS-Asn)	329/587	500	TiNO <sub>3</sub>	0.050	0.0100	—	13
Dansyl derivate of phenylalanine (DNS-Phe)	330/590	435	TiNO <sub>3</sub>	0.050	0.0100	—	13
Dansyl derivate of glutamine (DNS-Gln)	330/590	532	TiNO <sub>3</sub>	0.050	0.0100	—	13
Dansyl derivate of histidine (DNS-His)	331/594	455	TiNO <sub>3</sub>	0.050	0.0100	—	13
Dansyl derivate of leucine (DNS-Leu)	332/593	489	TiNO <sub>3</sub>	0.050	0.0100	—	13
Dansyl derivate of lysine (DNS-Lys)	332/596	608	TiNO <sub>3</sub>	0.050	0.0100	—	13
Dansyl derivate of metionine (DNS-Met)	333/596	548	TiNO <sub>3</sub>	0.050	0.0100	—	13
Dansyl derivate of serine (DNS-Ser)	330/593	383	TiNO <sub>3</sub>	0.050	0.0100	—	13
Dansyl derivate of threonine (DNS-Thr)	330/588	470	TiNO <sub>3</sub>	0.050	0.0100	—	13
Dansyl derivate of tryptophan (DNS-Trp)	329/584	263	TiNO <sub>3</sub>	0.050	0.0100	—	13
Dansyl derivate of valine (DNS-Val)	333/591	498	TiNO <sub>3</sub>	0.050	0.0100	—	13
Phenantrene (PHE)	292/477	—	TiNO <sub>3</sub>	0.050	0.0100	—	16

(Continued on next page)

TABLE 1  
Compounds, spectroscopic characteristics, experimental conditions, detection limits and references (*Continued*)

Compound	Spectroscopic characteristics		Experimental conditions				Reference
			Heavy atom perturber			Detection limit (ng/ml)	
	Wavelengths (nm)	Lifetime ( $\mu$ s)	Type	Concentration (M)	[Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> ] (M)		
Phenanthrine	283/482,504	—	KI	—	—	57.2 <sup>a</sup>	33
Fluorene (FLU)	295/450	130	TiNO <sub>3</sub>	0.050	0.0015	14.6 <sup>a</sup>	27
	285/467	—	KI	—	—	14.3 <sup>b</sup>	29
9-Hydroxy-4-metoxycridine (HMA)	402/584	91	KI	1.0	0.0005	20.6 <sup>a</sup>	27
4-Methylpropranolol	296/526	—	TiNO <sub>3</sub>	0.085	0.050	21.0 <sup>b</sup>	40
Nafazoline (NPZ)	288/488	632	KI	1.0	0.0100	44.0 <sup>a</sup>	15
Nafronyl (NFL)	292/492,524	156	KI	1.6	0.0020	11.7 <sup>a</sup>	27
Naphthalene (NAPH)	296/482,512	—	TiNO <sub>3</sub>	0.050	0.0100	—	16
$\alpha$ -Naphthaleneacetamide (NAD)	292/492,540	251	KI	1.2	0.0015	7.8 <sup>b</sup>	23
	292/492,540	251	KI	1.2	0.0015	7.8 <sup>b</sup>	27
Sodium $\beta$ -naphthalenesulphonate	284/500,528	223	TiNO <sub>3</sub>	0.050	0.0100	—	16
1-Naphthylamine	326/546	352	TiNO <sub>3</sub>	0.050	0.0100	—	16
1-Naphthylamine diacetic acid (NADA)	321/571	—	TiNO <sub>3</sub>	—	—	—	38
Naphthopidil	296/494,526	475	TiNO <sub>3</sub>	0.085	0.0085	21.0 <sup>b</sup>	32
	282/525	—	KI	1.4	0.005	7.9 <sup>b</sup>	36
	—	—	KI	1.4	0.0075	—	39
$\beta$ -Naphthol ethyl eter	324/507	408	TiNO <sub>3</sub>	0.050	0.0100	—	16
Naproxene (NAP)	334/510,540	1028	TiNO <sub>3</sub>	0.200	0.0040	17.6 <sup>a</sup>	27
Pyrene	334/600	—	TiNO <sub>3</sub>	0.050	0.0100	—	16
	330/596	1330	KI	2.0	0.0100	—	31
	330/596	2230	TiNO <sub>3</sub>	0.095	0.0100	4.0 <sup>b</sup>	31
Propranolol	294/492,526	1290	KI	3.6	0.005	14.4 <sup>a</sup>	43
	288/494,522	—	KI	—	—	—	37
	294/492	—	KI	—	—	14.4 <sup>a</sup>	42
Thiabendazole (TBZ)	300/488	89	KI	0.8	0.0010	15.4 <sup>a</sup>	27
Tryptamine (TRA)	284/452	90	KI	0.8	0.0030	19.7 <sup>a</sup>	27
Tryptophan (TRP)	288/446	166	KI	1.0	0.0020	11.2 <sup>a</sup>	27

<sup>a</sup>Methodology based in the calibration (44).

<sup>b</sup>IUPAC methodology (45).

275 phosphorescence (NP-RTP). To find out more about this new  
phenomenon they studied the substituent group effects and the  
chemical structure of compounds favouring NP-RTP emissions.  
Their investigations showed that NP-RTP is not an exceptional  
phenomenon peculiar to certain derivatives but a normal charac-  
280 teristic of naphthalene derivatives. The basic structure of naph-  
thalene derivatives is their rigid naphthalene nucleus and planar  
molecular configuration, leading to high fluorescence efficiency.  
If the conjugated system grows with the substituent group, the  
electron is easily excited and both phosphorescence and flu-

orescence are engendered. Thus, electron-donating substituent  
groups, particularly those with an *n* electron, tend to increase  
phosphorescence intensity, since they increase the mobility of  
the electrons in the naphthalene ring. Substituent groups with a  
negative charge can enhance phosphorescence intensity because  
in the aqueous solution the proximity between the luminophor  
290 and the inorganic heavy-atom perturber, Ti<sup>+</sup>, may be increased  
due to the attraction created by static electricity and may thus en-  
hance the efficiency of intersystem crossing to the triplet state. In  
heavy-atom substituted compounds the phosphorescence signal

295 was relatively strong. Finally, compounds with substituted –NO  
 or –OH groups do not favor the emission of phosphorescence in  
 solution (see Table 1).

**Nomenclature**

300 This new technique was developed simultaneously by two  
 different research groups, one from Tsing Hua University and  
 our own from Granada University. The former group have chosen  
 to name it non-protected, room-temperature phosphorescence (NP-RTP) (13), while Segura Carretero et al. has called  
 it heavy-atom-induced, room-temperature phosphorescence  
 305 (HAI-RTP) (15). The term “non-protected, room-temperature  
 phosphorescence” takes this new method to be a simplification  
 of older phosphorescence methods in solution, based on the use  
 of organized (protected) media. Thus our research group prefer  
 the term “heavy-atom-induced, room-temperature phosphorescence”  
 310 because it describes more accurately the fact that the  
 phosphorescence is induced by the presence of a heavy-atom  
 perturber in the absence of oxygen. In fact, it not possible to  
 observe a phosphorescent signal in the absence of a heavy atom,  
 even when using sodium sulphite as deoxygenator.

315 Whatever the name, this technique represents a great inno-  
 vation in obtaining phosphorescent signals and can be included  
 in the general scheme of classification as an alternative to other  
 methods of obtaining and analysing phosphorescence emission  
 in solution. Nevertheless, the fact that the signal is obtained  
 320 with no kind of organized medium and without any restriction  
 to the kind of analyte involved leads us to suggest that a revised  
 classification of techniques in solution should distinguish be-  
 tween those which require organised media (MS-RTP and CD-  
 RTP) and those which do not (Sensitized and HAI-RTP) (see  
 325 Figure 1).

**Theoretical Justification**

The development of this new technique is based first on cer-  
 tain physical-chemical aspects of phosphorescence emission in

the presence of sodium sulphite and relatively high concentra-  
 tions of heavy-atom perturber, and secondly on instrumental  
 development in recent years.

330

The rate of intersystem crossing can be enhanced by the pres-  
 ence of heavy atoms. Since the probability of the intersystem  
 crossing process includes spin-orbital matrix elements, which  
 depend upon the atomic number of the atoms in the vicinity of  
 the excited electron, phosphorescence emission increases with  
 335 halogen-substituted aromatics concomitantly with the atomic  
 weight of the halogen. This so-called “internal heavy-atom ef-  
 fect” is also known to quench fluorescence and decrease the  
 lifetime of phosphorescence (17). In 1952, Kasha (18) demon-  
 strated the possibility of stimulating luminescence by the use of  
 340 an external heavy atom. This effect is called the “external heavy  
 atom effect” and in this case the atoms do not chemically unite  
 the phosphorescent compound.

The use of relatively high concentrations of a heavy-atom  
 perturber permits sufficient interaction between the perturber  
 345 and the analyte to produce an effective population of its triplet  
 state and thus intense phosphorescence (Figure 2). The intensity  
 of the interaction between the magnetic moment of an elec-  
 tron and the nucleus depends on the distance between them. In  
 micellar media this distance depends on the longitude of the  
 350 micellar agent chain, which is in the order of 8 to 17 Å depend-  
 ing on the micellar agent used, a distance that this new method  
 minimizes.

In this method the medium’s lack of viscosity (because no  
 organized medium is used) increases the bimolecular deactiva-  
 355 tion constant and therefore causes a concomitant decrease in  
 phosphorescence quantum efficiency. Quantum efficiency is in-  
 versely proportional to the concentration of the quencher, that  
 is, oxygen. Due to its relatively long lifetime the triple state is  
 generally prone to many deactivation processes. Nevertheless,  
 360 this drawback is counteracted by the better spin-orbital coupling  
 due to the closer proximity of the heavy-atom perturber to the

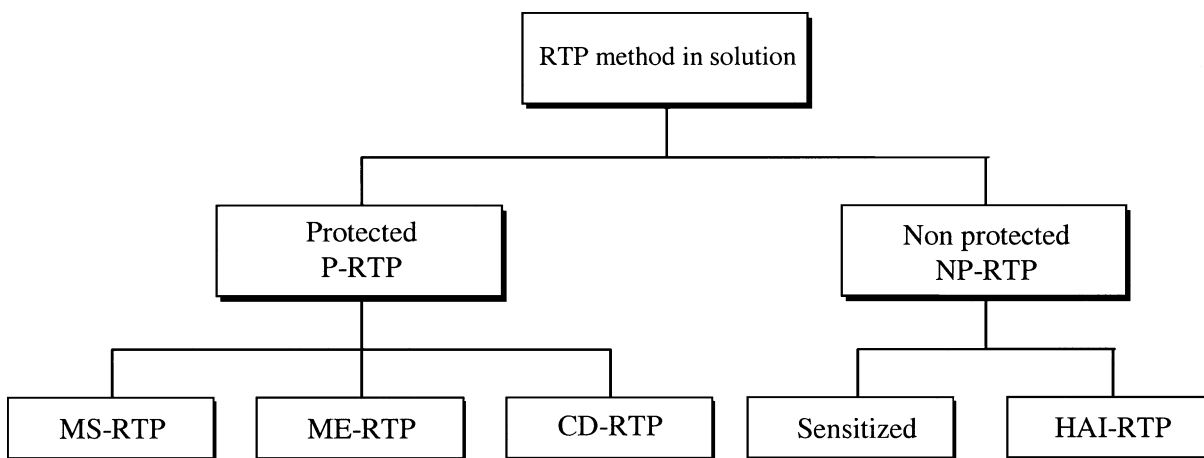


FIG. 1. Classification of RTP method in solution.

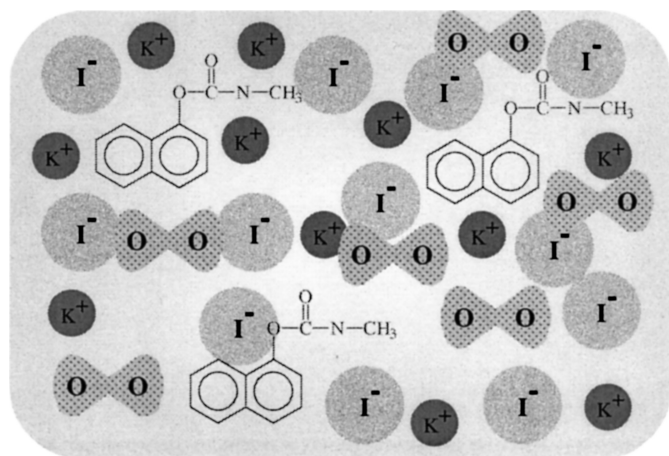


FIG. 2. Schematic representation for justification emission of heavy-atom-induced, room-temperature phosphorescence.

aromatic structures of the phosphors, and so quantum efficiency increases.

The invention of the pulse lamp and the role of modern electronics in molecular luminescence in the last 40 years have permitted the development of new more sensitive instrumentation controlled by microprocessors and multidimensional detectors (19, 20).

### Experimental Progress

In this part, the experimental progress of the method is described. The different analytes studied have been reported in Table 1.

Mou et al. (21) demonstrated that a strong, stable, RTP signal from  $\beta$ -bromonaphthalene ( $\beta$ -BrN) in an aqueous solution with a peak wavelength of  $\lambda_{\text{ex}}$  275 nm can only be induced by using  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  as an oxygen scavenger and irradiating the solution for some time with the light source of the apparatus. RTP intensity and the irradiation time required to acquire a stable RTP signal are very sensitive to the kind and amount of organic solvent added to the system. For a  $\beta$ -BrN/ $\text{Na}_2\text{SO}_3$  aqueous solution system containing 2.5% acetonitrile, a short irradiation time is needed and a strong, stable RTP signal is triggered quickly. RTP intensity was linear to the  $\beta$ -BrN concentration in the range of  $8.0 \times 10^{-8}$  to  $1.6 \times 10^{-5}$  M with a detection limit of  $4.7 \times 10^{-8}$  M.

The same authors studied the NP-RTP properties of different substituent positions of naphthylamine sulfonate (22). A strong, stable NP-RTP signal from 1-naphthylamine-4-sulfonate (1,4-ANS), 1-naphthylamine-5-sulfonate (1,5-ANS) or 2-naphthylamine-1-sulfonate (2,1-ANS) in aqueous solution can only be obtained by using  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  as deoxygenator and  $\text{TlNO}_3$  as heavy-atom perturber, and irradiating the solution for a short time with the light source of the apparatus. The detection limits with 1,4-ANS, 1,5-ANS, 2, 1-ANS were  $3.8 \times 10^{-9}$ ,  $1.4 \times 10^{-7}$  and  $2.8 \times 10^{-8}$  mol/l respectively. Under the same

conditions 1-naphthylamine-7-sulfonate and 1-naphthylamine-8-sulfonate did not emit any RTP signal.

A simple, quick, phosphorimetric method to determine residues of a plant-growth regulator,  $\alpha$ -naphthaleneacetamide, in commercial samples was proposed by Cruces Blanco et al. (23). They investigated the effects of different heavy-atom salts (KI, KBr, NaBr, NaI, RbCl, CsCl, KCl,  $\text{Cr}(\text{NO}_3)_3$ ,  $\text{CeCl}_3$ ,  $\text{InCl}_3$ ,  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ ,  $\text{La}(\text{NO}_3)_3$ ,  $\text{TlNO}_3$ ,  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ , and  $\text{AgNO}_3$ ) and sodiumsulphite concentrations upon phosphorescence signals. The resulting HAI-RTP spectra were successfully applied to the measurement of  $\alpha$ -naphthaleneacetamide concentrations in the range of 7.8 to 100.0 ng/ml, with relative standard deviations of between 2.6 percent and 5.7 percent.

Until now the research group at Tsing Hua University has only used  $\text{TlNO}_3$  as heavy-atom perturber (12, 13, 21, 22), but other heavy-atom salts can also be used to induce intersystem crossing (15, 23–25). These authors indicated that a strong, stable RTP signal can be elicited from alpha-naphthalenyloxyacetic acid ( $\alpha$ -NOA) in an aqueous solution by using  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  as deoxygenator and KI (or  $\text{TlNO}_3$ ) as heavy-atom perturber (26). The maximum phosphorescence-intensity wavelengths were found to be  $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}} = 287/495,521$  nm with KI (or  $\text{TlNO}_3$ ) as heavy-atom perturber. Although the RTP signal is lower with KI as heavy-atom perturber than it is with  $\text{TlNO}_3$  the analytical characteristics of the former method are better. The kind and amount of organic solvent added to the system has a decided effect upon RTP intensity, the irradiating time required to acquire a stable RTP signal and the choice of heavy-atom perturber.

Until now no reports on this phenomenon in compounds other than naphthalene derivatives have been published. Thus, to determine the validity of this technique and to see whether other analytes display this characteristic, the authors of this review studied the RTP emission properties of various other polycyclic, aromatic hydrocarbons such as naphthalene derivatives (naphthylacetic acid,  $\alpha$ -naphthalene acetamide, naproxen, nafrolyl, dansylamide, and carbaryl), fluorene and several nitrogen heterocyclic compounds, such as benzimidazole derivatives (thiabenzazole), carbazole, indole derivatives (tryptamine, tryptophan and indole-3-butyric acid), and an acridine derivative (9-hydroxy-4-methoxyacridine) (27). The experimental results demonstrate that it is not only naphthalene derivatives that generate RTP without a protective ordered medium but also nitrogen heterocyclic compounds. In this work we show the value of applying this new RTP method to analysing different kinds of compounds and to understanding the principles of HAI-RTP emission in order to apply it to other different fields such as environmental, clinical or pharmaceutical chemistry. We detail the phosphorescence spectral characteristics of these compounds (excitation and emission wavelengths and lifetime) and the optimization of the chemical variables involved in the phosphorescence phenomenon in solution. Calibration graphs and the detection limit at the ng/mL level have been established under optimum experimental conditions.

450 In 2000, a new Spanish research group from the Univer-  
sity of Castilla La Mancha proposed a method to determine  
1-naphthoxylic acid (28) by obtaining a phosphorescence signal  
from this analyte ( $\lambda_{exc/em}$  295/491, 527 nm) with no protec-  
455 tive medium, using  $TiNO_3$  ( $6.5 \times 10^{-2}$  M) as heavy-atom per-  
turbur and  $Na_2SO_3$  ( $1.5 \times 10^{-2}$  M) as deoxygenator (pH 7.5).  
Optimization of the operational conditions resulted in a detec-  
tion limit for 1-naphthoxylic acid of 9.6 ng/ml according to  
the error propagation theory.

To improve the applicability of this methodology, Li et al.  
460 (29) engaged in different studies into polycyclic aromatic hy-  
drocarbons. These authors reported that it is possible to obtain  
an intense, stable phosphorescent signal from fluorene and ace-  
naphthene in an aqueous solution containing one percent ace-  
tonitrile using only  $Na_2SO_3$  as oxygen scavenger and KI as  
465 heavy-atom perturber. The detection limits calculated by IUPAC  
based on three times the standard deviation of the background  
were  $8.6 \times 10^{-8}$  and  $9.0 \times 10^{-8}$  M for fluorene and acenaphthene,  
respectively. The relative standard deviations ( $n = 7$ ) were 2.4  
percent and 3.5 percent for the systems containing  $1.2 \times 10^{-5}$   
470 M of fluorene or acenaphthene.

These authors also studied the NP-RTP properties of  $\alpha$ -  
naphthoxylic acid ( $\alpha$ -NOA) and  $\beta$ -naphthoxylic acid ( $\beta$ -NOA)  
and the effects of organic solvents to clarify the effects of the  
position of the substituent upon luminescence  
475 (30). Aqueous solutions of both acids emitted strong, stable RTP  
signals in the absence of any protecting medium upon the addi-  
tion of KI or  $TiNO_3$  as heavy-atom perturber and  $Na_2SO_3$  as  
deoxygenator. The fluid RTP systems were completely transpar-  
ent and stable. Satisfactory linearity between concentration and  
480 RTP intensity was obtained with detection limits of  $1.0 \times 10^{-8}$   
and  $1.2 \times 10^{-8}$  M for  $\alpha$ - and  $\beta$ -naphthoxylic acid, respec-  
tively. The kind and quantity of organic solvent added to the  
luminescent system not only affected RTP intensity and the pre-  
irradiation time required to attain a stable RTP signal but also the  
485 selection of heavy-atom perturber. Under the same conditions  
the RTP intensity of the system using  $TiNO_3$  was much stronger  
than that of the system using KI, but the detection limits of both  
systems for analytical determination were comparable. The RTP  
intensity of  $\beta$ -NOA was lower than that of  $\alpha$ -NOA but the influ-  
490 ence of the organic solvent on its RTP emission was also less.

These authors also studied the phosphorescence emission of  
pyrene in solution and found that the delayed excimer fluores-  
cence signal located at 475 nm could be induced in the absence  
of any protective medium using only KI or  $TiNO_3$  as heavy-  
495 atom perturber and  $Na_2SO_3$  as deoxygenator (31). The optimum  
conditions and effects of the kind and quantity of heavy-atom  
perturber and organic solvents used upon the luminescence prop-  
erties of the pyrene solution (0.01 M of  $Na_2SO_3$  and 0.095 M of  
 $TiNO_3$ ) were studied and a detection limit of  $2 \times 10^{-8}$  M was  
500 obtained.

505 Murillo et al. reported on the direct determination of nafto-  
pidil (4-(2-methoxyphenyl)- $\alpha$ -[1-naphthalenyloxy)methyl]-  
1-piperazineethanol) via this method (32), by which they

obtained a phosphorescence signal using  $TiNO_3$  (0.085 M) as  
heavy-atom perturber and  $Na_2SO_3$  (0.05 M) as deoxygenator. 505  
Under these conditions naftopidil emits phosphorescence at an  
emission wavelength of 526 nm and an excitation wavelength  
of 296 nm in the range of 0.05 to 1.00 mg/l. Optimization of  
the various conditions led to their obtaining a detection limit of  
21.0 ng/ml according to the error propagation theory. 510

The phosphorescent characteristics of phenanthrene have  
been researched by Chen et al. (33). These authors described  
a strong, stable RTP signal from phenanthrene in an aqueous  
solution (482 and 504 nm, exciting at 283 nm) in the absence of  
any protecting medium, using  $Na_2SO_3$  and KI, and established 515  
a method with a detection limit of  $2.6 \times 10^{-8}$  M.

Although the phosphorescent characteristics of naphtha-  
lene derivatives have already been established (16), the kinetic  
parameters of their phosphorescent emission using this new  
method have not so far been reported. The influence of the con- 520  
centration of heavy-atom perturber on the RTP lifetime of sev-  
eral naphthalene derivatives has been studied and two different  
ways set out of proving that the photophysical parameters for  
RTP emission can be determined on the basis of changes in RTP  
lifetimes (34). 525

1-Chloronaphthalene and 1-bromonaphthalene were chosen  
as the modal compounds and the possibility of determining the  
photophysical parameters for the emission of NP-RTP according  
to RTP lifetime method was studied based on the definition of  
phosphorescence lifetime and its relationship with the concen- 530  
tration of PAH (35). The results obtained in two different ways  
prove that the RT-lifetime method can be used to determine the  
photophysical parameters for RTP emission.

NP-RTP has been applied by Murillo et al. (36) to the de- 535  
termination of naftopidil in biological fluids. Optimum condi-  
tions were found to be 1.4 M of KI, 0.005 M  $Na_2SO_3$  and pH  
6.5. This method has been successfully applied to the analy-  
sis of naftopidil in human serum and urine with recoveries of  
104.0  $\pm$  0.6 percent and 106.0  $\pm$  1.0 percent, respectively.

A direct and simple RTP to determine propranolol was pro- 540  
posed by Wen-Qing Long et al., who used KI as heavy-atom 545  
perturber and sodium sulphite as deoxygenator. They looked  
into the effect of the concentration of KI upon RTP lifetime and  
calculated the luminescence kinetic parameters. The method was  
applied directly to urine and drug tablets and the recoveries were  
between 96.6 percent and 97.4 percent, with a relative standard  
deviation of 2 percent for  $1.0 \times 10^{-6}$  to  $4.0 \times 10^{-6}$  mol/l pro-  
pranolol in a spiked urine sample (37).

Chen et al. (38) studied the properties of fluorescence and  
NP-RTP and the cation recognition of 1-naphthylamine diacetic 550  
acid (NADA) with  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ , and  $Tl^{+}$ . The  
maximun phosphorescence intensity wavelengths are  $\lambda_{exc/em} =$   
321/571 nm, using  $Na_2SO_3$  as deoxidisation and  $TiNO_3$  as heavy  
atom perturber.

A modified simplex method (MSM) has been ap- 555  
plied to the determination of dependent variables affecting  
phosphorescence. We determined naftopidil in urine and serum

(39). The best conditions obtained were 1.4 M of KI,  $7.5 \times 10^{-3}$  of  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  and  $5.0 \times 10^{-2}$  M of  $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$  buffer solution. The recoveries were  $103.8 \pm 0.8$  percent in urine and  $99.5 \pm 0.5$  percent in serum, which are better results than those obtained by using HAI-RTP followed by the classical optimisation. This research group studied the appropriate experimental conditions for the determination of 4-methylpropranolol in cerebrospinal fluid, serum and urine (40). The detection limit, according to the error propagation theory, was 6.2 ng/mL. The optimum concentration of KI was 3.2 M,  $\text{Na}_2\text{SO}_3$   $7.0 \times 10^{-3}$  M and the accurate value pH 10.9.

A strong and stable signal RTP ( $\lambda_{\text{exc/em}} = 285/495,523$  nm) can be induced for carbaryl (CBL) aqueous solution in the absence of any protective medium only using KI as a heavy atom perturber and sodium sulphite as a deoxygenator (41). The method presents a detection limit of 0.9 ng/ml. The methods was applied satisfactorily to spiked water and soil samples. The influence of KI concentration on RTP lifetime of CBL was studied in detail.

Segura Carretero et al. (42) recently published the direct determination of propranolol by HAI-RTP. The phosphorescence intensity was measured at 492 nm, exciting at 294 nm. The method presents a linear concentration range of between 0 and 500 ng/ml with a detection limit of 14.4 ng/ml and an analytical sensitivity of 6.7 ng/ml. The method was applied satisfactorily to a commercial product, with a recovery percentage of 98.8 and an RSD of 0.6 percent. The method was also validated with a standard addition method of calibration.

Other compounds also have been studied for a thesis in our research group (43).

## REFERENCES

1. C. A. Parker and C. G. Hatchard, *J. Phys. Chem.* 30 (1962):276.
2. C. A. Parker, *Chem. Commun.* 13 (1968):749.
3. W. D. K. Clark, A. D. Litt, and C. Steel, *J. Am. Chem. Soc.* 91 (1969):5413.
4. R. B. Bonner, M. K. DeArmond, and G. H. Wahl GH Jr., *J. Am. Chem. Soc.* 94 (1972):988.
5. J. N. Demas and G. A. Crosby, *J. Phys. Chem.* 75 (1971):991.
6. J. W. Bridges, in *Standards in fluorescence spectrometry*, ed. J. N. Miller (London: Chapman and Hall, 1981).
7. J. J. Donkerbroek, J. J. Elzas, C. Gooijer, R. W. Frei, and N. H. Velthorst, *Talanta* 28 (1981):717.
8. N. J. Turro Modern molecular photochemistry, Redwood City, CA: Benjamin-Cummings (1978), p. 129.
9. J. J. Donkerbroek, C. Gooijer, N. H. Velthorst, and R. W. Frei, *Anal. Chem.* 54 (1982):891.
10. J. J. Donkerbroek, N. J. R. Van Eikema Hommes, C. Gooijer, N. H. Velthorst, and R. W. Frei, *J. Chromatogr.* 255 (1983):581.
11. L. D. Li and W. G. Huang, *Anal. Chim. Acta* 312 (1995):345.
12. L. D. Li, Y. D. Chen, and A. J. Tong, *Huaxue Tongbao* 6 (1996):46.
13. L. D. Li, Y. D. Chen, Y. Zhao, and A. J. Tong, *Anal. Chim. Acta* 341 (1997):241.
14. A. Segura Carretero, C. Cruces Blanco, and A. Fernández Gutiérrez, *Talanta* 43 (1996):1001.
15. A. Segura Carretero, C. Cruces Blanco, B. Cañabate Díaz, and A. Fernández Gutiérrez, *Anal. Chim. Acta* 361 (1998):217.
16. L. D. Li, Y. Zhao, Y. G. Wu, and A. J. Tong, *Talanta* 46 (1998):1147.
17. D. McClure, *J. Chem. Phys.* 17 (1949):905.
18. M. Kasha, *J. Chem. Phys.* 20 (1952):71.
19. R. J. Hurtubise, *Phosphorimetry: Theory, instrumentation and applications*, VCH, New York, 1990.
20. G. W. Ewing, *Analytical instrumentation handbook*, 2nd edn. (New York: Macer Dekker, 1997).
21. L. Mou, X. K. Chen, and L. D. Li, *Chem. J. Chinese U.* 20 (1999):214.
22. L. Mou, X. L. Chen XL, and L. D. Li, *Chinese J. Anal. Chem.* 27 (1999):509.
23. C. Cruces Blanco, A. Segura Carretero, M. I. Ramírez García, and A. Fernández Gutiérrez, *Inter. J. Environ. Anal. Chem.* 75 (1999):377.
24. A. Segura Carretero, C. Cruces Blanco, and A. Fernández Gutiérrez, *J. Agr. Food Chem.* 46 (1998):3683.
25. A. Fernández Gutiérrez, A. Segura Carretero, B. Cañabate Díaz, and C. Cruces Blanco, *Appl. Spectrosc.* 53 (1999):741.
26. X. K. Chen, L. Mou, and L. D. Li, *Chem. J. Chinese U.* 20 (1999):1052.
27. A. Segura Carretero, C. Cruces Blanco, B. Cañabate Díaz, J. F. Fernández Sánchez, and A. Fernández Gutiérrez, *Anal. Chim. Acta* 417 (2000):19.
28. J. A. M. Pulgarín and A. A. Molina, *Fresenius J. Anal. Chem.* 368 (2000):505.
29. L. D. Li, L. Mou, and X. K. Chen, *Chem. J. Chinese U.* 21 (2000):1040.
30. L. D. Li, X. K. Chen, L. Mou, W. Q. Long, and A. J. Tong, *Anal. Chim. Acta* 424 (2000):177.
31. L. D. Li, Z. X. Zhang, W. Q. Long, and A. J. Tong, *Spectrochim. Acta A* 57 (2001):385.
32. J. A. M. Pulgarín, A. A. Molina, and M. T. A. Pardo, *Analyst* 126 (2001):234.
33. X. K. Chen, L. Mou, and L. D. Li, *Spectrosc. Spect. Anal.* 21 (2001):215.
34. L. D. Li, W. Q. Long, and A. J. Tong, *Spectrochim. Acta A* 57 (2001):1261.
35. W. Q. Long, L. D. Li, and A. J. Tong, *Spectrosc. Spect. Anal.* 21 (2001):443.
36. J. A. M. Pulgarín, A. A. Molina, and M. T. A. Pardo, *Fresenius J. Anal. Chem.* 371 (2001):903.
37. W. Q. Long, Z. X. Zhang, and L. D. Li, *Spectrochim. Acta A* 58 (2002):2185.
38. X. K. Chen and L. D. Li, *Chinese J. Anal. Chem.* 30 (2002):897.
39. J. A. M. Pulgarín, A. A. Molina, and M. T. A. Pardo, *Talanta* 57 (2002):795.
40. J. A. M. Pulgarín, A. A. Molina, and M. T. A. Pardo, *Anal. Biochem.* 306 (2002):270.
41. W. P. Long, L. D. Li, and A. J. Tong, *Chinese J. Anal. Chem.* 30 (2002):1201.
42. A. Segura Carretero, C. Cruces Blanco, B. Cañabate Díaz, and A. Fernández Gutiérrez, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 30 (2002):987.
43. B. Cañabate Díaz, Doctoral Thesis, University of Granada (2001).
44. L. Cuadros Rodríguez, A. M. García Campaña, C. Jiménez Linares, and M. Román Ceba, *Anal. Lett.* 26 (1993):1243.
45. IUPAC, *Pure Appl. Chem.* 105 (1976):45.

**ANEXO II**





A. Salinas-Castillo · A. Segura Carretero  
A. Fernández-Gutiérrez

## Sensitive and simple determination of the vasodilator agent dipyridamole in pharmaceutical preparations by phosphorimetry

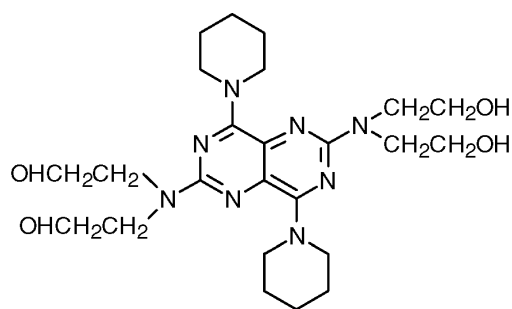
Received: 28 March 2003 / Revised: 28 April 2003 / Accepted: 9 May 2003 / Published online: 27 June 2003  
© Springer-Verlag 2003

**Abstract** The applicability of heavy atom-induced room-temperature phosphorescence to pharmaceutical samples is demonstrated in this work. Thus a new, simple, rapid, and selective phosphorimetric method for dipyridamole determination is proposed. The phosphorescence signals are a consequence of intermolecular protection when analytes are exclusively in the presence of heavy atom salts and sodium sulfite as an oxygen scavenger to minimize RTP quenching. The determination was performed in  $0.1 \text{ mol L}^{-1}$  thallium(I) nitrate and  $8 \text{ mmol L}^{-1}$  sodium sulfite at a measurement temperature of  $20^\circ\text{C}$ . The phosphorescence intensity was measured at  $635 \text{ nm}$ , with excitation at  $305 \text{ nm}$ . Phosphorescence was easily developed; a linear concentration range was obtained between  $0$  and  $100 \text{ ng mL}^{-1}$  with a detection limit of  $940 \text{ ng L}^{-1}$ , an analytical sensitivity of  $2.5 \text{ ng mL}^{-1}$ , and a standard deviation of  $2.7\%$  at  $60 \text{ ng mL}^{-1}$  concentration. The method has been successfully applied to the analysis of dipyridamole in a unique Spanish commercial formulation containing  $100 \text{ ng mL}^{-1}$  per capsule. The recovery was  $101.6\%$  with  $6.5\%$  standard deviation of analytical measurement. The method using the standard addition methodology has been validated.

**Keywords** Pharmaceutical analysis · Dipyridamole · Heavy atom-induced · Room temperature phosphorescence (RTP)

### Introduction

Dipyridamole (2,2',2'',2'''-{4,8-dipiperidinopyrimino[5,4-d]pyrimidine-2,6-diyl}dinitrilo}tetraethanol) (Fig. 1). Is an important vasodilator agent that is widely used in medicine. It stops platelets (blood cells necessary for blood clotting) from sticking together or becoming attached to pros-



**Fig. 1** Structure of dipyridamole

thetic heart-valve surfaces and is used to prevent the formation of blood clots following heart valve replacement surgery. Unfortunately, it is consumed fraudulently in certain sports to improve efficiency and decrease tiredness. Nevertheless, the uncontrolled use of this drug could cause loss of mental power and serious secondary effects which could cause grave danger for health.

Dipyridamole has been conventionally determined by HPLC methods [1, 2]. Although HPLC methods have several advantages, one serious problem for the determination of this compound in biological fluids is in preliminary procedures applied to the sample, such as extraction and concentration in organic solvents. Several spectrophotometric methods [3, 4] and fluorimetric methods [5, 6] have been described.

Phosphorimetry is more sensitive and selective than photometry or fluorimetry for the analysis of many compounds. Micelle-stabilized room temperature phosphorescence (RTP) combined with sodium sulfite as an oxygen scavenger has permitted the determination of dipyridamole in different matrices in solution [7, 8].

On the other hand, recent studies have demonstrated that RTP emission of naphthalene derivatives and heterocyclic compounds can be directly induced in aqueous solutions by addition of high concentrations of a heavy atom perturber and sodium sulfite as a chemical deoxygenator [9, 10, 11, 12]. This methodology, named heavy atom induced room temperature phosphorescence (HAI-RTP),

A. Salinas-Castillo · A. S. Carretero (✉) · A. Fernández-Gutiérrez  
Department of Analytical Chemistry, Faculty of Sciences,  
University of Granada, C/ Fuentenueva s/n, 18071 Granada, Spain  
e-mail: ansegura@ugr.es

has been applied to the determination of naphazoline, nafnyl, or propranolol in pharmaceutical preparations [13, 14, 15] and some pesticides in vegetables matrices [16, 17].

In this work a simple, selective, and fast phosphorimetric method is proposed for dipyrindamole determination in a unique commercial formulation in Spain (Persantin).

## Experimental

### Instrumentation

A Varian Cary–Eclipse fluorescence spectrofluorimeter (Varian Iberica, Madrid, Spain) was used to measure relative phosphorescence intensity (R.P.I.). The spectrofluorimeter was equipped with a xenon discharge lamp (75 kW), Czerny–Turner monochromators, R-928 photomultiplier tube which is red-sensitive (even at 900 nm), and manual or automatic voltage control using Cary–Eclipse software for Windows 95/98/NT systems.

### Reagent and solutions

Analytical reagent-grade chemicals were employed for preparation of all solutions. Thallium(I) nitrate, potassium iodide, and anhydrous sodium sulfite were purchased from Sigma and were used as received. Solutions of potassium iodide ( $2 \text{ mol L}^{-1}$ ) and thallium nitrate ( $0.25 \text{ mol L}^{-1}$ ) were prepared. Sodium sulfite solutions ( $0.1 \text{ mol L}^{-1}$ ) were prepared daily and kept in tightly stoppered containers.

Stock standard solution ( $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) of dipyrindamole (Sigma) was prepared in acetone, stored below  $5^\circ\text{C}$  and protected from the light.

The water used was twice distilled and prepared with a Milli-Q system (Millipore, Bedford, MA, USA).

### General procedure

A  $10 \mu\text{L}$  aliquot of dipyrindamole stock solution in acetone with  $4 \text{ mL}$  of  $0.25 \text{ mol L}^{-1}$  thallium(I) nitrate and  $800 \mu\text{L}$  of  $0.1 \text{ mol L}^{-1}$  sodium sulfite were introduced into a  $10 \text{ mL}$  calibrated flask and made up to volume with twice distilled water. Standard  $10 \text{ mm}$  quartz cells were used in all cases.

The relative phosphorescence intensities (R.P.I.) of the samples and the corresponding blanks were measured at the phosphorescence wavelength maxima of  $\lambda_{\text{exc}}/\lambda_{\text{em}}$  305/635 nm,  $\text{slits}_{\text{exc/em}}$  20/20 nm, decay time  $0.120 \text{ ms}$ , gate time  $2.5 \text{ ms}$  and detector voltage  $950 \text{ V}$ .

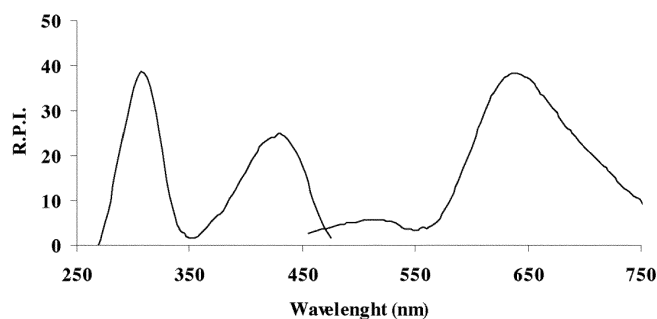
### Sample preparation

The proposed method has been applied to the analysis of dipyrindamole in a commercial pharmaceutical preparation called Persantin 100 mg (Boehringer Ingelheim). The nominal content per tablet is  $100 \text{ mg}$  dipyrindamole accompanied by  $49.2 \text{ mg}$  saccharose and excipients (phosphate of anhydrous monocalcium, maize starch, colloidal anhydrous silica, estearate of magnesium, talc, gum arabic, titanium dioxide (E 171), macrogol 6000, wax whitened and wax carnauba) without indication of their concentrations. Five tablets were powdered, mixed, and homogenised and the powder was taken for analysis. A portion was dissolved in acetone and several aliquots of this solution were treated as indicated under "General procedure".

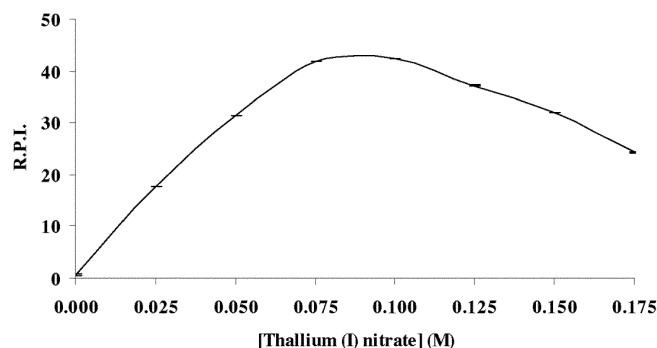
## Results and discussion

### Phosphorescence properties

Figure 2 shows the excitation and phosphorescence emission spectra of dipyrindamole in aqueous solution. Dipyrin-



**Fig. 2** Spectrum of dipyrindamole.  $[\text{Dipyrindamole}] = 50 \text{ ng mL}^{-1}$ ,  $[\text{TlNO}_3] = 0.100 \text{ mol L}^{-1}$ ,  $[\text{Na}_2\text{SO}_3] = 8 \text{ mmol L}^{-1}$ . Excitation and emission wavelengths 220–500 nm and 450–800 nm respectively,  $\text{slits}_{\text{exc/em}}$  20/20 nm,  $t_{\text{d/g}}$  0.120/2.5 ms and detector voltage 950 V



**Fig. 3** Influence of thallium(I) nitrate concentration on the HAI-RTP of dipyrindamole.  $[\text{Dipyrindamole}] = 50 \text{ ng mL}^{-1}$ ,  $[\text{Na}_2\text{SO}_3] = 8 \text{ mmol L}^{-1}$ .  $\lambda_{\text{exc}}/\lambda_{\text{em}} = 305/635 \text{ nm}$ ; other instrumental parameters as Fig. 2

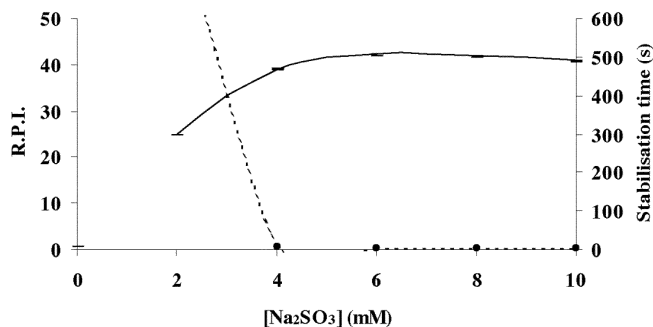
damole emits phosphorescence with a maximum excitation at 305 nm and maximum emission at 635 nm. In these experimental conditions the half-life of the dipyrindamole phosphorescence emission is  $446 \mu\text{s}$ .

Different instrumental parameters related to the luminescence technique affect the phosphorescence response, so they were carefully selected. All these optimal instrumental parameters were kept constant for the rest of the experimental work.

### Influence of heavy atom perturbers

The kind and concentration of heavy atom affect the intensity of the HAI-RTP signal. In this report the effects of two heavy atom salts, KI and  $\text{TlNO}_3$ , have been studied, but only  $\text{TlNO}_3$  permits observation of the phosphorescence signal.

As can be observed in Fig. 3, it was proved that no phosphorescence response of the analyte was obtained in the total absence of  $\text{TlNO}_3$  while, in general, the HAI-RTP intensity increased with increasing heavy atom concentration to  $0.100 \text{ mol L}^{-1}$ . This value was chosen as optimum for the rest of experimental work.



**Fig. 4** I.R.P. (continuous line) and stabilisation time (dashed line) influence of sodium sulfite concentration on the HAI-RTP of dipyrindamole. [Dipyrindamole]=50 ng mL<sup>-1</sup> and [TlNO<sub>3</sub>]=0.100 mol L<sup>-1</sup>.  $\lambda_{\text{exc}}/\lambda_{\text{em}}=305/635$  nm; other instrumental parameters as Fig. 2

### Influence of deoxygenation

In this work, sodium sulfite was selected as the deoxygenation scavenger. Although with this methodology in aqueous solution elimination of dissolved oxygen is practically immediate, both the relative phosphorescence intensity and the stabilization time (time necessary for sample deoxygenation) can change with sodium sulfite concentration. This study was performed by monitoring the signal as a function of time until the HAI-RTP signal was stabilised for at least 2 min. To find the optimum concentration of sodium sulfite, different amounts between 1.0 and 10.0 mmol L<sup>-1</sup> were added to a solution with a fixed concentration of dipyrindamole in the presence of thallium(I) nitrate at the optimum concentration. A 8.0 mmol L<sup>-1</sup> sodium sulfite solution was selected as optimal (Fig. 4).

### Effect of organic solvents

The effect of the different percentages of organic solvents (acetone, acetonitrile, ethanol, methanol, and dimethylformamide) was studied in order to improve phosphorescent measurements and facilitate the solubilization of dipyrindamole.

The study carried out demonstrated that no changes in relative phosphorescence intensity using acetone up to 10% and acetonitrile up to 20% were observed. However a small percentage of ethanol, methanol and dimethylformamide cause important phosphorescence quenching.

A percentage of 0.05% of acetone was chosen.

### Stability

Under these experimental conditions, phosphorescence signals for the dipyrindamole were obtained instantaneously and remained stable for, at least, one hour.

**Table 1** Analytical parameters

Slope		0.752
Standard deviation of slope		0.013
Intercept		2.410
Standard deviation of intercept		0.793
Correlation coefficient		0.998
Linear range (ng mL <sup>-1</sup> )		0–100
Sensitivity (ng mL <sup>-1</sup> )		2.5
Detection limit (ng L <sup>-1</sup> )		940
Quantification limit (ng mL <sup>-1</sup> )		3.2
R.S.D. (%)	20 ng mL <sup>-1</sup>	8.5
	40 ng mL <sup>-1</sup>	4.1
	60 ng mL <sup>-1</sup>	2.7
	80 ng mL <sup>-1</sup>	2.0
	100 ng mL <sup>-1</sup>	1.8

### Calibration, sensitivity, and precision

Analytical performance characteristics of the proposed method were evaluated. A standard calibration graph was prepared according to recommended procedure. The wide linear range, small standard errors and correlation coefficient indicate excellent calibration linearity. The detection and quantification limit have been calculated according to IUPAC [18]. Sensitivity and precision, expressed as relative standard deviation, were determined using the method proposed by Cuadros Rodríguez [19]. Three replicates for the dipyrindamole solution of 0, 20, 40, 60, 80 and 100 ng mL<sup>-1</sup> were taken in order to set up the calibration. All the features of the proposed method are summarised in Table 1.

### Analytical applications

The proposed procedure was satisfactorily applied to the determination of dipyrindamole in a unique Spanish pharmaceutical preparation. Seven samples were analysed using the phosphorimetric method described above. The concentration obtained was 101.6 mg/pill (recovery 101.6%) and RSD of 6.5%. Also the method has been validated by the standard addition method. To check the similarity of slopes, a Student *t*-test was used. The statistic for slopes calculated was 2.250 while the statistic for slopes tabulated was 2.845 for 20 degrees of freedom and  $\alpha=0.01$ . Therefore, the slopes are essentially the same. In this case, the concentration obtained was 109.9 mg/pill (recovery 109.9%).

### Conclusions

In this work it has been demonstrated that heavy atom-induced room-temperature phosphorimetry methodology enhances sensitivity and selectivity in the analysis of small amounts of chemicals in pharmaceutical preparations. The proposed method can be recommended for routine determination of dipyrindamole.

**Acknowledgement** The authors gratefully acknowledge the financial support of Fundación UNICAJA and Ministerio de Ciencia y Tecnología (project PPQ 2000-1291-C01-01 ).

---

## References

1. Wolfram KM, Bjornsson TD (1980) *J Chromatogr* 183:57–64
2. Rosenfeld J, Devereaux D (1982) *J Chromatogr* 231:216–221
3. Mahrous MS, Issa AS, Soliman N (1986) *Anal Lett* 19:901–914
4. Baray M, Abdel-hady M, ElSayed M, Mohamed S (1989) *Anal Lett* 22:1643–1664
5. Murillo Pulgarin JA, Alañon Molina A, Fernández López P (1997) *Anal Biochem* 245:8–16
6. Ruiz Medina A, Fernández de Cordova ML, Molina Díaz A (2001) *Eur J Pharm Sci* 13:385–391
7. Murillo Pulgarin JA, Alañon Molina A, Fernández López P (1997) *Analyst* 122:253–258
8. Muñoz de la Peña A, Espinosa Mansilla A, Murillo Pulgarin JA (1999) *Talanta* 48:1061–1073
9. Li L, Chen Y, Zhao Y, Tong A (1997) *Anal Chim Acta* 341:241–249
10. Li L, Zhao Y, Yingguang W, Tong A (1998) *Talanta* 46:1147–1154
11. Segura Carretero A, Cruces Blanco C, Cañabate Díaz B, Fernández Gutiérrez A (1998) *Anal Chim Acta* 361:217–222
12. Segura Carretero A, Cruces Blanco C, Cañabate Díaz B, Fernández Sánchez JF, Fernández Gutiérrez A (2000) *Anal Chim Acta* 417:19–30
13. Fernández Gutiérrez A, Segura Carretero A, Cañabate Díaz B, Cruces Blanco C (1999) *Appl Spectrosc* 53:741–744
14. Cruces Blanco C, Segura Carretero A, Fernández Sánchez JF, Fernández Gutiérrez A (2000) *J Pharm Biomed Anal* 23:845–850
15. Cañabate Díaz B, Cruces Blanco C, Segura Carretero A, Fernández Gutiérrez A (2002) *J Pharm Biomed Anal* 30:987–992
16. Segura Carretero A, Cruces Blanco C, Fernández Gutiérrez A (1998) *J Agric Food Chem* 46:3683–3686
17. Segura Carretero A, Cruces Blanco C, Fernández Sánchez JF, Cañabate Díaz B, Fernández Gutiérrez A (2000) *J Agric Food Chem* 48:4453–4459
18. IUPAC (1976) *Pure Appl Chem* 105:45
19. Cuadros Rodríguez L, García Campaña AM, Jiménez Linares C, Román Ceba M (1993) *Anal Lett* 26:1243–1256

**ANEXO III**





---

**NO QUERIES**

---



## A simple and rapid phosphorimetric method for the determination of the fungicide fuberidazole in water samples

ALFONSO SALINAS†, JORGE F. FERNÁNDEZ-SÁNCHEZ‡, ANTONIO SEGURA†\* and ALBERTO FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ†

†Department of Analytical Chemistry, Faculty of Sciences, University of Granada, C/Fuentenueva s/n, 18071 Granada, Spain  
‡Centre for Chemical Sensors, Swiss Federal Institute of Technology Zurich (ETHZ), Technoparkstrasse 1, CH-8005 Zürich, Switzerland

(Received 21 September 2004; in final form 25 November 2004)

The applicability of heavy-atom induced room-temperature phosphorescence to determine pesticides in real samples is demonstrated in this work. Thus a new, simple, rapid and selective phosphorimetric method for fuberidazole determination is proposed. The phosphorescence signals are a consequence of intermolecular protection when analytes are found exclusively in the presence of heavy atom salts and sodium sulphite when used as an oxygen scavenger to minimize RTP quenching, so protective media (such as cyclodextrines, micellar media, etc) are not necessary to use for obtaining phosphorescence in solution. The determination was performed in 0.4 M KI and 8 mM sodium sulphite at a measurement temperature of 20°C. The phosphorescence intensity was measured at 515 nm exciting at 308 nm. Phosphorescence was easily and rapidly obtained, showing a linear concentration range between 0 and 25 ng mL<sup>-1</sup> with a detection limit of 95 ng L<sup>-1</sup>. The method has been successfully applied to the analysis of fuberidazole in water.

*Keywords:* Pesticide analysis; Fuberidazole; Heavy atom induced; Room temperature phosphorescence; Water

### 1. Introduction

Pesticides are one of the major organic pollutants in the environment due to their massive use in agriculture. The tolerable concentrations demanded by regulatory authorities for potential access routes in tropic chains are becoming stricter and stricter. Therefore, it is essential to develop sensitive, selective, automatic and rapid analytical methodologies as real and practical alternatives to the robust and efficient chromatographic methods, which are time consuming, instrumentally expensive, ill-suited to real time analysis and usually require a pre-treatment of the samples.

---

\*Corresponding author. Fax: +34-958249510. Email: ansegura@ugr.es

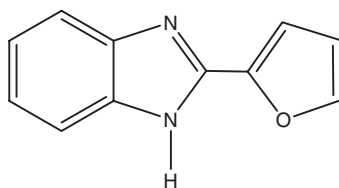


Figure 1. Chemical structure of fuberidazole.

2-Substituted benzimidazole is the most important class of benzimidazoles used in agriculture (see figure 1). Fuberidazole (2-(2'-furyl)benzimidazole, FBZ) has been applied as a fungicide [1–3], as an anthelmintic [4, 5] and against entero-viruses [6].

Several spectrofluorometric methods for the individual determination of FBZ [7, 8] or simultaneously [9–11] with other pesticides have been developed.

Phosphorimetry is more selective than photometry or fluorimetry for the analysis of many compounds. Thus micelle-stabilized RTP has permitted the determination of FBZ in different matrices in solution [12].

However, recent studies have demonstrated that RTP emission of naphthalene derivatives and heterocyclic compounds can be directly induced in aqueous solutions only with the addition of perturbed heavy atom and sodium sulphite as a chemical deoxygenator [13–16]. This methodology is called heavy-atom induced room-temperature phosphorescence (HAI-RTP) and has been applied to pharmaceutical analysis [17, 18] and some pesticides in vegetables matrices [19, 20]. The methodology offers many advantages compared to other RTP techniques, and allows the development of a very simple, fast and possibly automatic analytical method.

In this work a simple, selective and fast phosphorimetric method is proposed for fuberidazole determination in water.

## 2. Experimental

### 2.1. Instrumentation

A Varian Cary-Eclipse fluorescence spectrophosphorimeter (Varian Iberica, Madrid, Spain) was used to obtain the phosphorescence spectra and the relative phosphorescence intensity (R.P.I.) measurements. The spectrophosphorimeter was equipped with a xenon discharge lamp (peak power equivalent to 75 kW), Czerny-Turner monochromators, R-928 photomultiplier tube which is red sensitive (even 900 nm) with manual or automatic voltage controlled using the Cary Eclipse software for Windows 95/98/NT system.

### 2.2. Reagent and solutions

Analytical reagent-grade chemicals were used for preparing all the solutions. Thallium (I) nitrate, potassium iodide and anhydrous sodium sulphite were purchased from Sigma Chemical Co. (Spain) and were used as received. Two moles solution potassium iodide and thallium nitrate solution at 0.25 M concentration was prepared. The 0.1 M sodium sulphite solutions were prepared daily and kept in tightly closed containers.

Standard stock solution ( $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) of fuberidazole (Sigma Chemical Co) was prepared in water, stored below  $5^\circ\text{C}$  and protected from the light.

The water used was doubly distilled and prepared with a Milli-Q system (Millipore, Bedford, MA, USA).

### 2.3. General procedure

Aliquots of fuberidazole stock solution in water with 2 mL of 2 M of potassium iodide, 3 mL acetonitrile and  $800 \mu\text{L}$  of 0.1 M sodium sulphite were introduced into a 10 mL calibrated flask and made up to volume with doubly distilled water. Standard 10 mm quartz cells were used in all cases.

The relative phosphorescence intensities (R.P.I.) of the samples and the corresponding blanks were measured at the phosphorescence wavelength maxima of  $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}$  308/515 nm, slits<sub>ex/em</sub> 20/20 nm, decay time 0.10 ms, gate time 5.00 ms and detector voltage 950 V. Reagent blanks lacking fuberidazole were prepared and measured following the same procedure.

### 2.4. Water sample procedure

Drinking water samples from the city of Granada and mineral water samples were spiked at three different concentration levels to obtain final diluted samples containing 2.4, 10.0 and  $20.0 \text{ ng mL}^{-1}$  of pesticide. These three levels of pesticide concentrations are within the calibration graphs previously established for fuberidazole determination. The samples were measured as indicated in the General Procedure and no pre-treatment was necessary.

## 3. Results and discussion

### 3.1. Phosphorescence properties

Figure 2 shows the excitation and phosphorescence emission spectra of fuberidazole in aqueous solution in the presence of KI and sodium sulphite. Fuberidazole emits phosphorescence with a maximum excitation at 308 nm and a maximum emission at 515 nm. In these experimental conditions, the half life-time of the fuberidazole phosphorescence emission is  $172 \mu\text{s}$ .

### 3.2. Influence of heavy atom perturbers

Various kinds and concentrations of heavy atoms affect the intensity of the HAI-RTP signal. We present the effects of two heavy atom salts, KI and  $\text{TlNO}_3$  in this paper. Fuberidazole only emits phosphorescence when KI is used as a heavy-atom perturber.

As can be observed in figure 3, no phosphorescence response of the FBZ was obtained in the total absence of KI while, in general, the HAI-RTP intensity increased with increasing heavy atom concentration until a concentration of 0.4 M. This value was chosen as optimum for the rest of experimental work.

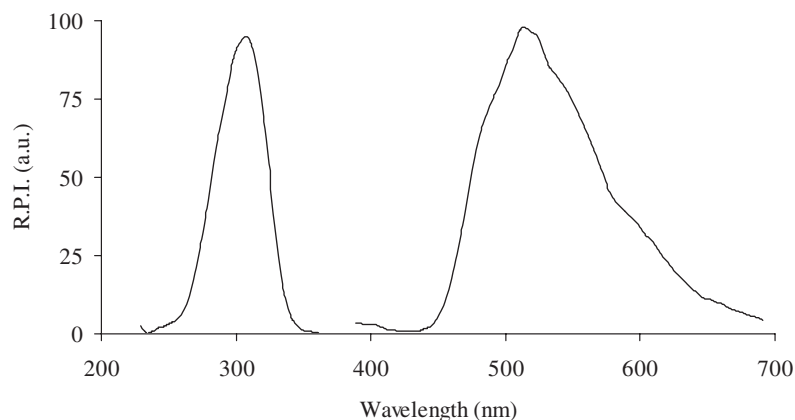


Figure 2. Spectrum of fuberidazole.  $[FBZ] = 20 \text{ ng mL}^{-1}$ ,  $[KI] = 0.4 \text{ M}$ ,  $[Na_2SO_3] = 8 \text{ mM}$ . Excitation and emission wavelengths 250–375 nm and 400–700 nm respectively,  $slits_{exc/em} 20/20 \text{ nm}$ ,  $t_{d/g} 0.1/5 \text{ ms}$  and detector voltage 950 V.

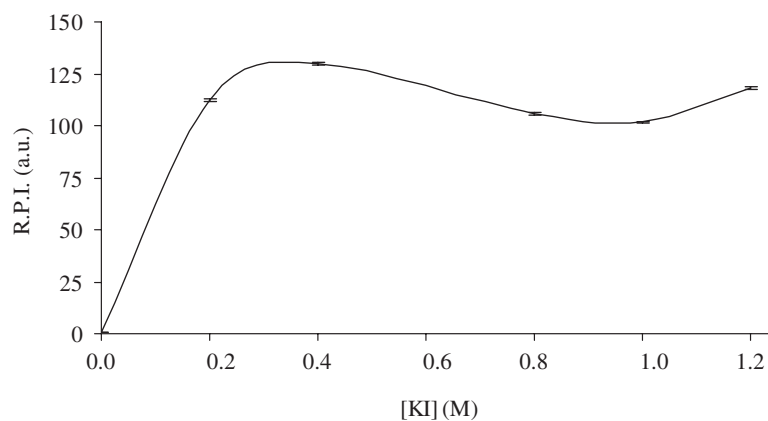


Figure 3. Influence of potassium iodide concentration on the relative phosphorescence intensity (R.P.I.) of fuberidazole.  $[FBZ] = 20 \text{ ng mL}^{-1}$ ,  $[Na_2SO_3] = 8 \text{ mM}$ .  $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 308/515 \text{ nm}$ . The rest of instrumental parameters as in figure 1.

### 3.3. Influence of deoxygenation

Sodium sulphite was selected as the deoxygenation scavenger. In aqueous solution, the elimination of dissolved oxygen is practically immediate, although both the relative phosphorescence intensity and the stabilization time (time necessary for sample deoxygenation) can change with sodium sulphite concentration. This study was performed by monitoring the signal as a function of time until the HAI-RTP signal was stabilised for at least 2 min. To establish the optimum concentration of sodium sulphite, different amounts between 1.0 and 10.0 mM of oxygen scavenger were added to a solution with a fixed concentration of fuberidazole in the presence of potassium iodide at a concentration of 0.4 M. A concentration of 8.0 mM of sodium sulphite in the solution was selected as optimum (see figure 4) because the deoxygenating time of practically zero and the intensity shows a plateau at this value of  $Na_2SO_3$ .

*A phosphorimetric method*

5

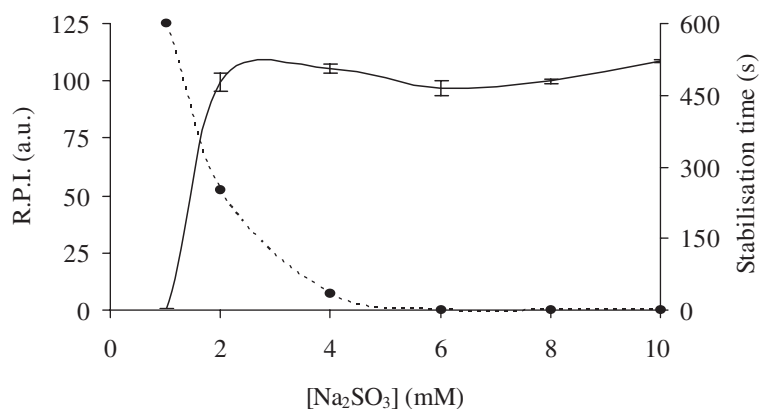


Figure 4. Influence of sodium sulphite concentration of R.P.I. (—) and stabilisation time (-----).  $[\text{FBZ}] = 20 \text{ ng mL}^{-1}$  and  $[\text{KI}] = 0.4 \text{ M}$ .  $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}} = 308/515 \text{ nm}$ . The rest of instrumental parameters as in figure 1.

### 3.4. Effect of organic solvents

The effect of the different percentages of organic solvents (acetone, acetonitrile, ethanol and methanol) was studied in order to improve phosphorescent measurements and facilitate the solubilization of fuberidazole.

The study carried out demonstrated that no changes were observed in relative phosphorescence intensity using ethanol up 20% (v/v). However, the presence of acetone and methanol produced notable phosphorescence quenching of the phosphorescence signal. The presence of acetonitrile increases the signal phosphorescence significantly and a percentage of 30% (v/v) was chosen as the optimum value.

### 3.5. Stability

Under these experimental conditions, phosphorescence signals of fuberidazole were obtained instantaneously and remained stable for at least one hour.

### 3.6. Interference study

In order to study the selectivity of the proposed method, the presence of other pesticides has been studied. Other pesticides such as carbendazin, warfarin, naptalam, quinomerac, imazalil, quinollamine, dithianon, denoxacar, diuron and linuron did not show interferences at the level of concentration of FBZ. Napropamide, thiabendazole and carbaryl interfered in the proposed determination at a molar relation of 1:1, however these products have different uses, and are not usually applied simultaneously with fuberidazole.

### 3.7. Analytical performance characteristics

Analytical performance characteristics of the proposed method were evaluated. A standard calibration graph was prepared according to recommended procedure. The wide linear range, small standard errors and correlation coefficient indicate excellent

Table 1. Analytical parameters.

Slope ( $\text{mL ng}^{-1}$ )	0.399
Intercept	4.370
Correlation coefficient	0.996
Linear range ( $\text{ng mL}^{-1}$ )	0–25
Detection limit ( $\text{ng L}^{-1}$ )	95
Quantification limit ( $\text{ng mL}^{-1}$ )	0.31
R.S.D. (%) 20 $\text{ng mL}^{-1}$	3.1

Table 2. Recovery study of spiked analytes in water samples.

	Added value ( $\text{ng mL}^{-1}$ )	Found value ( $\text{ng mL}^{-1}$ )	Recovery percentage (%)* (RSD %)
Tap 1	20	18.66	93.3 (1.7)
Tap 2	10	9.60	96.0 (3.9)
Tap 3	2.4	2.46	102.7 (8.0)
Mineral 1	20	18.10	90.5 (3.9)
Mineral 2	10	10.44	104.4 (3.3)
Mineral 3	2.4	2.60	108.3 (6.8)

\*Seven replicates were analyzed.

calibration linearity. The detection and quantification limit have been calculated according to IUPAC [21]. Three replicates for the fuberidazole solution of 0, 5, 10, 15, 20 and 25  $\text{ng mL}^{-1}$  were taken in order to set up the calibration. All the features of the proposed method are summarised in table 1.

### 3.8. Analytical applications

Determination of pesticide levels in water is often needed to control environmental contamination.

Therefore rapid and simple analytical methods are always needed to provide a good knowledge of the distribution and bioavailability of pesticides in different water samples, which is important for the toxicity and mobility studies of pesticides in the environment.

Table 2 summarises the results at three spiked levels (2.4, 10, 20  $\text{ng mL}^{-1}$ ) for the two samples taken and the analysis of seven replicates. We can conclude that the methods show an acceptable accuracy and precision in the analysis of fuberidazole at these concentration levels.

## 4. Conclusions

We have shown that heavy atom-induced room-temperature phosphorimetry methodology enhances the sensitivity and selectivity for the analysis of small amounts of pesticide in water. But, on the other hand, all luminescence methodologies which work without selectivity on a extra separation step (chromatography, electrophoresis and so on) would be a risk to other luminescence compounds (phosphorescence in this case) or quenchers. For these reasons, the presented paper could be very useful for monitoring the environmental distribution or degradation of fuberidazole

at different locations or times after application of this fungicide and it also could be very helpful for routine laboratories as a first screening step.

### Acknowledgement

The authors gratefully acknowledge the financial support from Ministerio de Ciencia y Tecnología, Spain (Projects PPQ2000-1291-C02-01 and MAT2003-09074-C02-01), the grant support from Fundación CAJAMAR, Spain and the financial support of a work contract from the Junta de Andalucía (Ayuda para el Perfeccionamiento de Doctores en Universidades Fuera de Andalucía).

### References

- [1] J.F. Jenkyn, R.D. Prew, *Ann. Appl. Biol.*, **75**, 241 (1974).
- [2] J.F. Jenkyn, R.D. Prew, *Chem. Abstr.*, **81**, 488u (1974).
- [3] C.R. Worthing (Ed.), *The Pesticide Manual*, 7th Edn, British Crop protection council, London (1983).
- [4] J.J. Netta, J.R. Egerton, Merck and Co. Inc., US patent No. 3,549,754 (1970).
- [5] J.J. Netta, J.R. Egerton, *Chem. Abstr.*, **74**, 146378d (1971).
- [6] I. Tamm, H.J. Eggers, R. Bablanian, A.F. Wagner, K. Folkers, *Nature*, **223**, 785 (1969).
- [7] F. García Sánchez, A.L. Ramos, V. Cerdá, M.T. Oms, *Anal. Chim. Acta*, **228**, 293 (1990).
- [8] L.F. García, J.J. Aarón, *Mikrochim. Acta*, **126**, 289 (1997).
- [9] G. De Armas, E. Becerra, A. Cladera, J.M. Estela, V. Cerdá, *Anal. Chim. Acta*, **427**, 83–92 (2001).
- [10] G. De Armas, M. Miró, J.M. Estela, V. Cerdá, *Anal. Chim. Acta*, **471**, 173–186 (2002).
- [11] M. Martínez Galera, D. Picón Zamora, J.L. Martínez Vidal, A. Garrido Frenich, A. Espinosa Mansilla, A. Muñoz de la Peña, F. Salinas López, *Talanta*, **59**, 1107–1116 (2003).
- [12] J.A. Murillo Pulgarín, L.F. García Bermejo, *J. Agric. Food Chem.*, **50**, 1002 (2002).
- [13] L. Li, Y. Chen, Y. Zhao, A. Tong, *Anal. Chim. Acta*, **341**, 241–249 (1997).
- [14] L. Li, Y. Zhao, W. Yingguang, A. Tong, *Talanta*, **46**, 1147–1154 (1998).
- [15] A. Segura Carretero, C. Cruces Blanco, B. Cañabate Díaz, J.F. Fernández Sánchez, A. Fernández Gutiérrez, *Anal. Chim. Acta*, **417**, 19–30 (2000).
- [16] A. Salinas Castillo, A. Segura Carretero, A. Fernández Gutiérrez, *Anal. Chim. Acta*, **516**, 213–220 (2004).
- [17] B. Cañabate Díaz, C. Cruces Blanco, A. Segura Carretero, A. Fernández Gutiérrez, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **30**, 987–992 (2002).
- [18] A. Salinas Castillo, A. Segura Carretero, C. Cruces Blanco, A. Fernández Gutiérrez, *Anal. Bioanal. Chem.*, **376**, 1111–1114 (2003).
- [19] A. Segura Carretero, C. Cruces Blanco, A. Fernández Gutiérrez, *J. Agric. Food Chem.*, **46**, 3683–3686 (1998).
- [20] A. Segura Carretero, C. Cruces Blanco, J.F. Fernández Sánchez, B. Cañabate Díaz, A. Fernández Gutiérrez, *J. Agric. Food Chem.*, **48**, 4453–4459 (2000).
- [21] IUPAC, *Pure Appl. Chem.*, **105**, 45 (1976).





**ANEXO IV**



# Simple determination of the herbicide napropamide in water and soil samples by room temperature phosphorescence

Alfonso Salinas-Castillo,<sup>1</sup> Jorge Fernando Fernández-Sánchez,<sup>2</sup>  
Antonio Segura-Carretero<sup>1\*</sup> and Alberto Fernández-Gutiérrez<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Analytical Chemistry, Faculty of Sciences, University of Granada, C/Fuentenueva s/n, 18071 Granada, Spain

<sup>2</sup>Centre for Chemical Sensors, Swiss Federal Institute of Technology Zurich (ETHZ), Technoparkstrasse 1, CH-8005 Zürich, Switzerland

**Abstract:** A new, simple, rapid and selective phosphorimetric method for determining napropamide is proposed which demonstrates the applicability of heavy-atom-induced room-temperature phosphorescence for analyzing pesticides in real samples. The phosphorescence signals are a consequence of intermolecular protection and are found exclusively with analytes in the presence of heavy atom salts. Sodium sulfite was used as an oxygen scavenger to minimize room-temperature phosphorescence quenching. The determination was performed in 1 M potassium iodide and 6 mM sodium sulfite at 20 °C. The phosphorescence intensity was measured at 520 nm with excitation at 290 nm. Phosphorescence was easily developed, with a linear relation to concentration between 3.2 and 600.0 ng ml<sup>-1</sup> and a detection limit of 3.2 ng ml<sup>-1</sup>. The method has been successfully applied to the analysis of napropamide in water and soil samples and an exhaustive interference study was also carried out to display the selectivity of the proposed method.

© 2005 Society of Chemical Industry

**Keywords:** pesticide analysis; napropamide; heavy atom induced; room temperature phosphorescence; water analysis; soil samples

## 1 INTRODUCTION

Herbicides are often used to kill weeds without causing injury to desirable vegetation. The agricultural use of herbicides has replaced human and mechanical weeding in developed countries. Herbicides have been the most widely used type of pesticide and synthetic herbicides now dominate the market. The trace determination of herbicides has become more and more important due to the increased use of these products in agriculture, and sufficiently sensitive techniques are required for their determination in different matrices, such as soil, water and biological fluids.

The high sensitivity and selectivity provided by luminescence-based techniques are favourable features that explain the use of these typically simple and low-cost analytical techniques in many analytical laboratories. Although fluorimetry has been extensively used in routine analysis, phosphorescence offers several advantages over fluorescence, such as a detection mode derived from the longer

excited-state lifetimes, the larger Stokes' shifts of the phosphorescent processes that simplify the spectral separation between the scattered excitation light and the emission, and the high selectivity of the phenomenon (only a very few compounds are able to emit analytically useful phosphorescence). All these features explain why phosphorimetry has proved to be a powerful analytical tool for determining some organic and inorganic traces. A recent extensive review collects most of the wide variety of applications in which phosphorescence has been used.<sup>1</sup>

Of all the phosphorescence methodologies, heavy-atom-induced room-temperature phosphorescence (HAI-RTP)<sup>2-6</sup> is an excellent approach for solving most of the limitations of the practical use of RTP:

- (1) It does not require a microscopically ordered protective medium, so that the method is not only simple but also avoids the detrimental effects to the analyte frequently caused by the addition of this medium.

\* Correspondence to: Dr Antonio Segura-Carretero, Department of Analytical Chemistry, Faculty of Sciences, University of Granada, C/Fuentenueva s/n, 18071 Granada, Spain

E-mail: ansegura@ugr.es

Contract/grant sponsor: Ministerio de Ciencia y Tecnología, Spain; contract/grant number: PPQ2000-1291-C02-01; MAT2003-09074-C02-01

Contract/grant sponsor: Fundación CAJAMAR, Spain

Contract/grant sponsor: Junta de Andalucía

(Received 22 July 2004; revised version received 19 January 2005; accepted 22 February 2005)

- (2) The transparency of the solution and the elimination of the precipitate and foam which occur with other RTP methodologies (cyclodextrin-RTP (CD-RTP) and micelle-stabilized-RTP (MS-RTP), respectively) together with the fact that the RTP signal can be induced directly within the aqueous phase make it possible to combine with other analytical techniques such as liquid chromatography (LC), flow-injection analysis (FIA) and capillary electrophoresis (CE) to perform automatic on-line analyses.
- (3) Chemical deoxygenating with sodium sulfite is simple and precise and may also be used to adjust the pH level of the system, thus simplifying the experimental procedure.

HAI-RTP methods have already been reported for the determination of some pesticides.<sup>7,8</sup>

Napropamide (*N,N*-diethyl-2-(1-naphthoxy)propamide; Fig 1) is a member of a class of highly effective broad-spectrum herbicides. It is used in agriculture to weed out most annual monocotyledon grasses and many broad-leaf weeds such as lambs-quarter and wide amaranth.<sup>9</sup> Napropamide is slightly toxic when ingested orally. Effects from acute exposure in rats include diarrhoea, excessive tearing and urination, depression, salivation, rapid weight loss, respiratory changes, decreased blood pressure and fluid in the body cavity.<sup>10</sup>

In recent literature, various methods for determining napropamide have been proposed such as high-performance liquid chromatography,<sup>11–15</sup> fluorescence<sup>16–19</sup> and micelle-stabilized RTP.<sup>20</sup> All of these methods are laborious and time-consuming for use in routine environmental control laboratories; the most rapid methodology takes at least 10 min for determining napropamide. The costs are always higher than for luminescence methods, fluorescence methods are less selective and may be affected by organic compounds, high concentration of ions, etc. The MS-RTP method takes 10 min just to stabilize and deoxygenate the samples. The advantages of HAI-RTP versus MS-RTP have been demonstrated by our research group.<sup>21</sup>

In this work a simple, selective and rapid new phosphorimetric method is proposed for napropamide determination in water and soil samples.

## 2 EXPERIMENTAL

### 2.1 Instrumentation

A Varian Cary–Eclipse phosphorescence spectrometer (Varian Iberica, Madrid, Spain) was used

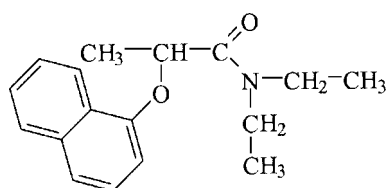


Figure 1. Chemical structure of napropamide.

to obtain phosphorescence spectra and relative phosphorescence intensity measurements. This spectrometer is equipped with a xenon discharge lamp (peak power equivalent to 75 kW), Czerny–Turner monochromators, R-928 photomultiplier tube which is red sensitive (900 nm) with manual or automatic voltage controlled by Cary–Eclipse software for Windows 95/98/NT systems.

The instrumental parameters used for determining napropamide were: detector voltage 1000 V, slit width 20 nm for both excitation and emission slits, delay time 0.1 ms and gate time 5.0 ms.

### 2.2 Reagent and solutions

Analytical reagent-grade chemicals were used for preparing all the solutions. Thallium (I) nitrate, potassium iodide and anhydrous sodium sulfite were purchased from Sigma Chemical Co, and were used as received. Stock solutions of potassium iodide (2 M) and thallium (I) nitrate (0.25 M) were prepared. Sodium sulfite solutions (0.1 M) were prepared daily and kept in tightly stoppered containers.

A stock standard solution (50 µg ml<sup>-1</sup>) of napropamide (Sigma Chemical Co) was prepared in water, stored below 5 °C and protected from the light.

The water used was doubly distilled and prepared with a Milli-Q system (Millipore, Bedford, MA, USA).

The pollutant compounds were handled with extreme caution; nitrile gloves were worn when working with the solutions and a low-maintenance respirator with the appropriate filters and disposable spatulas and weighing dishes when handling them in solid form. The wastes were collected in suitable residue containers for processing according to international norms.

### 2.3 General procedure

An aliquot (60 µl) of napropamide stock solution in water, aqueous potassium iodide (2 M; 5 ml), acetonitrile (3 ml) and aqueous sodium sulfite (0.1 M; 600 µl) were introduced into a 10-ml calibrated flask and made up to volume with double-distilled water. Standard 10-mm quartz cells were used in all cases.

The relative phosphorescence intensities (RPI) of the samples and the corresponding blanks were measured at the phosphorescence wavelength maxima of  $\lambda_{exc}/\lambda_{em}$  290/520 nm, slit width<sub>exc/em</sub> 20/20 nm, decay time 0.10 ms, gate time 5.00 ms and detector voltage 1000 V. Reagent blanks lacking napropamide were prepared and analyzed following the same procedure. All the measurements were carried out three times to evaluate the error.

### 2.4 Water samples procedure

Drinking water samples from the city of Granada were spiked at three different concentration levels to give final diluted samples containing 150, 300 and 450 ng ml<sup>-1</sup> of pesticide, which were covered by the napropamide calibration graphs. The water samples were treated and analyzed as in Section 2.3.

## 2.5 Soil sample procedure

The proposed method has also been applied to determine napropamide in agricultural soil samples from Valderrubio village (Granada, Spain). A known quantity of napropamide was added to 10 g of the soil sample so as to give a final concentration that was covered by the calibration graph. The sample was extracted with acetonitrile ( $2 \times 30$  ml), vacuum filtered and the dry residue washed with acetonitrile (10 ml). All the acetonitrile extracts were combined and taken to dryness in a rotatory evaporator at  $40^\circ\text{C}$ . The residue was diluted to 3 ml with acetonitrile and treated and analyzed as in Section 2.3.

## 3 RESULTS AND DISCUSSION

### 3.1 Phosphorescence properties

Figure 2 shows the excitation and phosphorescence emission spectra of napropamide in aqueous solution. Napropamide emits phosphorescence with a maximum excitation at 290 nm and maximum emission at 520 nm. In these experimental conditions, the lifetime of the napropamide phosphorescence emission is 150  $\mu\text{s}$ .

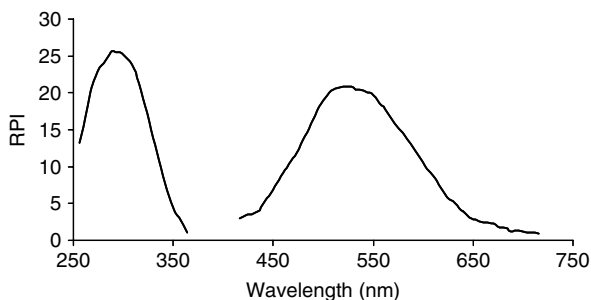
### 3.2 Influence of heavy atom perturber

Various kinds and concentrations of heavy atom affect the intensity of the HAI-RTP signal. In this report the effects of two heavy atom salts, potassium iodide and thallium nitrate, have been studied. Napropamide only emits phosphorescence when potassium iodide is used as a heavy atom perturber.

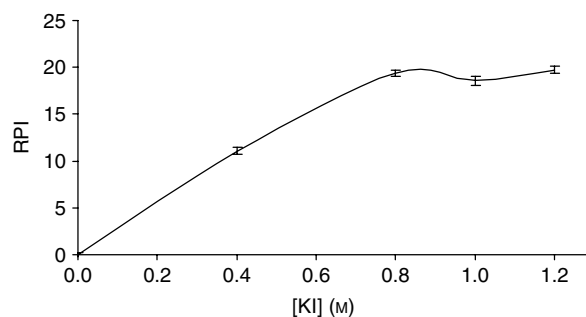
As can be seen in Fig 3 no phosphorescence response was obtained in the total absence of potassium iodide. An increase of heavy atom concentration produces an increase in the HAI-RTP intensity up to 0.8 M and thereafter, as the heavy atom concentration is increased, the RPI is constant. Therefore, an optimum value of 1.0 M of potassium iodide was chosen for the remainder of experimental work.

### 3.3 Influence of oxygen scavenger

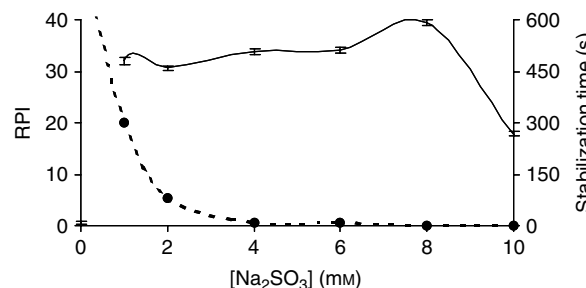
Sodium sulfite was selected as the oxygen scavenger. Although with this methodology the elimination of



**Figure 2.** Excitation and emission spectra of napropamide. [Napropamide] =  $300\text{ ng ml}^{-1}$ , [KI] = 1 M,  $[\text{Na}_2\text{SO}_3]$  = 6 mM. Excitation and emission wavelengths 250–375 nm and 400–700 nm, slits width<sub>exc/em</sub> = 20/20 nm,  $t_{d/g}$  = 0.1/5.0 ms and detector voltage 1000 V.



**Figure 3.** Influence of potassium iodide concentration on HAI-RTP of napropamide. [Napropamide] =  $300\text{ ng ml}^{-1}$ ,  $[\text{Na}_2\text{SO}_3]$  = 6 mM.  $\lambda_{\text{exc/em}}$  = 290/520 nm. The other instrumental parameters as Fig 2.



**Figure 4.** Effect of sodium sulfite concentration on (—) HAI-RTP intensity and (---●) stabilization time of napropamide. [Napropamide] =  $300\text{ ng ml}^{-1}$ , [KI] = 1 M.  $\lambda_{\text{exc/em}}$  = 290/520 nm. The other instrumental parameters as Fig 2.

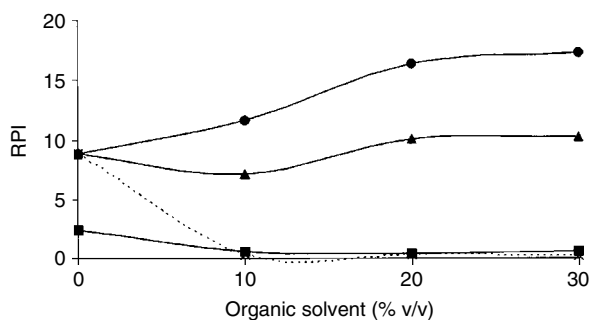
dissolved oxygen from aqueous solution is practically immediate, both the relative phosphorescence intensity and the stabilization time (time necessary for deoxygenating the sample) can change with sodium sulfite concentration.

This study was performed by monitoring the signal as a function of time until the HAI-RTP signal was stabilized for at least 2 min. To set the optimum concentration of sodium sulfite, different amounts between 1.0 and 10.0 mM of the oxygen scavenger were added to a solution with a fixed concentration of napropamide in the presence of potassium iodide at optimum concentration.

The RPI does not change significantly as the oxygen scavenger concentration is increased but the stabilization time decreases drastically when the concentration of sulfite is higher than 4.0 mM. For this reason, and to keep the system completely deoxygenated, a 6.0 mM sodium sulfite concentration was selected as optimum level (Fig 4).

### 3.4 Effect of organic solvents

The effect of different organic solvents (acetone, acetonitrile, ethanol and methanol) was studied to improve the phosphorescence signal and facilitate the solubilization of napropamide. Different amounts of each organic solvent were added to the sample and emission intensities were compared before and after the addition. Figure 5 shows that no changes were observed in the relative phosphorescence intensity when methanol was added, the presence of acetone and ethanol produced significant phosphorescence



**Figure 5.** Effect of organic solvents on HAI-RTP intensity of napropamide. (—●—) Acetonitrile, (—▲—) methanol, (—■—) ethanol and (---×---) acetone. [Napropamide] = 300 ng ml<sup>-1</sup>, [KI] = 1 M and [Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>] = 6 mM.  $\lambda_{exc/em}$  = 290/520 nm. The other instrumental parameters as Fig 2.

quenching, and the presence of acetonitrile increased the phosphorescence signal.

For this reason, acetonitrile was selected as co-solvent to improve the solubilization and the phosphorescence emission. The optimum percentage of acetonitrile is shown in Fig 5. Different percentages of acetonitrile, between 10 and 30% (v/v), were added to the sample. An increase in the acetonitrile percentage produces an increase in the emission intensity up to 25%, and then, even when the percentage of acetonitrile was increasing, the emission was constant. The optimum value was thus selected as 30% (v/v) of acetonitrile.

### 3.5 Interference study

In order to study the selectivity of the proposed method, the effects of the presence of several pesticides were evaluated.

We made a systematic study into the effects of other pesticides (carbaryl, carbendazim, denoxacar, dithianon, diuron, fuberidazole, imazalil, linuron, monolinuron, naptalam, nitralin, quinoclamine, quinomerac, simazine, tebutam, thiabendazole and warfarin) upon the determination of napropamide at 300 ng litre<sup>-1</sup>.

Under the conditions assayed carbendazim, denoxacar, dithianon, diuron, imazalil, linuron, monolinuron, naptalam, nitralin, quinoclamine, quinomerac, simazine, tebutam and warfarin caused no interference up to a ratio of 1:1 and fuberidazole, thiabendazole and carbaryl interfered at 1:1; however these products are not usually applied simultaneously with napropamide. Only monolinuron, nitralin, simazine and tebutam are usually applied together with napropamide and none of them caused interference.

We have also shown that the presence of high level of ions (cations or anions) or suspended sediments in water did not cause interference in the determination of pesticides by HAI-RTP.<sup>8</sup>

### 3.6 Stability and analytical performance characteristics

Under optimal conditions, phosphorescence signals for the napropamide were obtained instantaneously and remained stable for at least 1 h.

**Table 1.** Analytical parameters

Parameter	Value
Linear dynamic range (ng ml <sup>-1</sup> )	3.2–600
Detection limit (ng ml <sup>-1</sup> )	3.2
Quantification limit (ng ml <sup>-1</sup> )	10.7
RSD (%) at 300 ng ml <sup>-1</sup>	2.9

**Table 2.** Comparison of detection limits

Analytical method <sup>a</sup>	Detection limit (ng ml <sup>-1</sup> )	Pre-concentration method	Reference
HPLC	14.0	—	11
SFC	2.6	SPE	12
Fluorimetry	3.2	Liq-liq	18
MS-RTP	12.0	Liq-liq	20
HAI-RTP	3.2	No	This work

<sup>a</sup> SFC: supercritical fluid chromatography; —: unknown; Liq-liq: liquid-liquid extraction; SPE: solid phase extraction.

Analytical performance characteristics of the proposed method were evaluated. A standard calibration graph was prepared according to recommended procedure. The wide linear range, small standard errors and correlation coefficient indicate excellent calibration linearity. The detection and quantification limits have been calculated according to IUPAC.<sup>22</sup> Three replicates for the napropamide solution of 0, 100, 200, 300, 400, 500 and 600 ng ml<sup>-1</sup> were taken in order to set up the calibration. All the features of the proposed method are summarized in Table 1.

The characteristics of this method were compared with those of HPLC, critical fluid chromatography, fluorescence and MS-RTP methods in Table 2.

It should be borne in mind that the detection limit shown with the proposed HAI-RTP method is obtained without any pre-treatment of the sample. Therefore to improve the detection limit and meet the standards of sensitivity required by the European Drinking Water Directive it is possible to use a previous step such as liquid-liquid extraction or solid phase extraction.<sup>23</sup>

### 3.7 Analytical applications

Determination of pesticide levels in water and soils is often needed for controlling environmental contamination. Therefore the availability of rapid and simple analytical methods is always desirable to allow a good knowledge of the distribution and bioavailability of pesticides from different water samples, which is important for the toxicity and mobility studies of pesticides in the environment.

Table 3 summarizes the results at three spiked concentration levels (150, 300 and 450 ng ml<sup>-1</sup>) for each water sample. Recovery percentages between 89 and 95% were obtained with relative standard deviation less than 6%. We can conclude that acceptable accuracy and precision can be obtained in the analysis of samples at these concentration levels of napropamide.

**Table 3.** Recovery study of spiked water and soil samples

		Added (ng ml <sup>-1</sup> )	Found (ng ml <sup>-1</sup> )	Recovery percentage (%)	RSD (%) <sup>a</sup>
Water	Sample 1	150	142.2	94.8	5.69
	Sample 2	300	266.4	88.8	3.53
	Sample 3	450	424.5	94.3	2.35
Soil	Sample 1	200	180.8	90.4	6.34
	Sample 2	300	272.4	90.8	4.25
	Sample 3	400	373.6	93.4	3.51

<sup>a</sup> For three replicates.

A cultivated soil sample was spiked with napropamide by adding appropriate volumes of a standard solution. Different recovery experiments in the spiked soil were performed. Samples of napropamide containing 200, 300 and 400 ng ml<sup>-1</sup> were analyzed (see Table 3). The recoveries from the average of three determinations were 90.4, 90.8 and 93.4%, respectively, with relative standard deviation less than 7%.

#### 4 CONCLUSIONS

In this work we have demonstrated that heavy-atom-induced room-temperature phosphorimetry enhances sensitivity and selectivity for the analysis of small amounts of chemicals in drinking water and cultivated soils. The proposed method could be used for the routine determination of napropamide.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

The authors gratefully acknowledge financial support from the Ministerio de Ciencia y Tecnología (Spain) (Projects PPQ2000-1291-C02-01 and MAT2003-09074-C02-01), from the Fundación CAJAMAR (Spain) and from the Junta de Andalucía (Ayuda para el Perfeccionamiento de Doctores en Universidades Fuera de Andalucía).

#### REFERENCES

- Kuijt J, Ariese F Th, Brinkman UAT and Gooijer C, Room temperature phosphorescence in the liquid state as a tool in analytical chemistry. *Anal Chim Acta* **488**:135–171 (2003).
- Segura Carretero A, Cruces Blanco C, Cañabate Díaz B and Fernández Gutiérrez A, An innovative way of obtaining room-temperature phosphorescence signals in solution. *Anal Chim Acta* **361**:217–222 (1998).
- Li LD, Chen YL, Zhao J and Tong AJ, Room-temperature phosphorescence of dansyl chloride solution in the absence of protective medium and its medium effect. *Anal Chim Acta* **341**:241–249 (1997).
- Li LD, Chen YL and Tong AJ, Non-protected fluid room temperature phosphorescence of several naphthalene derivatives. *Talanta* **46**:1147–1154 (1998).
- Segura Carretero A, Cruces Blanco C, Cañabate Díaz B, Fernández Sánchez JF and Fernández Gutiérrez A, Heavy-atom-induced room-temperature phosphorescence: a straight-
- forward methodology for the determination of organic compounds in solution. *Anal Chim Acta* **417**:19–30 (2000).
- Salinas Castillo A, Segura Carretero A and Costa Fernández JM, Wei Jun Jin and Fernández Gutiérrez A. Heavy-atom-induced room-temperature phosphorescence: a tool for the analytical characterization of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Anal Chim Acta* **516**:213–220 (2004).
- Segura Carretero A, Cruces Blanco C and Fernández Gutiérrez A, Heavy-atom-induced room-temperature phosphorescence method for the determination of the plant growth regulator  $\beta$ -naphthoxyacetic acid. *J Agric Food Chem* **46**:3683–3686 (1998).
- Segura Carretero A, Cruces Blanco C, Fernández Sánchez JF, Cañabate Díaz B and Fernández Gutiérrez A, HAI-RTP Determination of carbaryl pesticide in different irrigation water samples of south Spain. *J Agric Food Chem* **48**:4453–4459 (2000).
- Liu QK, Zhu GN and Liu ZD (eds), *The New Handbook of pesticide usage*, Science and Technology Press, Shanghai, China, p 428 (2000).
- Anon, Tox Oneliners: Devrinol, US Environmental Protection Agency (1986).
- Welch CJ and Szczerba T, HPLC separation of the enantiomers of commercial agricultural compounds using the Whelk-O CSP. *Enantiomer* **3**:37–43 (1998).
- Toribio L, del Nozal MJ, Bernal JL, Jiménez JJ and Serna ML, Packed-column supercritical fluid chromatography coupled with solid-phase extraction for the determination of organic microcontaminants in water. *J Chromatogr A* **823**:163–170 (1998).
- Environmental Protection Agency (EPA), Method 632.1, USA.
- Mori H, Nagase H, Okada K, Takada K, Nakamura M and Yamazaki F, Rapid analysis of pesticides causing acute poisoning in patients by high-performance liquid chromatography with column-switching technique. *J Health Sci* **45**:282–288 (1999).
- Tanabe A, Ibaraki T, Yagoh H, Kawata K and Sakai M, *Kankyo Kagaku* **9**:607–615 (1999).
- Stangl G and Niessner R, Cloud point extraction of napropamide and thiabendazole from water and soil. *Mikrochim Acta* **113**:1–8 (1994).
- Stangl G and Niessner R, Micellar extraction a new step for enrichment in the analysis of napropamide. *Int J Environ Anal Chem* **58**:15–22 (1995).
- Murillo Pulgarín JA and García Bermejo LF, Determination of napropamide in technical formulations, soil and vegetables samples by sensitised fluorescence: validation of the method. *Anal Chim Acta* **491**:37–45 (2003).
- Tang B, Liu WL, Wang Y and Chen ZZ, Studies on the supramolecular interaction between napropamide and beta-cyclodextrin by spectrofluorimetry and its analytical application. *Anal Chim Acta* **509**:145–150 (2004).
- Murillo Pulgarín JA and García Bermejo LF, Determination of the pesticide napropamide in soil, pepper, and tomato by micelle-stabilized room-temperature phosphorescence. *J Agric Food Chem* **50**:1002–1008 (2002).
- Cañabate Díaz B, Casado Terrones S, Segura Carretero A, Costa Fernández JM and Fernández Gutiérrez A, Comparison of three different phosphorescent methodologies in solution for the analysis of naphazoline in pharmaceutical preparations. *Anal Bioanal Chem* **379**:30–34 (2004).
- Currie LA, IUPAC Commission on analytical nomenclature, Recommendations in evaluation of analytical methods including detection and quantification capabilities. *Pure Appl Chem* **67**:1699–1723 (1995).
- Su WB, Zhu RH, Qiang H and Gu XX, Solid phase extraction and room temperature phosphorimetry coupling technique and its application. *Spectrosc Spect Anal* **24**:270–273 (2004).





**ANEXO V**



# Heavy atom induced room temperature phosphorescence: a tool for the analytical characterization of polycyclic aromatic hydrocarbons

A. Salinas Castillo<sup>a</sup>, A. Segura Carretero<sup>a,\*</sup>, J.M. Costa Fernández<sup>b</sup>,  
Wei Jun Jin<sup>b</sup>, A. Fernández Gutiérrez<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Department of Analytical Chemistry, Faculty of Sciences, University of Granada, C/Fuentenueva s/n, E-18071 Granada, Spain

<sup>b</sup> Department of Physical and Analytical Chemistry, University of Oviedo, C/Julián Clavería 8, E-33006 Oviedo, Spain

Received 5 February 2004; received in revised form 5 April 2004; accepted 5 April 2004

## Abstract

We have developed a heavy atom induced room temperature phosphorescence (HAI-RTP) procedure for the analytical characterization of 15 polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). This methodology is based on the measurement of the native RTP emission from the analytes. RTP measurements are made directly in fluid aqueous solution, without the need of a protective medium but in the presence of high concentrations of heavy atom perturbers. Efficient deoxygenation conditions should be ensured using sodium sulfite as the oxygen scavenger. In such conditions, 15 PAHs, identified as major pollutants by the Environmental Protection Agency (EPA), naphthalene, acenaphthylene, acenaphthene, fluorene, phenanthrene, anthracene, fluoranthene, pyrene, chrysene, benzo(a)anthracene, benzo(k)fluoranthene, benzo(b)fluoranthene, benzo(a)pyrene, indeno(1,2,3-cd)pyrene, benzo(g,h,i)perylene and dibenzo(a,h)anthracene, have been studied and analytically characterized using the proposed HAI-RTP procedure. To our knowledge, this is the first time that an analytically useful RTP emission of some of the PAHs under study in aqueous media has been observed. Once optimized the chemical variables affecting the phosphorescence phenomenon in solution, the phosphorescence spectral characteristic of all of the selected toxic compounds (excitation and emission wavelengths and triplet lifetimes) were obtained. Under the optimal experimental conditions, calibration graphs and detection limits (in the  $\text{ng ml}^{-1}$  level) were established for the 15 PAHs under study. Potential applicability of the developed methodology will be discussed.

© 2004 Elsevier B.V. All rights reserved.

**Keywords:** Room temperature phosphorescence; Polycyclic aromatic hydrocarbons; Heavy atom induced phosphorescence; Environmental analysis

## 1. Introduction

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are a class of well-known toxic and carcinogenic compounds originating from incomplete combustion of organic compounds and geochemical processes [1–3]. These potentially hazardous chemicals are widely present in industrial waste gas, automobile exhaust, coal tars, cigarette smoke and meat products, which constitute the most common ways of exposure of humans to the PAHs. Due to the high toxicity of these compounds and, particularly their carcinogenic/mutagenic character these PAHs are listed by the Environmental Protection Agency (EPA) as priority pollutants. In fact, PAHs have an important negative environmental impact and they can neg-

atively effect to the quality of life. Therefore, their identification and analytical quantification are of great importance.

The European Union and World Health Organisation (WHO) have laid down that in assessing the quality of water for human consumption six PAHs (fluoranthene, benzo[b]fluoranthene, benzo[k]fluoranthene, benzo[a]pyrene, benzo[ghi]perylene and indeno(1,2,3-cd)pyrene) must be tested for and that the maximum total concentration of these six PAHs is  $200 \text{ ng l}^{-1}$ , whilst the more carcinogenic BaP may not exceed  $10 \text{ ng l}^{-1}$ , with a relative standard deviation of 25% [4].

Identification and quantification of PAHs are routinely performed by means of high-performance liquid chromatography (HPLC) with UV-Vis, fluorimetric or amperometric detection [5–9] or by means of gas chromatography coupled to mass spectrometry detection (GC–MS) [10–13]. Due to the typically low concentration levels of these compounds

\* Corresponding author. Tel.: +34-958-243296; fax: +34-958-249510.  
E-mail address: [ansegura@ugr.es](mailto:ansegura@ugr.es) (A. Segura Carretero).

in the environment, most of the analytical techniques described so far for PAHs determination include a necessary preconcentration step. These steps are time-consuming and require great deal of effort, thus making the analysis costly and tedious for routine control analysis.

On the other hand, it is well known that PAHs are a family of compounds which present native luminescence properties, which can be used for the development of sensitive and selective analytical methods for their direct determination. In fact, several authors have reported the use of fluorescence [14,15] and phosphorescence measurements for the direct analysis of several PAHs.

The high sensitivity and selectivity provided by luminescence-based techniques are favorable features that explain that many of those typically simple and low-cost analytical techniques are already established in many analytical laboratories. Although fluorimetry has been extensively used in

routine analysis, room temperature phosphorescence (RTP) offers several advantages over fluorescence as a detection mode derived from the longer excited-state lifetimes of phosphorescent reagents, the larger Stokes' shifts of the RTP processes that simplify the spectral separation between the scattered excitation light and the desired phosphorescence emission and the high selectivity of the phenomena (only a very few number of compounds are able to emit analytically useful phosphorescence at room temperature). All these features explain why room temperature phosphorimetry has proved to be a powerful analytical tool for certain organic and inorganic trace determinations. A quite recent extensive review collects most of the wide variety of applications in which RTP has been used [16].

Room temperature phosphorimetry has been used in the development of analytical methodologies for the direct determination of some PAHs [17] including micelle-stabilized

Table 1  
Spectral characteristics of the 15 investigated compounds

Name and abbreviations	Structure	Excitation/emission wavelengths (nm)	Lifetime ( $\mu$ s)
Naphthalene (NAPH)		285/515	250
Acenaphthylene (ACEN)		290/500, 530	962
Acenaphthene (ACE)		290/525	350
Fluorene (FLU)		290/455	118
Phenanthrene (PHE)		285/505	131
Anthracene (ANT)		355/680, 750	819
Fluoranthene (FLT)		280, 355/555, 590	362
Pyrene (PYR)		280, 330/593, 650	1500
Chrysene (CHRY)		275/515, 555	583
Benzo(a)anthracene (BaA)		280/605, 660	970
Benzo(k)fluoranthene (BkF)		300/570, 622	1414
Benzo(b)fluoranthene (BbF)		295, 345/555, 585	249
Benzo(a)pyrene (BaP)		290, 355/690, 765	2162
Indeno(1,2,3-cd)pyrene (IcdP)		295, 326/665, 725	2200
Benzo(g,h,i)perylene (BghiP)		295, 378/620, 665	4139

room temperature phosphorescence (MS-RTP) [18–20], cyclodextrin-induced RTP (CD-RTP) [21,22], or microemulsion-stabilized RTP (ME-RTP) [23,24]. Unfortunately, the application of the phosphorescence techniques in analytical chemistry was typically limited to rigid systems, specially at liquid nitrogen temperatures (LTP) [25] or for the determination of analytes adsorbed on solid substrates (SS-RTP) [26], because rigidity is required to suppress diffusion of triplet quenchers, such as molecular oxygen, and to restrict the internal motions of the molecule.

In previous studies carried out in our laboratory [27], it has been shown that the phosphorescence emission of naphthalene derivatives can be directly induced at room temperature in aqueous solutions (without organized media) but ensuring the presence of high concentrations of a heavy atom perturber and sodium sulfite as a chemical deoxygenator. Li et al. also corroborated these findings affirming that this phosphorescence emission is not a specific phenomenon of only certain derivatives, being, in fact, a regular characteristic of naphthalene derivatives [28,29]. This methodology has been named heavy atom induced room temperature phosphorescence (HAI-RTP) [30] and can be an excellent approach to solve most of the limitations of the practical use of RTP. In fact, a few HAI-RTP methodologies have already been reported for the determination of some PAHs [31,32].

In this paper, HAI-RTP is used for the complete analytical characterization of 15 PAHs (indicated as major pollutants by EPA, see Table 1). Potential applicability of the proposed HAI-RTP methodology for the determination of the PAHs will be also discussed.

## 2. Experimental

### 2.1. Reagents and materials

Analytical reagent-grade chemicals were used for the preparation of all the solutions and used as received without further purification. Thallium(I) nitrate, potassium iodide and anhydrous sodium sulfite were purchased from Sigma Chemical Co. (Spain) and were used as received. Stock aqueous solutions with a concentration of  $2 \text{ mol l}^{-1}$  were prepared for potassium iodide. Thallium(I) nitrate stock solution at a concentration  $0.25 \text{ mol l}^{-1}$  was prepared. Freshly prepared sodium sulfite was added to all solutions at a concentration of  $0.1 \text{ mol l}^{-1}$ .

EPA-listed PAHs (naphthalene, acenaphthylene, acenaphthene, fluorene, phenanthrene, anthracene, fluoranthene, pyrene, chrysene, benzo(a)anthracene, benzo(k)fluoranthene, benzo(b)fluoranthene, benzo(a)pyrene, indeno(1,2,3-cd)pyrene, benzo(g,h,i)perylene and dibenzo(a,h)anthracene) were purchased from Sigma and used as received. Stock solutions ( $50 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) were prepared for the analytes in five different organic solvents (methanol, ethanol, dimethylformamide, acetonitrile and acetone).

All aqueous standards and solutions were prepared with water double-distilled and de-ionized with a Milli-Q system (Millipore, Bedford, MA, USA).

**Note:** Use extreme caution when handling thallium(I) nitrate and PAHs which are known to be extremely toxic.

### 2.2. Instrumentation

A Varian Cary Eclipse spectrofluorimeter (Varian Iberica, Madrid, Spain) was used to obtain the relative phosphorescence intensity (RPI) measurements. The spectrofluorimeter was equipped with a xenon discharge lamp (peak power equivalent to 75 kW), Czerny–Turner monochromators, detectors a red-sensitive R-928 photomultiplier tube (up to 900 nm) with manual or automatic voltage controlled using the Cary Eclipse software for Windows 95/98/NT system. Excitation and emission slits were fixed at 20 and 20 nm, respectively. A delay time of 0.12 ms and a gate time of 5.00 ms were selected in all the experiments using intensity measurements.

### 2.3. General procedure

Unless otherwise noted, the samples were prepared by diluting the PAHs stock solutions in organic solvent medium to obtain a final concentration at the  $\text{ng ml}^{-1}$  level for the different analytes; 1–4 ml of 0.25 M thallium(I) nitrate (for ACEN, ANT, FLU and PYR) or 1–7 ml of  $2 \text{ mol l}^{-1}$  potassium iodide for rest of PAHs and 0.01–1.5 ml of  $0.1 \text{ mol l}^{-1}$  sodium sulfite were then added to the analyte solutions and finally diluted to 10 ml with water. The time of reaction of sulfite with dissolved oxygen was instantaneous in these experimental conditions.

Measurements of the samples and blanks were performed at maximum excitation and emission wavelengths of each analyte. In all the results presented here, RTP readings are reported as RTP intensity in relative units.

All measurements were made at  $20^\circ\text{C}$ .

## 3. Results and discussion

### 3.1. Spectral characteristics

The HAI-RTP excitation and emission spectra are presented in Fig. 1 for the 15 studied compounds. All spectra were obtained using excitation and emission slits of 20 nm, respectively, a decay time of 0.12 ms, gate times between of 5.00 ms and a detector voltage of 950 V. In the figure, the PAH concentrations at what the spectra were recorded are given.

The luminescence spectral characteristics of all the compounds under study have been summarized in Table 1, where the selected excitation and emission wavelengths and the measured lifetimes values for the 15 PAHs are collected.

As can be seen in Table 1, the maximum excitation and emission wavelengths obtained with the proposed methodology are very similar to those already described in the literature [2,33]. However, it is worth mentioning that lifetimes values obtained by the PAH by the proposed HAI-RTP methodology are slightly smaller than those previously published. This is due that in previously reported

methods, RTP emission from the PAHs were obtained after their immobilization in solid support or in micellar medium or cyclodextrin medium and these media can avoid non-radiative desactivation.

From data included in Fig. 1 and Table 1, it can be seen that, as expected, the RTP spectral characteristics of the PAHs seem to be considerably influenced by the chemical

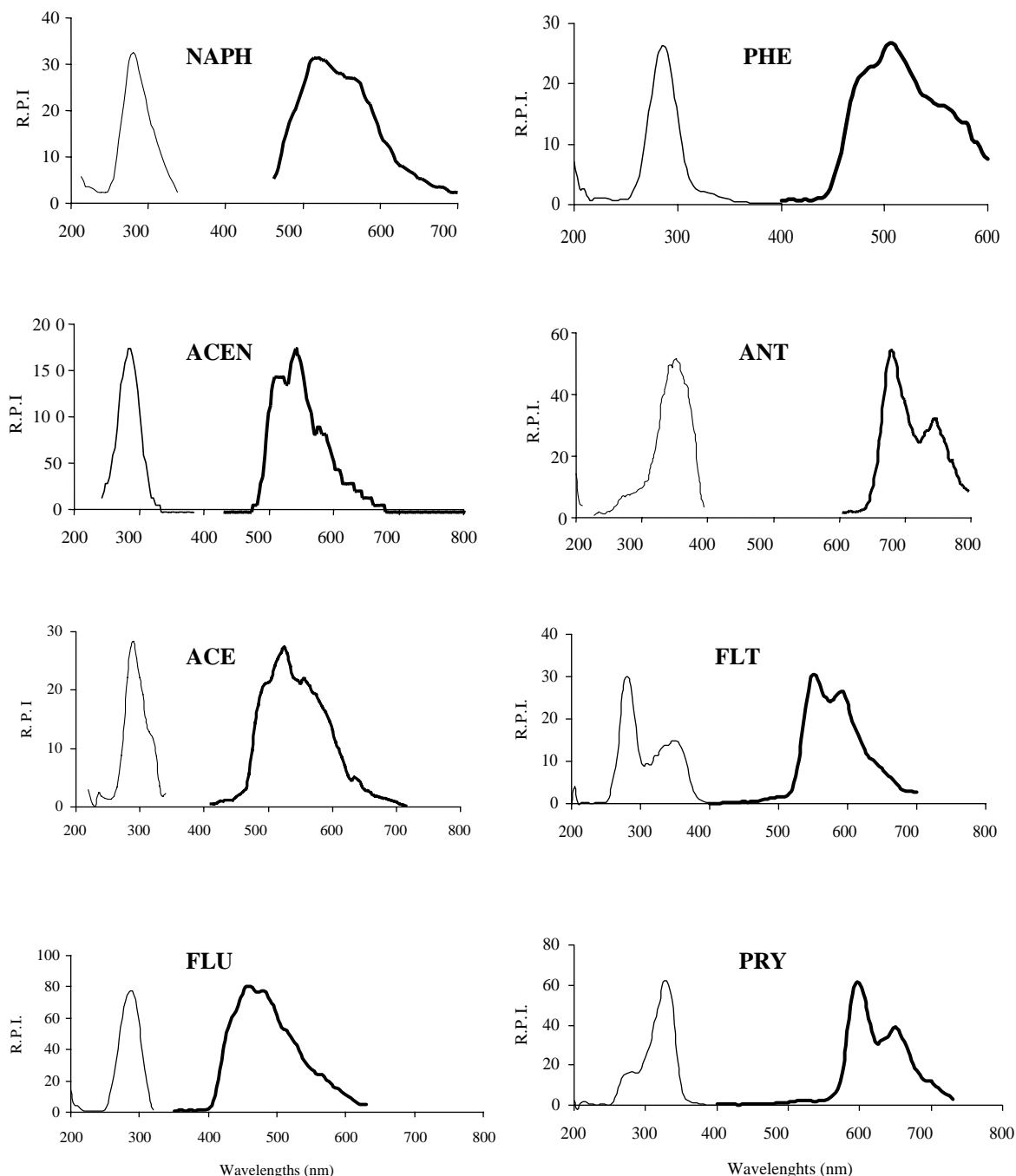


Fig. 1. RTP spectra excitation (thin line) and emission (thick line) of PAHs. Naphthalene ( $200 \text{ ng ml}^{-1}$ ), acenaphthylene ( $10 \text{ ng ml}^{-1}$ ), acenaphthene ( $100 \text{ ng ml}^{-1}$ ), fluorene ( $20 \text{ ng ml}^{-1}$ ), phenanthrene ( $50 \text{ ng ml}^{-1}$ ), anthracene ( $100 \text{ ng ml}^{-1}$ ), fluoranthene ( $5 \text{ ng ml}^{-1}$ ), pyrene ( $5 \text{ ng ml}^{-1}$ ), chrysene ( $3 \text{ ng ml}^{-1}$ ), benzo(a)anthracene ( $2 \text{ ng ml}^{-1}$ ), benzo(k)fluoranthene ( $5 \text{ ng ml}^{-1}$ ), benzo(b)fluoranthene ( $10 \text{ ng ml}^{-1}$ ), benzo(a)pyrene ( $40 \text{ ng ml}^{-1}$ ), indeno(1,2,3-cd)pyrene ( $5 \text{ ng ml}^{-1}$ ) and benzo(g,h,i)perylene ( $5 \text{ ng ml}^{-1}$ ).

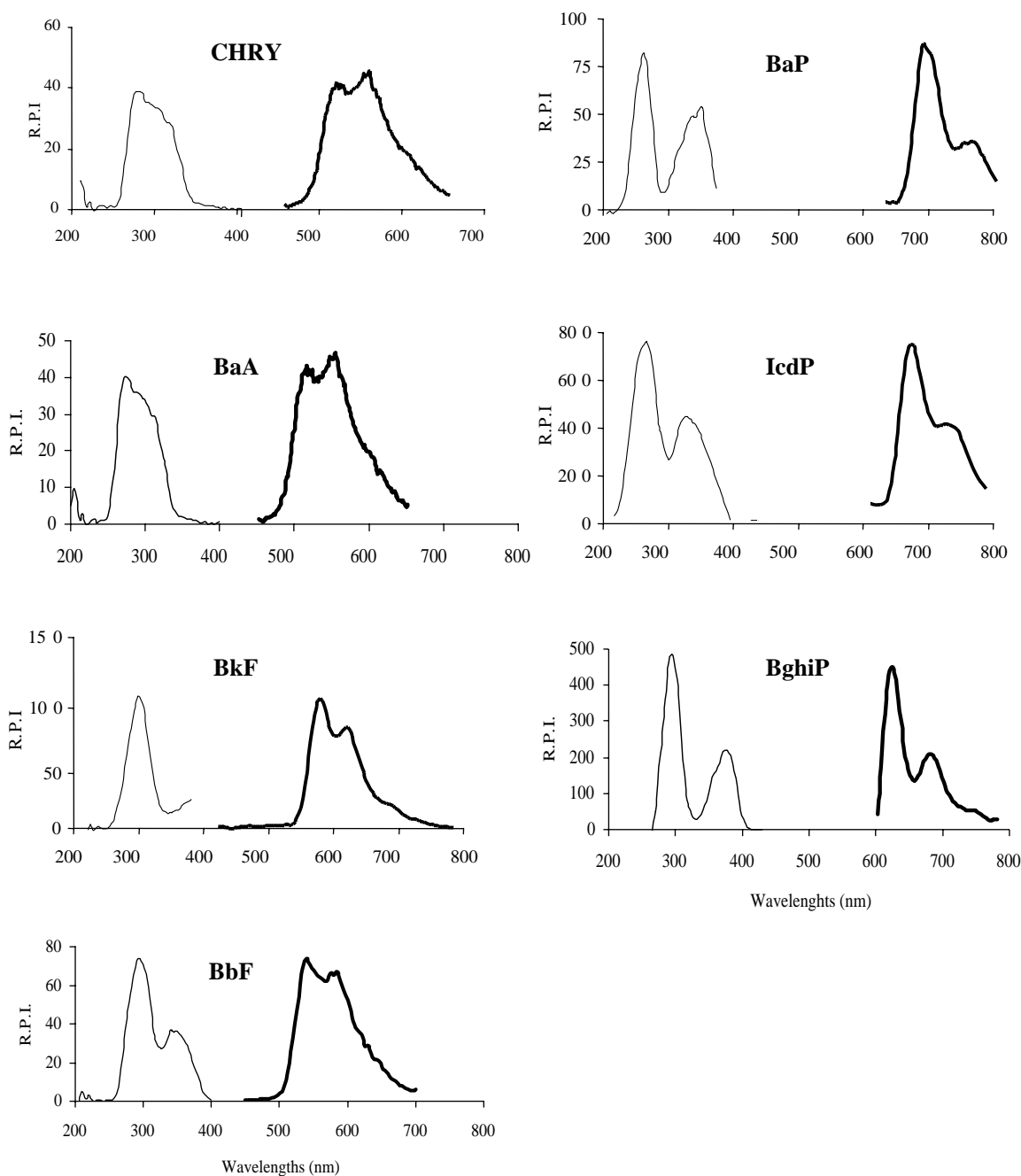


Fig. 1. (Continued).

structure of the analytes. As a general trend, longer emission wavelengths and triplet lifetimes were observed for those PAHs of higher size and number of conjugated aromatic rings. This could reflect the effect of the larger system of coupled orbitals in larger ring systems.

### 3.2. Optimizations of the HAI-RTP experimental conditions

An exhaustive optimization of the instrumental conditions, that may affect the phosphorescence emission and thus the PAHs characterization and determination, was carried out. In all optimizations the experimental conditions were

varied within certain limits searching for a better sensitivity in the phosphorescence determinations of the PAHs. The selection of optimum values was carried out following an univariant method (each variable was optimized maintain the rest of variables constant) and observing the changing of the phosphorescence intensity/noise ratio and trying to minimize the standard deviations of samples and blanks.

### 3.3. Instrumental conditions

The applied photomultiplier voltage influences directly both instrumental sensitivity and background. An increase

in the detector voltage from 600 to 1000 V produces a linear increment of the RPI signal from the PAHs analytes. It was also observed that an increase on the photomultiplier voltage up to 1000 V resulted in an increase in both the blank signal and in its standard deviation. An optimum value of 950 V (which resulted in the best signal to noise ratio for most of the PAHs under study) was selected for the rest of experimental work.

It was observed that changes in the excitation and emission slits drastically influence the measured RPI from the analytes, while they do not significantly affect the blank signal. The best signal to noise ratio for all PAHs under consideration was obtained for 20/20 nm excitation/emission slits (maximum values achievable with the luminometer). Thus, these values were selected for all subsequent studies.

In phosphorescence measurements using an instrument based on a pulsed excitation source it is necessary to ensure a delay time ( $t_d$ , time elapsed between the flash of the excitation source and the start of data acquisition) which should be long enough to discriminate the phosphorescence emission from all possible delayed fluorescence and from the emission light from the pulsed excitation source. After an appropriate delay time, a gate time ( $t_g$ ) should also be set which is the acquisition time after the delay time. Both instrumental parameters have a great influence on the measurement of the phosphorescence emission and their optimum values depend drastically on the analyte lifetime. Both variables must be studied and selected carefully for each compound to obtain the best signal/noise ratio.

Typically, an increase in the delay time resulted in a slight decay on the analyte signals, whilst noise deviation remains constant. A delay time of 0.120 ms after flash was selected for all the PAHs under investigation to ensure that the pulse of the Xe flash lamp has ceased.

Regarding the gate time, it was observed that the phosphorescence intensity signal from the analytes increased slightly with the increase of this parameter but the noise value also increased. On the other hand, a strong diminution of the standard deviation occurs in the signal and noise. An optimum value of 5.00 ms was selected for the rest of experimental work for all compounds.

### 3.4. Chemical conditions

One of the important factors affecting the RTP emission from the PAHs is the nature and concentration of the heavy atom perturbers used. Different heavy atom perturbers were studied including  $I^-$  and  $Tl^+$ . It was observed that most of the studied PAH analytes showed an intense phosphorescence emission when potassium iodide is present in the solution as the heavy atom salt. Only four of the 15 analytes studied (ACEN, ANT, FLU and PYR) showed higher phosphorescence emission in solution in the presence of thallium(I) nitrate as heavy atom perturber. In all cases, no phosphorescence emission was observed in the absence of a heavy atom perturber.

Table 2

Optimal experimental conditions of the proposed analytical method

Analyte	Heavy atom perturber	Acetonitrile (% v/v)
NAPH	KI	0
ACEN	TINO <sub>3</sub>	0
ACE	KI	0
FLU	TINO <sub>3</sub>	0
PHE	KI	0
ANT	TINO <sub>3</sub>	25
FLT	KI	25
PYR	TINO <sub>3</sub>	0
CHRY	KI	25
BaA	KI	25
BKF	KI	25
BbF	KI	25
BaP	KI	25
IcdP	KI	25
BghiP	KI	25

Regarding the heavy atom, for all of the 11 compounds which used potassium iodide (see Table 2), a similar behavior was observed between the heavy atom concentration and the phosphorescence emission intensity. In general, an increase in the heavy atom perturber concentration up to  $0.6 \text{ mol l}^{-1}$  gave rise to an increase in the phosphorescence signal intensity. An increase in the concentration from  $0.6$  to  $2 \text{ mol l}^{-1}$  did not further modify the RTP intensity from the analytes. A  $1.2 \text{ mol l}^{-1}$  potassium iodide was selected as optimal for this PAHs.

When TINO<sub>3</sub> was used as heavy atom perturber (Table 2), lower concentrations are enough to reach the maximum phosphorescent signal intensity from the PAHs. In this case, when Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> is used as oxygen scavenger, the presence of and excessive amount of TINO<sub>3</sub> resulted in the formation of a compound between  $Tl^+$  and  $SO_3^{2-}$ , so that the effective concentration of  $Tl^+$  in the solution (and thus the enhancing effect on the RTP emission) are decreased [34]. A concentration of  $0.05 \text{ mol l}^{-1}$  was selected for further experiments.

As the triplet state is quickly quenched by collision with solvent and oxygen molecules, it is essential to remove the oxygen thoroughly from the solution. For this purpose, we used the technique of chemical deoxygenation of aqueous solutions with sodium sulfite [20]. The optimum concentration of sodium sulfite added was evaluated by monitoring the RTP signal as a function of time. Concentration of sodium sulfite from  $1.0 \text{ mol l}^{-1}$  was added to a solution with a fixed concentration of the PAH analyte, in presence of the heavy atom salt selected, up to that concentration for which the HAI-RTP signal remained stabilized for at least 2 min.

It was observed that for the 15 analytes, stabilization time shortened concomitantly with the increase in sodium sulfite concentration because a more effective deoxygenation of the analyte solutions occurs. The optimum sodium sulfite concentration selected, for all PAHs was  $0.005 \text{ mol l}^{-1}$ .

PAHs are highly apolar compounds with a very low solubility in water media. In this paper, and in order to facilitate the complete characterization of these compounds within a



Table 3  
Analytical parameters of the proposed analytical methods

Compound	Analytical parameters				
	Linear interval (ng ml <sup>-1</sup> )	Correlation coefficient	Detection limits (ng ml <sup>-1</sup> )	Quantitation limits (ng ml <sup>-1</sup> )	R.S.D. (%) (mean value ng ml <sup>-1</sup> )
NAPH	0.12–400	0.998	0.12	0.41	1.82
ACEN	0.32–20	0.996	0.32	1.07	3.94
ACE	2.05–200	0.996	2.05	6.82	4.47
FLU	0.75–40	0.997	0.75	2.52	3.56
PHE	0.15–100	0.995	0.15	0.49	4.87
ANT	1.97–200	0.997	1.97	6.61	3.42
FLT	0.41–10	0.995	0.41	1.37	4.01
PYR	0.31–10	0.998	0.31	1.02	1.99
CHRY	0.25–6	0.995	0.25	0.82	3.83
BaA	0.12–4	0.998	0.12	0.39	2.41
BkF	0.32–10	0.998	0.32	1.08	2.55
BbF	0.34–20	0.999	0.34	1.13	1.87
BaP	0.82–80	0.996	0.82	2.75	3.71
IcdP	0.07–10	0.998	0.07	0.24	1.87
BghiP	0.55–10	0.995	0.55	1.84	3.49

broad concentration range we have added small percentages of organic solvents in the aqueous medium. This decreases the medium dielectric constant facilitating the solubilization of apolar compounds and consequently extending the application fields of the HAI-RTP methodology for these types of compounds.

The effect of five organic solvents miscible with water (acetone, ethanol, methanol, acetonitrile and dimethylformamide) has been studied. Following the general procedure described in Section 2, different volumes of the PAHs stock solutions were mixed with different percentages of organic solvents. After adding the heavy atom and the oxygen scavenger, the solutions were made up to volume with water and the HAI-RTP emissions were then recorded. The best results (higher RTP signals) were obtained in all cases with the use of acetonitrile. The effect of the presence of different percentages of the solvent on the RTP signal of the PAHs have been also optimized and the results are shown in Table 2. As can be seen in general the need for an organic solvent is greater when the insolubility of PAH in water increases. For six of these compounds additional organic solvents are not necessary and for the rest of the compounds the best signal were obtained for 25% of ACN/water (v/v).

Under these experimental conditions, phosphorescence signals for all of the 15 PAHs under study were instantaneously obtained and remained stable for, at least 1 h.

### 3.5. Analytical performance characteristics

Analytical performance characteristics of the 15 PAHs of EPA studied by the proposed methodology were evaluated. Standard calibration graphs, prepared according to the recommended procedure, were obtained for all the compounds studied. As can be seen in Table 3, a wide linear range was obtained for all the compounds under study. Standard errors

and correlation coefficients were also evaluated, and as can be seen in Table 3 in general good calibration linearity was obtained.

The detection limit, quantification limit, expressed as relative standard deviation, were determined using the method proposed by IUPAC [35]. All the features of the proposed method are summarized in Table 3.

## 4. Conclusions

This paper presents a simple and innovative way of obtaining RTP from PAHs in solution, without any kind of organized media. This opens up new possibilities of carrying out room temperature phosphorescence measurements in solution with very simple conditions. The analytical potential of the HAI-RTP methodology has been shown for the complete analytical characterization of 15 PAHs in solution. In fact, to our knowledge, this is the first time that an analytically useful RTP emission has been observed of some of the PAHs under study (including ACEN, ACE, ANT, BkF, BbF, IcdP and BghiP) in aqueous media. The combination of the high sensitivity offered by the developed HAI-RTP methodology and the performance of the instrumentation used in the experiments make it possible to observe significant RTP emission from those PAHs that were supposed not to be phosphorescent [19].

Because non-protected media is needed, the kinetic of deoxygenation is practically instantaneous. Moreover, temperatures near 0 °C can also be used because no precipitation problems exist, as occurs in CD-RTP or MS-RTP. All of these simplifications result in a significant improvement on the reported analytical characteristics (detection limits, analytical sensitivity and precision) of the proposed methodology as compared to other CD-RTP or MS-RTP methods traditionally proposed for this family of analytes.

The methodology proposed is simple and inexpensive. Moreover, most of the PAHs under study can be analyzed using the same experimental conditions. This could be used for the future development of a screening test, to easily discriminate between contaminated (by one or a mixture of such toxic PAHs) and uncontaminated samples.

Finally, the HAI-RTP developed methodology has a great potential as a highly selective and sensitive detection technique to be coupled with chromatographic separation techniques or to on-line systems such as in flow injection analysis (FIA).

### Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge the financial support from Ministerio de Ciencia y Tecnología, Spain (Projects PPQ2000-1291-C02-01 and MAT2003-09074-C02-01), Contract 1870 Junta de Andalucía and the grant support from Fundación CAJAMAR, Spain.

### References

- [1] P.A. Cerutti, *Science* 227 (1985) 375.
- [2] J. Jacob, *Pure Appl. Chem.* 68 (1996) 301.
- [3] B. Thomson, P. Muller, *Polycycl. Aromat. Comp.* 12 (1998) 249.
- [4] European Directive 98/83/EC.
- [5] G. Kiss, A. Gelencser, J. Hlavay, *J. Chromatogr. A* 774 (1996) 349.
- [6] T. Renner, D. Baumgarten, K.K. Unger, *Chromatographia* 47 (1997) 199.
- [7] B. Bodzek, B. Janoszka, M. Bodzek, *J. Chromatogr. A* 774 (1997) 177.
- [8] R. Ferrer, J. Guiteras, L. Beltrán, *Anal. Lett.* 29 (1996) 2201.
- [9] E. Manoli, C. Samara, *Chromatographia* 43 (1996) 135.
- [10] G. Gmeiner, G. Stehilk, H. Tausch, *J. Chromatogr. A* 767 (1997) 163.
- [11] B. Janoszka, K. Tyrpie, D. Bodzek, *J. Planar Chromatogr.* 9 (1996) 450.
- [12] R. Hartmann, *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 62 (1996) 161.
- [13] L. Rivera, M.J.C. Curto, P. Pais, L. Puignou, *J. Chromatogr. A* 731 (1996) 85.
- [14] P.B. Steinbach, R.J. Hurtubise, *Appl. Spectrosc.* 54 (2000) 287.
- [15] A. Andrade-eiroa, E. Vázquez Blanco, P. López Mahía, S. Muni-ategui, D. Prada Rodríguez, *Analyst* 125 (2000) 1321.
- [16] J. Kuijt, F. Ariese, U.A.Th. Brinkman, C. Gooijer, *Anal. Chim. Acta* 488 (2003) 135.
- [17] R.J. Hurtubise, *Phosphorimetry: Theory, Instrumentation, and Applications*, VCH, New York, 1990.
- [18] L.J. Cline Love, M. Skrilec, J.G. Habarta, *Anal. Chem.* 52 (1980) 754.
- [19] W.J. Jin, C.S. Lin, *Anal. Chem.* 65 (1993) 863.
- [20] M.E. Díaz García, A. Sanz Medel, *Anal. Chem.* 58 (1986) 1436.
- [21] S. Scypinski, L.J. Cline Love, *Anal. Chem.* 56 (1984) 322.
- [22] W.J. Jin, Y.S. Wei, A.W. Xu, C.S. Lin, *Spectrochim. Acta A* 50 (1994) 1769.
- [23] G.R. Ramos, I.M. Khasawneh, J.M. Winefordner, *Talanta* 35 (1988) 41.
- [24] A. Segura Carretero, C. Cruces Blanco, A. Fernández Gutiérrez, *Anal. Chim. Acta* 353 (1997) 337.
- [25] S.L. Wellons, R.A. Paynter, J.D. Winefordner, *Spectrochim. Acta A* 30 (1974) 2133.
- [26] T. Vo-Dinh, *Room Temperature Phosphorimetry for Chemical Analysis*, Wiley, New York, 1984.
- [27] A. Segura Carretero, C. Cruces Blanco, B. Cañabate Díaz, A. Fernández Gutiérrez, *Anal. Chim. Acta* 361 (1998) 217.
- [28] L.D. Li, Y.L. Chen, J. Zhao, A.J. Tong, *Anal. Chim. Acta* 341 (1997) 241.
- [29] L.D. Li, Y.L. Chen, A.J. Tong, *Talanta* 46 (1998) 1147.
- [30] A. Segura Carretero, C. Cruces Blanco, B. Cañabate Díaz, J.F. Fernández Sánchez, A. Fernández Gutiérrez, *Anal. Chim. Acta* 417 (2000) 19.
- [31] L.D. Li, J. Zhao, W.Q. Long, A.J. Tong, *Spectrochim. Acta A* 57 (2001) 385.
- [32] X.K. Chen, L. Mou, L.D. Li, *Spectrosc. Spectrom. Anal.* 21 (2001) 215.
- [33] E.D. Hagestuen, A.D. Campiglia, *Talanta* 52 (2000) 727.
- [34] N.E. Nugara, A.D. King, *Anal. Chem.* 61 (1989) 1431.
- [35] IUPAC, *Pure Appl. Chem.* 105 (1976) 45.

**ANEXO VI**



# A facile flow-through phosphorimetric sensing device for simultaneous determination of naptalam and its metabolite 1-naphthylamine

A. Salinas-Castillo<sup>a</sup>, J.F. Fernández-Sánchez<sup>b</sup>, A. Segura-Carretero<sup>a,\*</sup>,  
A. Fernández-Gutiérrez<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Department of Analytical Chemistry, Faculty of Sciences, University of Granada, C/Fuentenueva s/n, E-18071 Granada, Spain

<sup>b</sup> Center for Chemical Sensors, Swiss Federal Institute of Technology Zurich (ETHZ), Technoparkstrasse 1, CH-8005 Zürich, Switzerland

Received 29 April 2004; received in revised form 21 June 2004; accepted 21 June 2004

Available online 1 August 2004

## Abstract

This paper presents the development of a single flow-through phosphorescence optosensor for simultaneous determination of pesticide *N*-1-naphthylphthlamic acid (NAP) and its metabolite 1-naphthylamine (NNA). The system works as a simple and rapid phosphorimetry-biparameter sensor. It is based in the on-line immobilization of the analytes onto a non-ionic resin solid support (Amberlite XAD 7) in a continuous flow system, followed by the measurement of their native phosphorescence. The determination was performed using 0.2 M TiNO<sub>3</sub> and 15 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> in a carrier flow. The developed sensor was satisfactorily applied to the determination of these pesticides in drinking and mineral waters (recovery percentages between 82.8 and 114.1% with inferior relative standard deviations to 3.1%).

© 2004 Elsevier B.V. All rights reserved.

**Keywords:** Phosphorescence; Optical sensor; Flow injection; Pesticide; Naptalam; 1-Naphthylamine; Water

## 1. Introduction

Because of their widespread use in modern agricultural production, pesticides contribute significantly to the contamination of the environment, particularly of soil, and surface and underground waters. Presently, the worldwide consumption of pesticide is difficult to estimate since the number of different pesticides used in agricultural purposes exceeds several thousands [1–3]. Therefore, the input of agrochemical pollutants in the environment has increased proportionally the number of analytical methods, but more sensitive and selective analytical methods are needed for residue analysis of these pollutants.

Naptalam (IUPAC name: *N*-1-naphthylphthlamic acid) is a pre-emergency pesticide used in cucurbits, groundnuts and soybeans and 1-naphthylamine is one of the degradation products that is accompanying it. The importance of the analysis of naptalam does not stem from the toxicity of this com-

pound (acute oral median lethal dose, LD<sub>50</sub>, for rats 8200 mg a.i. (active ingredients) kg<sup>-1</sup>) [4], but it does stem from the possible presence of 1-naphthylamine (LD<sub>50</sub> = 96 mg kg<sup>-1</sup> for mouse) [5] whose cytotoxic and genotoxic effects are well known [5,6].

In the literature, there are a big amount of investigations on the determination of naptalam and its degradation product 1-naphthylamine in various media such as river water, drinking water, urine, etc. [7,8]. These studies have been carried out by using principally spectrometric [9,10] and chromatographic methods [11–13].

The high sensitivity and selectivity provided by luminescence-based techniques are favourable features that explain that many of those typically simple and low-cost analytical techniques are already established in many analytical laboratories, although fluorimetry has been extensively used in routine analysis.

Room temperature phosphorescence (RTP) offers several advantages over fluorescence as a detection mode derived from the longer excited-state lifetimes of phosphorescence reagents, the larger Stokes' shifts of the RTP processes that

\* Corresponding author. Tel.: +34-958243296; fax: +34-958249510.

E-mail address: [ansegura@ugr.es](mailto:ansegura@ugr.es) (A. Segura-Carretero).

simplify the spectral separation between the scattered excitation light and the desired phosphorescence emission and the high selectivity of the phenomena (only a very few number of compounds are able to emit analytically useful phosphorescence at room temperature) explain why room temperature phosphorimetry has demonstrated to be a powerful analytical tool for certain organic and inorganic trace determinations. A quite recent extensive review collects most of the wide variety of applications in which RTP has been used [14].

The combination of flow-injection techniques with detection on optically active surfaces packed in a flow-through cell (“optosensor” [15,16]) has proved to offer important advantages due to its high sensitivity and selectivity, precision, simplicity, speed and low cost [17]. Further developments of these optosensing techniques have shortened analysis time considerably and reduced costs for routine environmental control.

Many optosensors have been used with fluorimetric detection to determine of several pesticides in water, including naptalam [18–20]. Nevertheless, few optosensors have been used with room temperature phosphorescence (RTP) detection. Only RTP optosensing methods based on principles such as biomolecular quenching, enhancement of intersystem crossing, sensitized lanthanide luminescence and modulation of energy transfer have been developed [14], never it has been develop a sensor based on the direct measurement of native phosphorescence signal.

In this paper, the simultaneous determination of two phosphorescence analytes is carried out using a optosensor based on the direct measurement of native phosphorescence signal from these analytes selectively retained on a commercial resins. The direct sorption of these analytes on a sensing solid zone without previous derivatization simplifies considerably the flow injection manifold used in developing simple automatic technique for routine analysis of these compounds.

## 2. Experimental

### 2.1. Reagent

Analytical reagent-grade chemicals were employed for the preparation of all the solutions. Thallium (I) nitrate, potassium iodide and anhydrous sodium sulphite were purchased from Sigma Chemical Co. and were used as-received. Solutions of potassium iodide (2 M) were prepared. Thallium nitrate solution at 0.25 M concentration was prepared. The 0.1 M sodium sulphite solutions were prepared daily and kept in tightly stoppered containers.

Stock standard solutions  $12.5 \mu\text{g mL}^{-1}$  of naptalam (NAP) (Sigma Chemical Co.) and  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$  of 1-naphthylamine (NNA) (Sigma Chemical Co.) were prepared in deionised water, stored below  $5^\circ\text{C}$  and protected from the light.

The water used was twice distilled and prepared with a Milli-Q system (Millipore, Bedford, MA, USA).

The pesticide, its metabolite and thallium (I) nitrate solutions were handled with extreme caution; nitrile gloves were worn when working with the solutions and a low-maintenance respirator with the appropriate filters and disposable spatulas and weighing dishes when handling them in solid form. The wastes were collected in suitable residue containers for processing according to international norms.

The strongly basic anion-exchanger resins Dowex  $1 \times 2-100$ , Dowex  $1 \times 4-100$ , Dowex  $1 \times 8-100$ , Denom Sephadex-QAE A-25 and Deae Sephadex A-25 (Sigma), the strongly acid cation-exchanger resins Dowex  $50\text{w} \times 2-100$ , Dowex  $50\text{w} \times 4-100$ , Dowex  $50\text{w} \times 8-100$  (Fluka), Sephadex-SP C-25, and Denom Sephadex-CM C-25 (Sigma) and the non-ionic resins Amberlite XAD 2, Amberlite XAD 4, Amberlite XAD 7, Silica Gel Davisil and Silica Gel Merck (Sigma) were sieved and then tested at five-grain size (40–63, 63–80, 80–120, 120–160 and  $>160 \mu\text{m}$ ), except all Sephadex that were sieved until  $120 \mu\text{m}$ .

### 2.2. Instrumentation and flow set-up

A Varian Cary Eclipse Luminescence Spectrometer (Varian Iberica, Madrid, Spain) was used to obtain the phosphorescence spectra and the relative phosphorescence intensity measurements. This spectrometer has equipped with a xenon discharge lamp (peak power equivalent to 75 kW), Czerny-Turner monochromators, R-928 photomultiplier tube which is red sensitive (even 900 nm) with manual or automatic voltage controlled using the Cary Eclipse software for Windows 95/98/NT system. The photomultiplier detector voltage was 900 V and the instrument excitation and emission slits were set at 20 and 20 nm, respectively. The delay time used were typically 0.12 ms and the gate time was 5 ms.

Fig. 1 illustrates the optosensing manifold used. A Hellma Model 176.052-QS flow-through cell of  $25 \mu\text{L}$  volume was packed with the corresponding resin and placed in the conventional sample compartment of the detector. Two rotary valves (Sepulco 5020) were used for sample introduction and for elution of the retained analytes. PTFE tubing (0.8 mm i.d.) and fittings were used for connecting the flow-through cell, the rotary valves and the carrier solution reservoirs. A Gilson Minipuls-3 peristaltic pump was used to generate the flow stream.

pH measurements were made with a MicropH 2002 meter (Crison, Barcelona, Spain).

### 2.3. General procedure

Samples were prepared by adding to the analytes different amounts of  $\text{TINO}_3$  and  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  until to obtain 0.2 M and 15 mM concentration level, respectively. 2 mL of the sample was injected through the injection valve into a channel of 0.2 M  $\text{TINO}_3$  and 15 mM  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . The analytes were kept

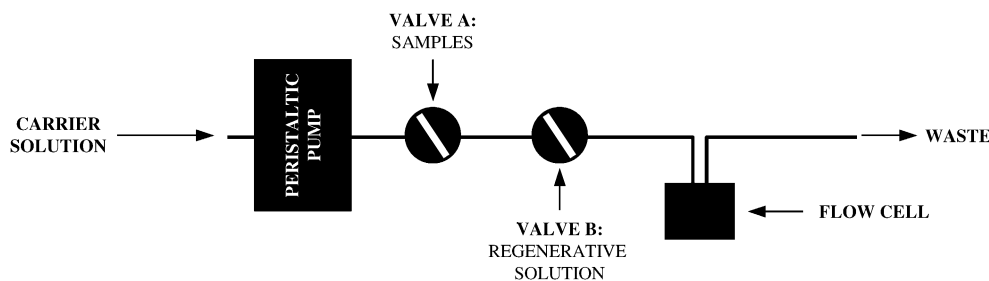


Fig. 1. Flow manifold used. (A) Sample injection valve; (B) regenerative solution valve.

in the flow cell at a  $0.75 \text{ mL min}^{-1}$  flow-rate on Amberlite XAD 7 and the phosphorescence was measured at  $\lambda_{\text{exc/em}} = 295/525$  and  $325/555 \text{ nm}$  (slits of  $20 \text{ nm}$  for excitation and emissions) for NAP and NNA, respectively. The instrument was set up as follow: detector voltage, gate time ( $t_g$ ) and delay time ( $t_d$ ) were kept constant at  $900 \text{ V}$ ,  $5$  and  $0.12 \text{ ms}$ , respectively. Regenerative solution ( $\text{HNO}_3$   $15 \text{ M}$ ;  $250 \mu\text{L}$ ) were injected through the regenerative valve to strip the retained analytes from the solid phase before proceeding with the next injection. The measurements were always repeated at least three times to evaluate the error of the measurements. All measurements were made at  $20^\circ\text{C}$ .

#### 2.4. Water sample procedure

Samples of drinking waters from the city of Granada and mineral waters were spiked with diverse amounts of NAP and NAA and subjected to the general procedure. The waters underwent no previous treatment.

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Selection of the active phase and regenerative solution

The strongly basic anion-exchanger resins Dowex  $1 \times 2-100$ , Dowex  $1 \times 4-100$ , Dowex  $1 \times 8-100$ , Denom Sephadex-QAE A-25 and Deae Sephadex A-25, the strongly acid cation-exchanger resins Dowex  $50\text{w} \times 2-100$ , Dowex  $50\text{w} \times 4-100$ , Dowex  $50\text{w} \times 8-100$ , Sephadex-SP C-25, and Denom Sephadex-CM C-25 and the non-ionic resins Amberlite XAD 2, Amberlite XAD 4, Amberlite XAD 7, Silica Gel Davisil and Silica Gel Merck were studied. Only some of them were useful to retain the analytes and the highest differences between noise and signal were obtained using Amberlite XAD 7 in both cases. Hence using this resin, different grain sizes were tested and an improvement in the analytical signal is observed when the grain size decrease, but the limit is imposed by the pressure produced in the system. The interval  $80-120 \mu\text{m}$  was chosen as suitable mesh size to avoid the extra-pressure in both cases.

Finally, studies of optimum regenerative solution were carried out to transform the system into a reusable one.

Different acids, bases and organic solvents were tested and the optimum regenerative solution selected was  $\text{HNO}_3$  ( $15 \text{ M}$ ).

#### 3.2. Phosphorescence properties on solid surface

The phosphorescence excitation and emission spectra of the NAP and NNA on the non-ionic resins were recorded. Fig. 2 shows that NAP emits phosphorescence with maximum excitation intensity at  $295 \text{ nm}$  and maximum emission intensity at  $525 \text{ nm}$  and NNA emits phosphorescence with maximum excitation and emission intensity at  $325$  and  $555 \text{ nm}$ , respectively.

#### 3.3. Optimisation of instrumental parameters

An exhaustive optimisation of the instrumental conditions, that could affect the phosphorescence emission and thus the analytes characterization and determination, was carried out. The selection of optima values was carried out following an univariant method and observing the changing of the phosphorescence intensity/noise ratio and trying to minimize the standard deviations of samples and blanks for both analytes. Fig. 3 shows the experimental results obtained in the optimisation of instrumental parameters.

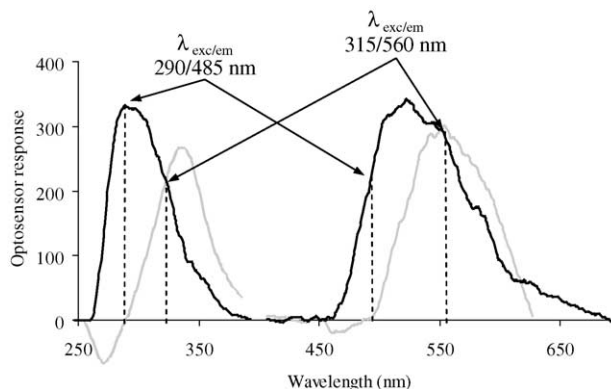


Fig. 2. Projected two-dimensional spectra of NAP (—) and NNA (---) immobilized onto Amberlite XAD 7.  $[\text{NAP}] = 300 \text{ ng mL}^{-1}$ ,  $[\text{NNA}] = 300 \text{ ng mL}^{-1}$ . See Table 1 to know the instrumental, experimental and flow variables used.

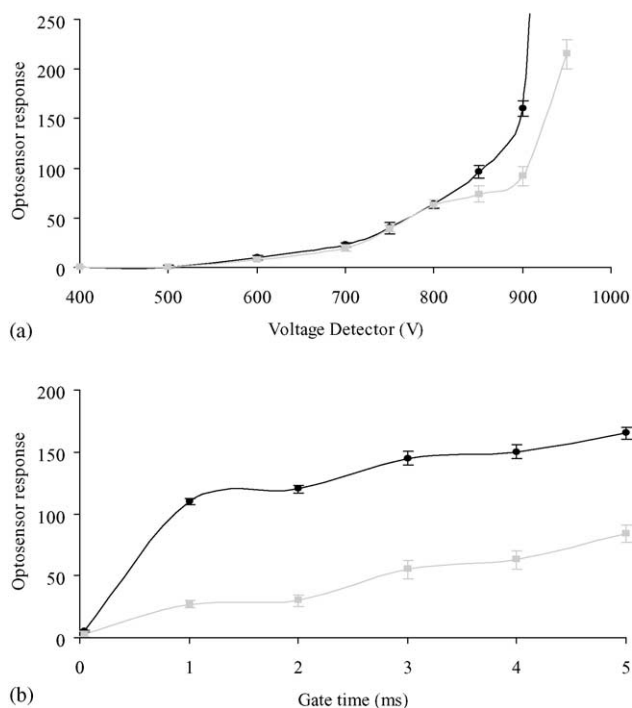


Fig. 3. Optimisation of instrumental parameters of NAP (●) and NNA (□) immobilized onto Amberlite XAD 7. (a) Optimisation of voltage detector. (b) Optimisation of gate time. [NAP] = 300 ng mL<sup>-1</sup>, [NNA] = 300 ng mL<sup>-1</sup>. See Table 1 to know the instrumental, experimental and flow variables used.

The applied photomultiplier voltage influences directly both instrumental sensitivity and background. An increase on the detector voltage from 600 to 1000 V produces a linear increment of response optosensor. It was observed also that an increase on the photomultiplier voltage up to 950 V increases the blank signal and its standard deviation and the detector is saturated with the NAP emission light when the voltage up to 900 V. For these reasons, an optimum value of 900 V which resulted in the best signal to noise ratio for both analytes under study and the detector is not saturated was selected (see Fig. 3a).

Changes in the excitation and emission slits affect drastically to the measurement RPI and do not affect significantly to the blank signal. The best signal to noise ratio for NAP and NNA was obtained for 20/20 nm excitation/emission slits (maximum values achievable with the luminescence spectrometer).

In phosphorescence measurements using an instrument based on a pulsed excitation source it is necessary to ensure a delay time ( $t_d$ , time elapsed between the flash of the excitation source and the start of data acquisition). After an appropriate delay time, it should be also set a gate time ( $t_g$ ), that is the acquisition time after the delay time. Both instrumental parameters have a great influence on the measurement of the phosphorescence emission and their optimum values depend on the analyte lifetime. Typically, an increase on the delay time resulted in a slight decay on the analyte sig-

nals, while noise deviation remains constant. A delay time of 0.12 ms after flash was selected for two compounds under investigation to ensure that the pulse of the Xe flash lamp has ceased.

Regarding to the gate time, Fig. 3b shows that the response optosensor from the analytes increased slightly with  $t_g$  increase while the noise value also increased. On the other hand, a strong diminution of the standard deviation occurs owing signal and noise. An optimum value of 5.00 ms was selected for NAP and NNA.

### 3.4. Effect of kind and concentration of heavy atom and oxygen scavenger

The effect of two heavy atom salts, KI and TlNO<sub>3</sub>, has been studied, but only TlNO<sub>3</sub> provides phosphorescence emission signals in both cases.

No phosphorescence response of NAP or NNA was obtained in the total absence of TlNO<sub>3</sub>, while, in general, the RTP intensity increased with increasing heavy atom concentration. The best difference between noise and phosphorescence signal was obtained by using a concentration of 0.2 M of TlNO<sub>3</sub> for both analytes (see Fig. 4a).

Sulphite ion can be used as an efficient oxygen scavenger to minimize RTP quenching. Different amounts of sodium sulphite were added to a solution with a fixed amount of analytes and heavy atom salt while the concentration of

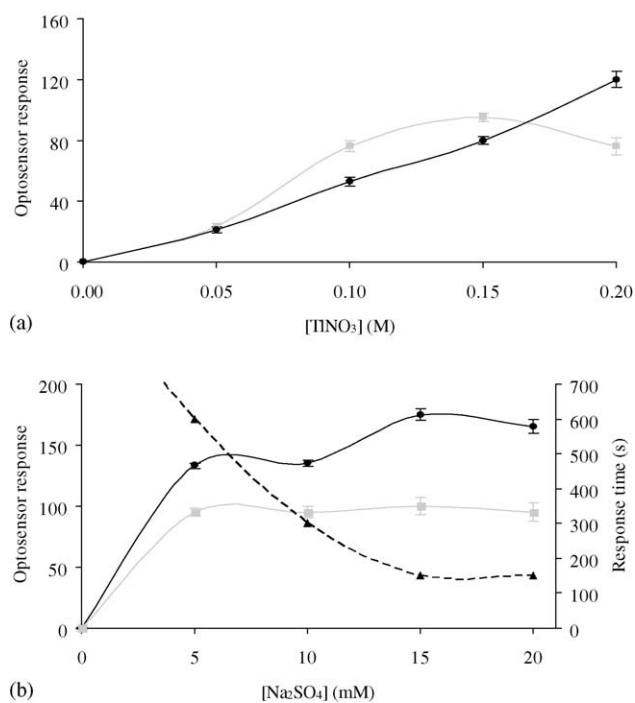


Fig. 4. Optimisation of chemical variables of NAP (●) and NNA (□) immobilized onto Amberlite XAD 7. (a) Optimisation of thallium nitrate concentration. (b) Optimisation of oxygen scavenger concentration and (▲) response time. [NAP] = 300 ng mL<sup>-1</sup>, [NNA] = 300 ng mL<sup>-1</sup>. See Table 1 to know the instrumental, experimental and flow variables used.



sodium sulphite was varied from 0 to 20 mM. No phosphorescence response of NAP or NNA was obtained in the total absence of oxygen scavenger. An increasing in the concentration level of  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  produces an increasing in the optosensor response and a decreasing in the response time. A 15 mM sodium sulphite concentration was selected as optimum for two analytes because it shows the highest optosensor response and the lowest response time (see Fig. 4b).

### 3.5. Influence of pH

pH affects the dissociations of the different compounds and consequently, the retention on the different exchanger resins. Also affects to the deoxygenating system.

Different pHs ranging from 4 to 11 were studied with a solution of a fixed amount of NAP and NNA under the optimum conditions. An increase in pH of up to 8.0 increases the phosphorescence signal intensity concomitantly. Higher pHs to 8 do not produce any change in the optosensor response. For this reason, some pH value between 8 and 9 seems to be the best to obtain a good optosensor response.

On the other hand, pH which have the sample when the analyte(s), the heavy atom and the oxygen scavenger in added is about 9, so is not necessary to use any buffer solution to set the sample and carrier's pH, simplifying the system.

### 3.6. Flow-rate and injection volume optimisation

The capability of solid support to retain analytes changes with carrier flow-rate from 0.5 to 2  $\text{mL min}^{-1}$ . An increase of flow-rate decreased significantly the phosphorescence signal but also decreased the response time of the sensor. So, optimum value of 0.75  $\text{mL min}^{-1}$  was chosen for the rest of experimental work for the two analytes.

Injection volume of sample affects considerably the phosphorescence emission signals. An increase of injection volume increased the phosphorescence signal (resulting in a plateau when injection volume is greater than 3 mL) and also increase the response time. In order to have a no excessive response time and a good signal, 2 mL was chosen as optimum injection volume.

### 3.7. Conditions for simultaneous determination of NAP and NNA

Table 1 shows a resume of the optima instrumental, experimental and flow variables used on the simultaneous determination of NAP and its metabolite NNA.

To develop an optosensor for simultaneous determination of NAP and NNA it is necessary to set the excitation and emission wavelengths to measure the samples. Using the phosphorescence spectra of each analyte, it is possible to set two spectral pairs of wavelength, one of these to determine NAP (290/485 nm) and the other to determine the sum of both

Table 1  
Optimum instrumental, experimental and flow parameters

	Optimum values
$\lambda_{\text{exc/em}}$ (nm)	
NAP	295/525
NNA	325/555
Detector voltage (V)	900
Slits (excitation/emission) (nm)	20/20
$t_d/t_g$ (ms)	0.12/5.00
[TINO <sub>3</sub> ] (M)	0.20
[Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> ] (mM)	15
Flow-rate ( $\text{mL min}^{-1}$ )	0.75
Volume injection (mL)	2

analytes (315/560 nm). In Fig. 2 is possible to see the set pairs of wavelengths.

Using these wavelengths for simultaneous determining and quantifying of NAP and NAA is necessary to establish a two system equations like this:

$$I_1 = b_1[\text{NAP}] + a_1$$

$$I_2 = b_2[\text{NAP} + \text{NAA}] + a_2$$

where  $I_1$  is the optosensor response,  $b_1$  is the slope of the calibration graphs and  $a_1$  is the intercept of the calibration graph when 290/485 nm are using as excitation and emission wavelengths. And,  $I_2$ ,  $b_2$  and  $a_2$  are the optosensor response, the slope and the intercept of the calibration graph, respectively, when 315/560 nm are using as excitation and emission wavelengths.

### 3.8. Optosensor performance

Two standard linear calibration graphs were drawn according to IUPAC recommended procedures at  $\lambda_{\text{exc/em}} = 290/485$  nm and at  $\lambda_{\text{exc/em}} = 315/560$  nm, respectively. The regression equations were:

$$I_1 = 0.2628[\text{NAP}] - 2.554$$

$$I_2 = 0.0677([\text{NAP}] + [\text{NNA}]) + 23.411$$

The correlation coefficients ( $r$ ) were 0.9988 and 0.9973, respectively. All the features of the proposed optosensor are summarised in Table 2. So, using the device which we are presenting in this paper it is possible to determine and quantify amounts higher than 8.1 and 30.2  $\text{ng mL}^{-1}$  of NAP, respectively and amounts higher than 11.2 and 50.1  $\text{ng mL}^{-1}$  of sum of both analytes with a very good relative standard deviation, none higher than 2.7%.

### 3.9. Applications of the optosensor to real sample analysis

To test the ability of the optosensor drinking water from the city of Granada and mineral water samples (with analytes content bellow the concentration levels detectable by proposed system) were spiked with NAP and NNA at different

Table 2  
Analytical parameters of the proposed optosensor

$\lambda_{\text{exc/em}}$ (nm)	Analyte detected		Estimated value
290/485	NAP	Linear range (ng mL <sup>-1</sup> )	8.1–300.0
		Limit of detection (ng mL <sup>-1</sup> )	8.1
		Limit of quantification (ng mL <sup>-1</sup> )	30.2
		R.S.D. (%) at 150 ng mL <sup>-1</sup>	2.7
315/560	NAP and NNA	Linear range (ng mL <sup>-1</sup> )	11.2–800.0
		Limit of detection (ng mL <sup>-1</sup> )	11.2
		Limit of quantification (ng mL <sup>-1</sup> )	50.1
		R.S.D. (%) at 400 ng mL <sup>-1</sup>	1.0

Table 3  
Recovery study of spiked water samples

	Added value (ng mL <sup>-1</sup> )		Found value (ng mL <sup>-1</sup> )		Recovery per- centage (%)		R.S.D. (%)	
	NAP	NNA	NAP	NNA	NAP	NNA	NAP	NNA
Tap 1	400	–	383	–	95.7	–	2.5	–
Tap 2	400	600	362	530	98.2	102.8	1.9	3.1
Tap 3	–	300	–	257	–	97.2	–	1.6
Mineral 1	200	–	195	–	104.2	–	0.9	–
Mineral 2	–	400	–	413	–	82.8	–	2.4
Mineral 3	300	600	271	684	90.5	114.1	1.8	2.7

levels and treated under water sample procedure. The experimental results are shown in Table 3. It shows that the recovery percentages are closed to 100% (the results vary between 82.8 and 114.1% for mineral water samples and 90.5 and 104.2% for tap water) with very low relative standard deviation (for seven replicates) no higher than 3.1% in all cases.

#### 4. Conclusions

The continuous flow-through solid surface phosphorescence system developed has proved to be useful for the simultaneous determination of NAP and NNA at ng mL<sup>-1</sup> level. The system is based on the measurement of their native phosphorescence signal when they are sorbet on-line on the beans of a non-ionic resin, and so no derivate reagents are needed. The procedure shows very good analytical features and its applicability to the analysis of these two pesticides in real samples have been proved, offering important advantages due to its sensitivity and selectivity, precision, simplicity, speed and low cost and doing possible the considerably shortening analysis time and reducing costs for environmental controls. For these reasons, it would be a powerful tool in routine labs.

Also, we present the first phosphorimetric sensor described for the simultaneous determination of two pesticides. It contributes to increase the scare number of spectroscopy flow-through sensor described to analyse pesticides.

#### Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge the financial support of Ministerio de Ciencia y Tecnología (project MAT2003-09074-C02-01), Consejería Medio Ambiente de la Junta de Andalucía (agreement no. 1870) and Fundación CAJAMAR, Spain. They also acknowledge the financial support of a work contract of Junta de Andalucía (Ayuda para el Perfeccionamiento de Doctores en Universidades Fuera de Andalucía).

#### References

- [1] J. Sherma, *Anal. Chem.* 67 (1995) 1R.
- [2] J. Sherma, *Anal. Chem.* 65 (1993) 40R.
- [3] *The Agrochemical Handbook*, third ed., The Royal Society of Chemistry, London, 1991.
- [4] *The Pesticide Manual*, A World Compendium, eighth ed., The British Crop Protection Council, 1987.
- [5] Database in Dialog Corporation INC., Palo Alto, California, Registry of Toxic Effects of Chemical Substances (RTECS), National Institutes for Occupational Safety and Health (NIOSH).
- [6] T. Ohba, S. Shimizu, S. Suzuki, *Bull Environ. Contam. Toxicol.* 31 (1983) 278.
- [7] T.G. Díaz, M.I. Acedo, A.M. De la Peña, M.S. Peña, F. Salinas, *Analyst* 119 (1994) 1151.
- [8] A. Granados, M. Nassetade, R.H. Rossi, *J. Agric. Food Chem.* 43 (1995) 2493.
- [9] A.E. Smith, G.M. Stone, *Anal. Chem.* 25 (1988) 1397.
- [10] T.G. Díaz, M.I. Acedo Valenzuela, F. Salinas, *Fresenius J. Anal. Chem.* 350 (1994) 692.
- [11] T.A. Bellar, W. Budde, *Anal. Chem.* 60 (1988) 2076.
- [12] S. Butz, H.J. Stan, *Anal. Chem.* 67 (1995) 620.
- [13] H.J. Stan, M.L. Inkerhagner, *J. Chromatogr. A* 750 (1996) 369.
- [14] J. Kuijt, F. Ariese, U.A.Th. Brinkman, C. Gooijer, *Anal. Chim. Acta* 488 (2003) 135.
- [15] M. Valcárcel, M.D. Luque de Castro, *Flow-Through (Bio) Chemical Sensors*, Elsevier, The Netherlands, 1994.
- [16] J. Ruzicka, E.H. Hansen, *Anal. Chim. Acta* 173 (1985) 3.
- [17] A. Fernández Gutiérrez, G. Schulman, *Fosforescencia Molecular Analítica: Una Aproximación Práctica*, Editorial Universidad de Granada, Granada, 2003.
- [18] T. Galeano Díaz, M.I. Acedo Valenzuela, F. Salinas, *Anal. Chim. Acta* 384 (1999) 185.
- [19] F. Capitán, E. Alonso, L.F. Capitán Valley, J.L. Vílchez, *Anal. Chem.* 65 (1993) 1336.
- [20] M.J. Ruedas Rama, A. Ruíz Medina, A. Molina Díaz, *Anal. Chim. Acta* 459 (2002) 235.

**ANEXO VII**



# **Solid-surface phosphorescence characterization of polycyclic aromatic hydrocarbons and selective determination of benzo(a)pirene in water sample**

**A. Salinas Castillo, A. Segura Carretero<sup>✉</sup>, A. Fernández Gutiérrez**

*Department of Analytical Chemistry, Faculty of Sciences, University of Granada, C/ Fuentenueva s/n, E-18071 Granada, Spain.*

## **Abstract**

This paper presents the phosphorescence characterization of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) on solid-surface for obtaining new flow-through phosphorescence optosensors for PAHs based on-line, immobilized onto a non-ionic resin solid support coupled to a continuous flow system and the applications for the selective determination of BaP. The phosphorescent characterization of fifteen PAHs, described as major pollutants by the Environmental Protection Agency (EPA) (naphthalene, acenaphthylene, acenaphthene, fluorene, phenanthrene, anthracene, fluoranthene, pyrene, chrysene, benzo(a)anthracene, benzo(k)fluoranthene, benzo(b)fluoranthene, benzo(a)pyrene, indeno(1,2,3-cd)pyrene, benzo(g,h,i)perylene and dibenzo(a,h)anthracene) has been carried out. The experimental variables (heavy atom, deoxygenation and organic solvent in samples) for obtaining different possibilities for developing mono and multiparameter PAH sensors and the conditions for PAH screening have been carefully studied and the experimental conditions to determination of BaP in presence of other PAHs in water samples have been optimized.

*Keywords:* Phosphorescence optosensor; Flow injection; Polycyclic aromatic hydrocarbons; Benzo(a)pirene; Water.

<sup>✉</sup>Author to whom correspondence may be sent:

Dr. Antonio Segura

Tel.: +34 958243296;

Fax: +34 958249510.

*E-mail address:* ansegura@ugr.es

## 1. Introduction

There is a critical demand for rapid and simple screening techniques for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in environmental samples. The development of sensors leads to short turnaround analysis time and reduces costs for environmental monitoring. These potentially hazardous chemicals are widely present in industrial waste gas, automobile exhaust, coal tars, cigarette smoke and meat products, which constitute the most common ways of exposure of humans to the PAHs. Due to the high toxicity of these compounds and, particularly their carcinogenic/mutagenic character these PAHs are listed by the Environmental Protection Agency (EPA) as priority pollutants. In fact, PAHs have an important negative environmental impact and they can negatively effect to the quality of life. Therefore, their identification and analytical quantification are of great importance.

Identification and quantification of PAHs is usually made by HPLC with UV-visible, fluorimetric or amperometric detection or by GC-MS or GC-FID [1-5] and most of them include a preconcentration step. These steps are time consuming and require a great deal of effort.

The high sensitivity and selectivity provided by luminescence-based techniques are favourable features which explain why many of these typically simple and low-cost analytical techniques are already established in many analytical laboratories. Although fluorimetry has been extensively used, room temperature phosphorescence (RTP) offers several advantages over fluorescence as a detection mode derived from the longer excited-state lifetimes of phosphorescent analytes. Room temperature phosphorimetry has proved to be a powerful analytical tool for certain organic and inorganic trace determinations [6]. A quite recent extensive review collects most of the wide variety of applications in which RTP has been used [7].

The combination of flow-injection techniques with detection on optically active surfaces packed in a flow-through cell ("optosensor"[8,9]) has proved to offer important advantages due to its high sensitivity and selectivity, precision, simplicity, speed and low cost [10,11].

A goal for the analysis of PAHs in solution is the development of optosensors and screening techniques which makes expensive, time consuming and tedious chromatographic procedures redundant [12,12,14].

In this paper, a phosphorescent characterization of polycyclic aromatic hydrocarbons on solid-surface is presented as the first step for the development of selective optosensors for mono or multi detection of PAHs of environmental interest (see Table 1), and the reoptimization of experimental and instrumental conditions to the selective determination of BaP in water samples.

## **2. Experimental**

### *2.1. Reagents.*

Analytical reagent-grade chemicals were used for the preparation of all the solutions. Thallium (I) nitrate, potassium iodide and anhydrous sodium sulphite were purchased from Sigma Chemical Co. and were used as received. 5 M solutions of potassium iodide was and thallium nitrate solution at 0.25 M concentration were prepared. The 0.5 M sodium sulphite solutions were prepared daily and kept in tightly stoppered containers.

EPA-PAHs (naphthalene, acenaphthene, acenaphthylene, fluorene, phenanthrene, anthracene, fluoranthene, pyrene, chrysene, benzo(a)anthracene, benzo(k)fluoranthene, benzo(b)fluoranthene, benzo(a)pyrene, indeno(1,2,3-cd)pyrene, benzo(g,h,i)perylene and dibenzo(a,h)anthracene) were purchased from Sigma (Spain) and used as received.

50  $\mu\text{g mL}^{-1}$  solutions of each PAH were prepared in five different organic solvents (1,4-dioxane, methanol, ethanol, acetonitrile and acetone) miscibles with water.

The non-ionic resins (Amberlite XAD 2, Amberlite XAD 4, Amberlite XAD 7, Silica Gel Davisil and Silica Gel Merck) (Sigma) were sieved at there different grain sizes and then used the sized 80-120  $\mu\text{m}$ .

### *2.2. Instrumentation and flow set-up*

A Varian Cary-Eclipse spectrophosphorimeter (Varian Iberica, Madrid, Spain) was used to obtain the phosphorescence spectra and the relative phosphorescence intensity measurements. The spectrofluorimeter is equipped with a xenon discharge lamp (peak power equivalent to 75 kW), Czerny-Turner monochromators, R-928 photomultiplier tube which is red sensitive with manual or automatic voltage controlled using the Cary Eclipse software for Windows 95/98/NT system. The photomultiplier detector voltage was between 600 and 1000 V and the instrument excitation and emission slits were set at 20 and 20 nm, respectively. The delay time used was typically 0.1 ms and the gate time was 5.0 ms.

A Hellma Model 176.052-QS flow-through cell of 25  $\mu\text{l}$  volume was packed with the corresponding resin and placed in the conventional sample compartment of the detector. Two rotary valves (Supelco 5020) were used for sample introduction and for elution of the retained analytes. PTFE tubing (1.1 mm i.d.) and fittings were used for connecting the flow-through cell, the rotary valves and the carrier solution reservoirs. A Gilson Miniplus-3 peristaltic pump was used to generate the flow stream.

### *2.3. General procedure.*

A single-line-flow-injection system was packed with the corresponding resin and placed in the conventional sample compartment of the detector. When the flow-through cell was packed with the corresponding resin, the phosphorescence background was measured at the excitation and emission wavelengths of each PAH (see Table 1). The samples were prepared by diluting the PAH stock solutions in organic solvent medium to obtain a final concentration of  $500 \text{ ng mL}^{-1}$ , then 6 mL of 5 M potassium iodide or 6 mL 0.25 M thallium (I) nitrate and 1 mL of 0.1 M sodium sulphite were added to the analyte solutions and finally were diluted to 10 mL with water. 4 mL of sample were passed through the cell, and the phosphorescence signal was recorded at the excitation and emission wavelengths chosen for each PAH. The instrument was set up as follows: detector voltage, gate time (tg) and delay time (td) were kept constant at 850 or 1000 V, 5 ms and 0.1 ms respectively. Regenerative solution (acetonitrile, 250  $\mu\text{L}$ ) was injected through the regenerative valve to strip the retained analytes from the solid phase before



proceeding with the next injection. The measurements were always repeated at least three times to evaluate their error.

#### *2.4. Water sample procedure*

To demonstrate the predictive ability of optosensors, samples of drinking waters from city of Granada and various mineral waters were analyzed. The waters underwent no previous treatment.

### **3. Results and discussion**

#### *3.1. Solid-surface phosphorescence characterization of PAHs*

The phosphorescence excitation and emission spectra of PAHs adsorbed on the non-ionic resins were recorded. Fig.1 shows the projected two-dimensional spectra of FLT, BkF, BbF and BaP. All were obtained using excitation and emission slits of 20 nm respectively, a decay time of 0.1 ms, gate times between of 5.0 ms and a detector voltage of 850 V.; Fig. 2b shows the influence of the delay time on the RTP of of PYR, BaA, IcdP and BaP immobilized onto Amberlite XAD 7

The values of  $\lambda_{exc/em}$  wavelengths and lifetimes of 15 PAHs studied are presented in Table 1. As can be seen in this table, the maximum excitation and emission wavelength measurements on solid surface are very similar to those already described in the literature [2,7,15].

The main experimental variables which can affect solid-surface phosphorescence emission were carefully studied.

pH affects the capacity of the resins to interact with PAHs [16], however the pH does not affect the PAHs because they do not have dissociable groups in this structure, consequently the pH only affects the interaction of the PAH-resins.

To develop a solid-surface room temperature phosphorescence a solid support is necessary to carry out the interaction with the analyte and to concentrate the emission phosphorescence intensity in a small area for measurement. Many resins could be used as a solid surface, however, as the PAH do not have ionisable groups, non-ionic

exchangers (Amberlite XAD 2, Amberlite XAD 4, Silica Gel Davisil and Silica Gel Merck) were selected to carry out the phosphorescent characterization of the PAHs. These solid surfaces have a high capacity to pre-concentrate the PAHs but only Amberlite XAD 7 and Silica Gel Davisil have the capacity to permit the phosphorescence emission of PAH in their surface (see Fig. 1).

The most important factors affecting the RTP emission from the PAHs is the nature and concentration of the heavy atom perturbers used. Different cations and anions of heavy atom perturber salt were studied including  $I^-$  and  $Tl^+$ . It was observed that most of the studied PAH analytes show an intense phosphorescence emission when potassium iodide is present in the solution as the heavy atom salt. In all cases, no phosphorescence emission was observed when  $TlNO_3$  was used as heavy atom perturber. As  $Na_2SO_3$  was used as oxygen scavenger and the presence of an excessive amount of  $TlNO_3$  resulted in the formation of a salt between  $Tl^+$  and  $SO_3^{2-}$ , so that the effective concentration of  $Tl^+$  in the solution (and thus the enhancing effect on the RTP emission) decreased considerably [17].

PAHs are highly apolar compounds with a very low solubility in water media. In order to facilitate their solubilization, 30 % of organic solvents (1,4-dioxane, methanol, ethanol, acetonitrile and acetone) were added at aqueous medium when potassium iodide was used. The decrease of the medium dielectric facilitates the solubilization of apolar compounds and consequently permits the phosphorescence characterization of PAHs.

The organic solvent also impedes the retention of the analyte in the flow system, guaranteeing that all injected PAHs reach the solid surface. Moreover, in the development of optosensors, the carrier and the samples could be as identical as possible. Different possibilities were studied, (1) using organic solvent only in the sample, (2) in the sample and carrier or (3) only in the carrier. The best results were obtained using the organic solvents are presented only in the sample.

Under these optimum conditions, the differences between the phosphorescence signal of PAHs and the background of the resins Amberlite XAD 7 and Silica Gel Davisil optosensor responses were measured at the maxima excitation and emission wavelength of each PAH and using the five organic solvents (see Fig. 2).

### 3.2. Selective determination of BaP

To demonstrate the potential of this research as very selective optosensor to BaP was developed using the selective properties of the phosphorescence emission of this PAH (see Table 1 and Figure 2).

#### 3.2.1. Effect of instrumental parameters

An exhaustive optimisation of the instrumental conditions that affect the phosphorescence emission of BaP, was carried out. The selection of optimum values was carried out at  $\lambda_{exc/em}$  390/690 nm following an univariant method and observing the changing of the phosphorescence intensity/noise ratio and trying to minimize the standard deviations of standard and blank.

The applied photomultiplier voltage increase the instrumental sensitivity and the background. An increase on the detector voltage from 600 to 1000 V produces a linear increment of response optosensor but the precision of measurement is worse. An optimum value of 1000 V which resulted in the best signal to noise ratio BaP was selected.

Changes in the excitation and emission slits affect drastically to the optosensor response and do not affect significantly to the blank signal. The best response for BaP was obtained for 20/20 nm excitation/emission slits (maximum values achievable with the spectrophosphorimeter).

Using a pulsed excitation source it is necessary to optimize a delay time ( $t_d$ , time elapsed between the flash of the excitation source and the start of data acquisition) and a gate time ( $t_g$ ), that is the acquisition time after the delay time. Both instrumental parameters have a great influence on the optosensor response and the selectivity of optosensor and their optimum values depend on the analyte lifetime. Typically, an increase on the delay time resulted in a slight decay on the optosensor response, while noise deviation remains constant. A delay time of 1.1 ms after flash was selected for BaP to ensure that the pulse of the Xe flash lamp has ceased.

Regarding to the gate time, the response optosensor from the analytes increased slightly with  $t_g$  increase while the noise value also increased. On the other hand, a strong

diminution of the standard deviation occurs owing signal and noise. An optimum value of 5.0 ms was selected.

### *3.2.2. Effect of chemical conditions*

The effect of KI has been carefully studied. No phosphorescence response was obtained in the total absence of KI, while, in general, the RTP intensity increased with increasing heavy atom concentration. The best difference between noise and phosphorescence signal was obtained by using a concentration of 4 M of KI (see Figure 3a).

Sulphite ion was used as an efficient oxygen scavenger to minimize RTP quenching. Different amounts of sodium sulphite were added to a solution with a fixed amount of analytes and heavy atom salt while the concentration of sodium sulphite was varied from 0 to 25 mM. No phosphorescence response was obtained in the total absence of oxygen scavenger. An increasing in the concentration level of Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> produces an increase in the optosensor response and a decrease in the response time. A 20 mM sodium sulphite concentration was selected as optimum (see Figure 3b).

The effect of five organic solvents miscible with water (acetone, ethanol, methanol, acetonitrile and dioxane) has been studied. Following the general procedure described in the Experimental Section, different volumes of the PAHs stock solutions were mixed with different percentages of organic solvents. After adding the heavy atom and the oxygen scavenger, the solutions were made up to volume with water and the phosphorescence emissions were then recorded. The best results (higher optosensor response signals) were obtained with the use 30% v/v of acetonitrile (see Fig. 4).

### *3.2.3. Flow-rate and injection volume optimisation*

The capability of solid support to retain analytes changes with carrier flow-rate from to 0.5 to 2 mL min<sup>-1</sup>. An increase of flow-rate decreased significantly the optosensor response but also decreased the response time of the optosensor. So, optimum value of 0.75 mL min<sup>-1</sup> was chosen for the rest of experimental work.

The optosensor response was specially affected by the injection volumen, maximum phosphorescence intensity occurring at 4 mL of sample, smaller volumes produce a decreasing of the phosphorescence emission and larger volumes did of 4 mL

not possible to test because produce high pressures in the flow system. Thus, 4 mL were chosen as sample optimum value.

#### *3.2.4. Optosensor performance*

Table 2 shows a resume of the optimal instrumentation, experimental and flow variables used on the determination of BaP.

Standard linear calibration graphs were drawn according to IUPAC recommended procedures at  $\lambda_{exc/em} = 390/690$  nm. The regression equations was  $I = 0.1536 C - 3.2862$ , where  $C$  is the concentration of BaP in  $ng mL^{-1}$  and  $I$  is the optosensor response. The correlation coefficients ( $r$ ) was 0.9966. All the features of the proposed optosensor are summarised in Table 3.

#### *3.2.5. Interference studied*

We made a systematic study into the effects of other PAHs upon the determination of BaP  $100 ng mL^{-1}$  and the results are set out in Table 4.

Bicarbonate was tested at a concentration of  $1500 mg L^{-1}$  and other potentially interfering ions at  $150 mg L^{-1}$  (five times higher than their usual value in water)[19]. The presence of the usual ions to be found in drinking water caused no interference at the concentrations tested assayed.

#### *3.2.6 Applications of the optosensor to real sample analysis*

To test the ability of the optosensor drinking water from the city of Granada and mineral water samples (with analytes content bellow the concentration levels detectable by proposed system) were spiked with BaP at different levels and treated under water sample procedure. The experimental results are shown in Table 5. It shows that the recovery percentages are closed to 100% (the results vary between 88.0 and 97.5%) with very low relative standard deviation (for seven replicates) no higher than 4.2 % in all cases.

## **4. Conclusions**




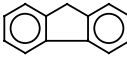

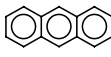
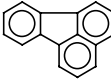

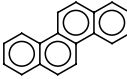
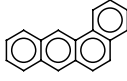
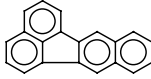
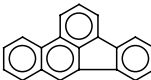
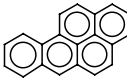
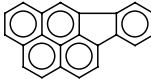

The continuous flow-through solid surface phosphorescence system developed has permitted the phosphorescent characterization of PAHs. The system is based on the

measurement of their native phosphorescence signal when they are supported on-line on non-ionic resin Amberlite XAD 7 and Silice Gel Davisil. Also, a very selective optosensor of BaP has carried out using the selection interest properties of phosphorescence signals.

### **Acknowledgements**

The authors gratefully acknowledge the financial support of the Ministerio de Ciencia y Tecnología (project MAT2003-09074) and Instituto del Agua and support from Plan Propio UGR, Spain.

**Table 1.**  
Spectral characteristics of the fifteen characterized compounds

Name and Abbreviations	Structure	Excitation/emission wavelengths(nm)	Lifetime ( $\mu$ s)
Naphthalene (NAPH)		285/515	-
Acenaphthylene (ACEN)		290/530	-
Acenaphthene (ACE)		290/525	-
Fluorene (FLU)		290/455	-
Phenanthrene (PHE)		285/505	-
Anthracene (ANT)		355/680	-
Fluoranthene (FLT)		280/555	-
Pyrene (PYR)		330/593	2666
Chrysene (CHRY)		275/515	-
Benzo(a)anthracene (BaA)		280/605	1430
Benzo(k)fluoranthene (BkF)		300/570	-
Benzo(b)fluoranthene (BbF)		295/555	-
Benzo(a)pyrene (BaP)		390/690	3300
Indeno(1,2,3-cd)pyrene (IcdP)		295/665	1079
Benzo(g,h,i)perylene (BghiP)		295/620	1531

**Table 2**

Optimum instrumental, experimental and flow parameters

	Optimum value
$\lambda_{\text{exc/em}}$ (nm)	390/690
Detector voltage (V)	1000
Slits (excitation/emission) (nm)	20/20
$t_{\text{d/g}}$ (ms)	1.1/5.0
[KI] (M)	4
[Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> ] (mM)	20
Flow-rate (mL min. <sup>-1</sup> )	0.75
Volumen injection (mL)	4



**Table 3**  
Analytical Parameters of the Proposed Optosensor

	Estimated
Linear range (ng mL <sup>-1</sup> )	11.7-200
Limit of detection (ng mL <sup>-1</sup> )	11.7
Limit of quantification (ng mL <sup>-1</sup> )	39.1
	50 ng mL <sup>-1</sup> 4.6
	100 ng mL <sup>-1</sup> 3.3
RSD (%)	150 ng mL <sup>-1</sup> 4.1
	200 ng mL <sup>-1</sup> 3.9

**Table 4**Effects of foreign ions and PAH's on the determination of 100 ng mL<sup>-1</sup> BaP

		Usual value in water (mg L <sup>-1</sup> ) [18]	Tolerance level (ng mL <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>	Ratio
Anions	Cl <sup>-</sup>	8.0	>150 × 10 <sup>-3</sup>	1:10 <sup>9</sup>
	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	24.0	>150 × 10 <sup>-3</sup>	1:10 <sup>9</sup>
	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	2.4	>150 × 10 <sup>-3</sup>	1:10 <sup>9</sup>
	HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	185.0	>1500 × 10 <sup>-3</sup>	1:10 <sup>10</sup>
Cations	Na <sup>+</sup>	< 2	>150 × 10 <sup>-3</sup>	1:10 <sup>9</sup>
	K <sup>+</sup>	< 2	>150 × 10 <sup>-3</sup>	1:10 <sup>9</sup>
	Ca <sup>2+</sup>	40	>150 × 10 <sup>-3</sup>	1:10 <sup>9</sup>
	Mg <sup>2+</sup>	16	>150 × 10 <sup>-3</sup>	1:10 <sup>9</sup>
PAHs	NAPH	-	>15 × 10 <sup>-3</sup>	1:150
	ACEN	-	>10 × 10 <sup>-3</sup>	1:100
	ACE	-	>15 × 10 <sup>-3</sup>	1:150
	FLU	-	>15 × 10 <sup>-3</sup>	1:150
	PHE	-	>15 × 10 <sup>-3</sup>	1:150
	ANT	-	>10 × 10 <sup>-3</sup>	1:100
	FLT	-	>2 × 10 <sup>-3</sup>	1:20
	PYR	-	>15 × 10 <sup>-3</sup>	1:150
	CHRY	-	>10 × 10 <sup>-3</sup>	1:100
	BaA	-	>10 × 10 <sup>-3</sup>	1:100
	BkF	-	>2 × 10 <sup>-3</sup>	1:20
	BbF	-	>10 × 10 <sup>-3</sup>	1:100
	IcdP	-	>10 × 10 <sup>-3</sup>	1:100
	BghiP	-	>2 × 10 <sup>-3</sup>	1:20

<sup>a</sup> An error of 5% was used to establish the tolerance levels.

**Table 5**  
Recovery study of spiked BaP in water samples

	Added value (ng mL <sup>-1</sup> )	Found value (ng mL <sup>-1</sup> )	Recovery percentage (%) (RSD %)
Tap 1	400	390	97.5 (2.5)
Tap 2	400	287	95.6 (4.2)
Tap 3	100	88	88.0 (3.5)
Mineral 1	400	387	96.7 (2.8)
Mineral 2	200	195	97.5 (1.9)
Mineral 3	100	92	92.0 (3.7)

## Figure captions.

Fig. 1. (a) RTP spectra excitation (thin line) and emission (thick line) of FLT, BkF, BbF and BaP immobilized onto Amberlite XAD 7. [PAH] = 600 ng mL<sup>-1</sup>, 30% ACN, 3 M potassium iodide and 0.01 M sodium sulphite. Slit<sub>exc/em</sub> 20/20 nm and detector voltage 850 V.






Fig. 2. Characterization of PAHs by solid-surface phosphorescence immobilized in (a) Amberlite XAD 7 and (b) Silica Gel Davisil.  acetonitrile,  1,4-dioxane,  acetone,  ethanol and  methanol. [PAH] = 600 ng ml<sup>-1</sup>, 30% of organic solvent, 3 M potassium iodide and 0.01 M sodium sulphite. Slit<sub>exc/em</sub> 20/20 nm, t<sub>d/g</sub> 0.1/5.0 ms and detector voltage 850 V.







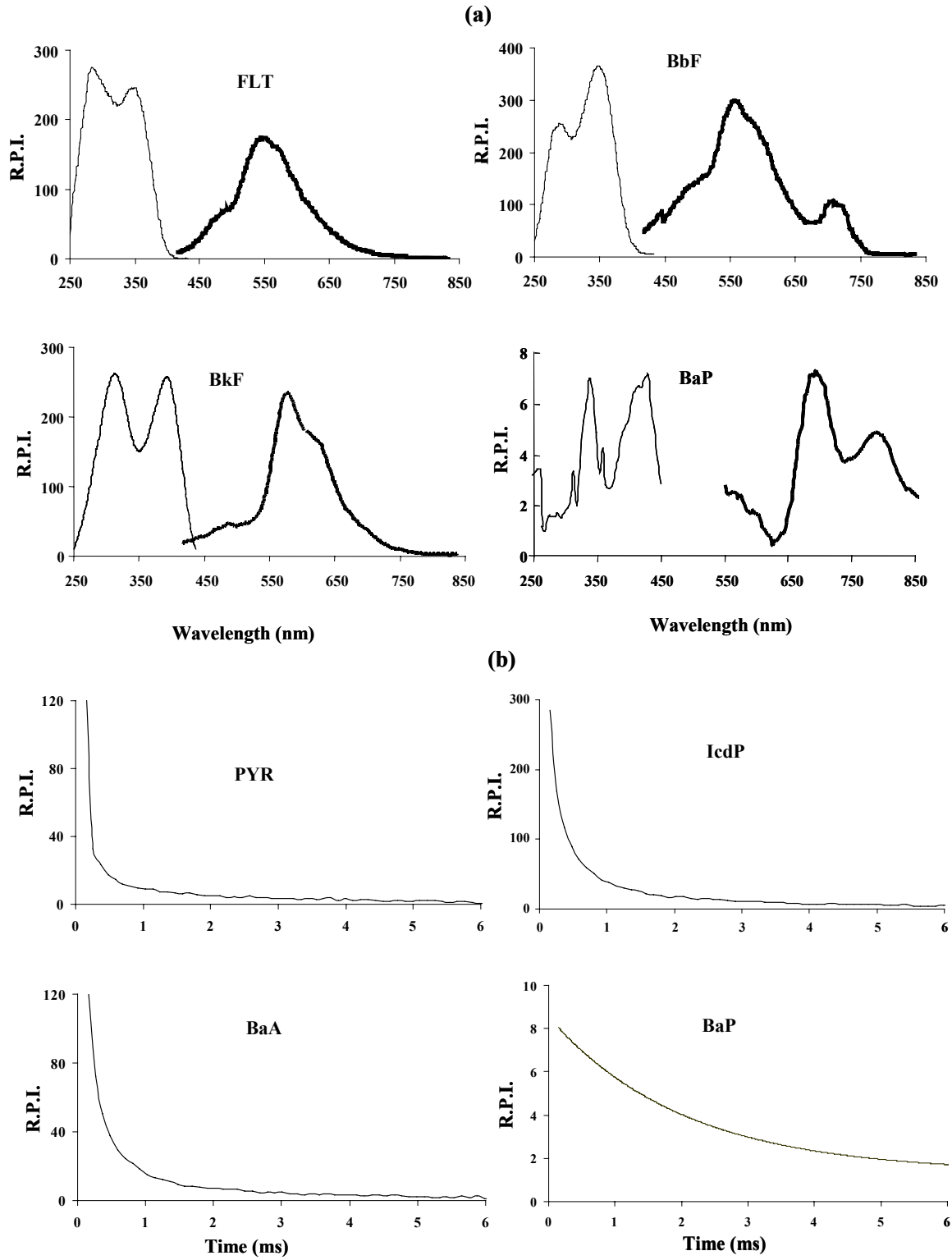
Fig. 3. Optimisation of chemical variables of BaP immobilized onto Amberlite XAD 7. (a) Optimisation of KI concentration. (b) Optimisation of oxygen scavenger concentration and () response time. [BaP] = 100 ng mL<sup>-1</sup>. Instrumental and experimental conditions on Table 2.

Fig. 4. Effect of organic solvents on optosensor response of BaP immobilized onto Amberlite XAD 7. () Acetonitrile, () methanol, () ethanol, () acetone and () dioxane. [BaP] = 100 ng mL<sup>-1</sup>. Instrumental and experimental conditions on Figure 3.

**Figure 1**



**Figure 2**

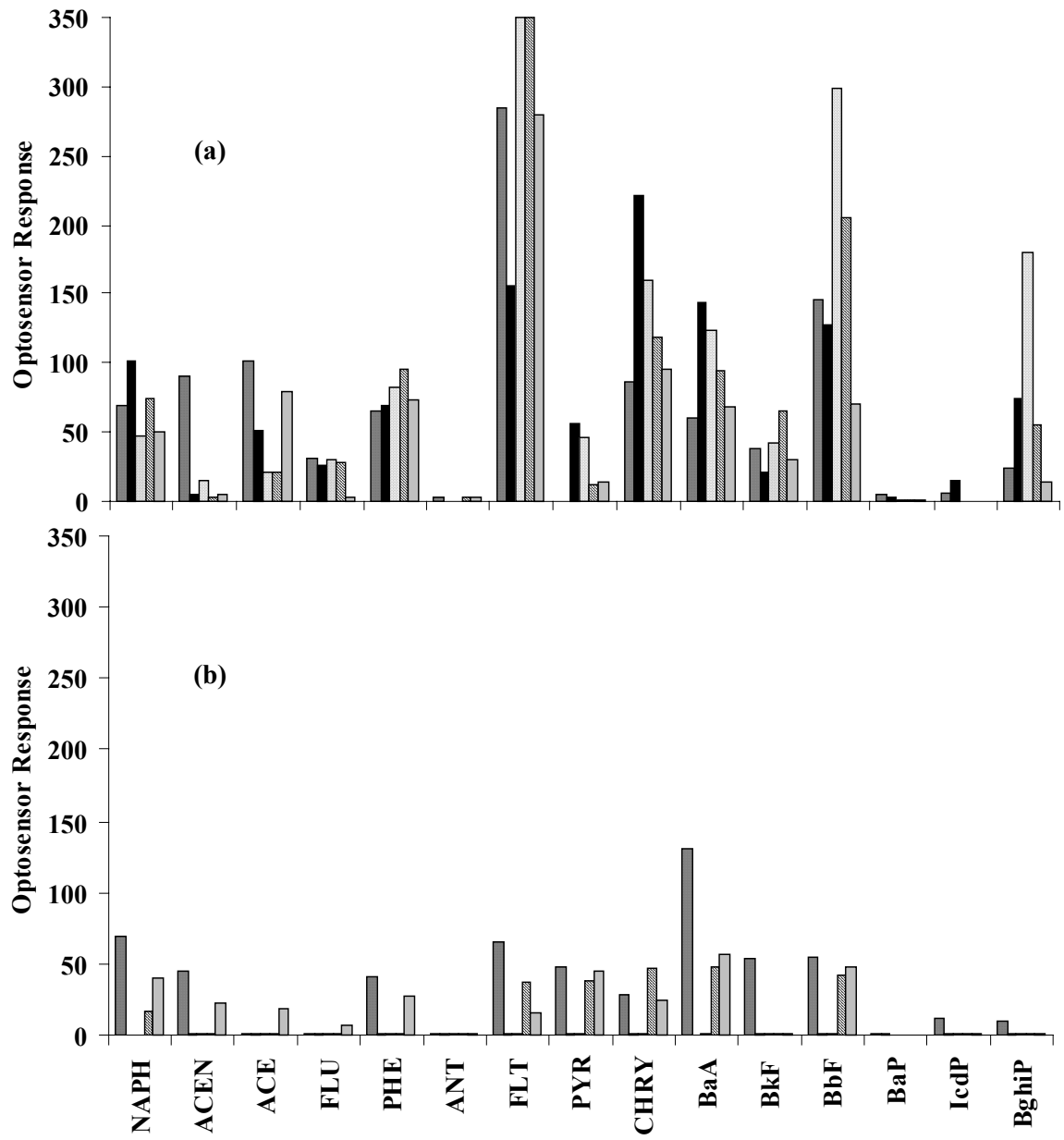


Figure 3

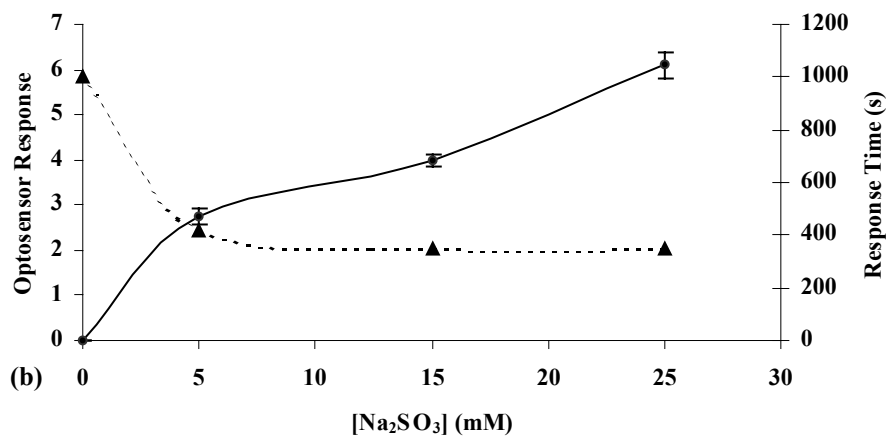
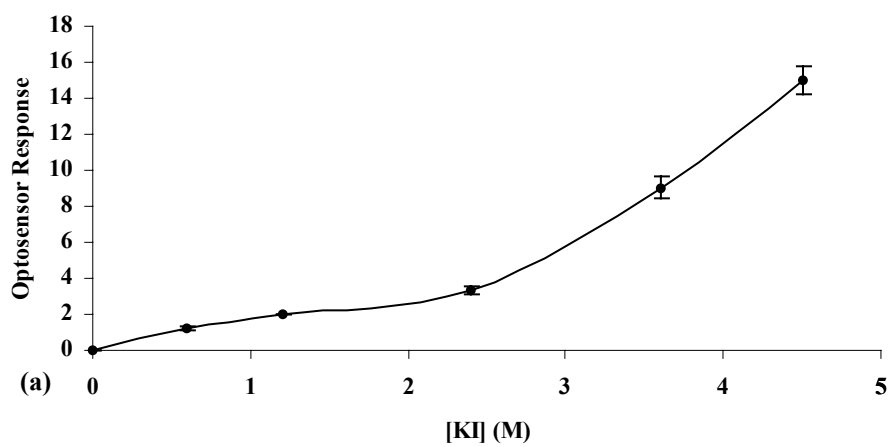
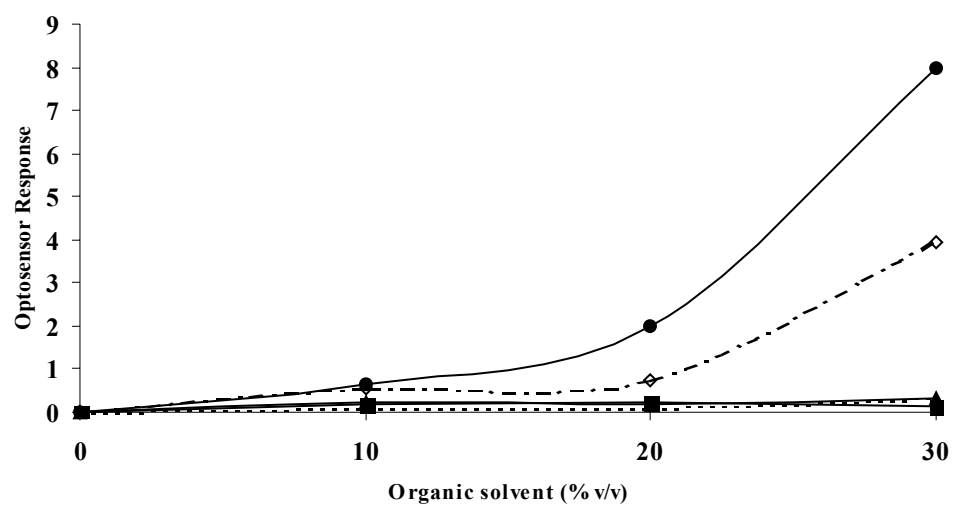


Figure 4





## References

- [2] H.P. Nirmaier, E. Fisher, A. Meyer, G. Henze, *J. Chromatogr. A*, 730 (1996) 169.
- [3] G. Michor, J. Carron, S. Bruce, D.A. Cancilla, *J. Chromatogr. A*, 732 (1996) 85.
- [4] T.A. Mastran, A.M. Dietrich, D.L. Gallagher, T.J. Grizzard, *Water Res.*, 28 (1994) 2353.
- [5] G.A. Junk, J.J. Richard, *Anal. Chem.*, 60 (1988) 451.
- [6] D.W. Potter, J. Pawliszyn, *Environ. Sci. Technol.*, 28 (1994) 298.
- [6] A. Salinas Castillo, A. Segura Carretero, J.M. Costa Fernández, Wei Jun Jin, A. Fernández Gutiérrez, *Anal. Chim. Acta*. 516 (2004) 213.
- [7] J. Kuijt, F. Ariese, U. A. Th. Brinkman, C. Gooijer, *Anal. Chim. Acta*. 488 (2003) 135.
- [9] M. Valcárcel, M.D. Luque de Castro, *Flow-through (Bio)Chemical Sensors*, Elsevier, Netherlands, 1994.
- [10] J. Ruzicka, E.H. Hansen *Anal. Chim. Acta*. 173 (1985) 3.
- [10] A. Fernández Gutiérrez, G. Schulman, *Fosforescencia Molecular Analítica: Una Aproximación Práctica*, Editorial Universidad de Granada, Granada, 2003.
- [11] J.F. Fernández Sánchez, A. Segura Carretero, C. Cruces Blanco, A. Fernández Gutiérrez, *Talanta* 60 (2003) 287.
- [13] R.J. Hurtubise, *Anal. Chim. Acta* 351 (1997) 1.
- [14] T. Vo-Dinh, J. Fetzer, A.D. Campiglia, *Talanta* 47 (1998) 943.
- [15] J.L. Whitcomb, A.D. Campiglia, *Talanta* 55 (2001) 509.
- [15] E.D. Hagestuen, A.D. Campiglia, *Talanta* 52 (2000) 727.
- [17] J.F. Fernández Sánchez, A. Segura Carretero, C. Cruces Blanco, A. Fernández Gutiérrez, *Anal. Chim. Acta* 462 (2002) 217.
- [17] N.E. Nugara, A.D. King, *Anal. Chem.* 61 (1989) 1431.
- [18] J. Catalán Lafuente, *Química del agua*, Librería Editorial Bellisco, Madrid, 1981.



## **ANEXO VIII**



# Iodinated molecularly imprinted polymer for room temperature phosphorescence optosensing of fluoranthene

A. Salinas-Castillo,<sup>a</sup> I. Sánchez-Barragán,<sup>b</sup> J. M. Costa-Fernández,<sup>b</sup> R. Pereiro,<sup>b</sup> A. Segura-Carretero,<sup>a</sup> A. Fernández-Gutiérrez,<sup>\*a</sup> and A. Sanz-Medel,<sup>\*b</sup>

Receipt/Acceptance Data [DO NOT ALTER/DELETE THIS TEXT]

Publication data [DO NOT ALTER/DELETE THIS TEXT]

DOI: 10.1039/b000000x [DO NOT ALTER/DELETE THIS TEXT]

**A novel molecularly imprinted polymer (MIP), of high interest for room temperature phosphorescence sensing systems, is described. The synthesized MIP contains iodine as internal heavy atom in the polymeric structure. The applicability of the iodinated MIP has been successfully tested using fluoranthene as model analyte.**

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are a class of well-known hazardous chemicals with carcinogenic and mutagenic character, originated from incomplete combustion of organic matter. In this line, the European Parliament and the Council of the European Union have included fluoranthene (as an indicator of other more dangerous PAHs) in a list of 33 priority substances in the field of water policy.<sup>1</sup>

Although identification and quantification of PAHs is usually performed by means of liquid and gas chromatography, these techniques are lengthy. On the other hand, PAHs native luminescent properties have been exploited in the design of sensors for in-situ analysis and several optosensors for PAHs' control have been described, so far, with different degree of success, based on on-line pre-concentration of the analytes onto different solid supports.<sup>2-8</sup> In recent years, molecular imprinting techniques have turned to be an attractive tool to enhance the sensitivity and selectivity of luminescence optosensors through the development of robust tailor-made molecularly imprinted polymers (MIPs).

Recently, some successful approaches for the development of MIPs-based fluorescent sensing systems have been described.<sup>9-15</sup>

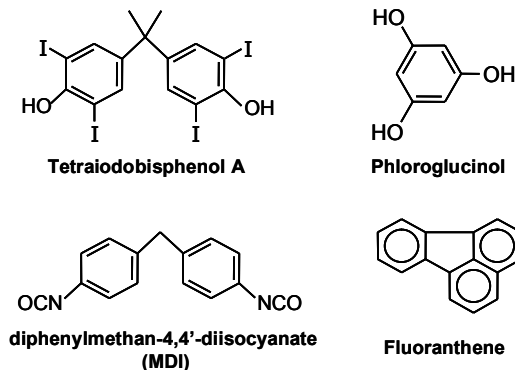
However, no organic MIPs-based room temperature phosphorescence (RTP) sensing systems have been reported to date, even though phosphorescent detection provides a series of important advantages, including wide separation between the excitation and emission peaks as well as a generally higher sensitivity of the analytical methodologies. Besides, since phosphorescence is a less usual phenomenon than fluorescence the selectivity of the detection is highly increased. In addition, the interference from any short-lived fluorescence and scattered light can be easily avoided using an appropriate delay time.

One pending topic related to the synthesis of MIPs is the undesirable formation of unspecific cavities, leading to cross-selectivity.<sup>16</sup> Aiming to increasing specificity, here we investigated the possibility of joining the important advantages of MIPs with those provided by phosphorescent detection. As it is known, to perform RTP measurements, an adequate heavy atom (e.g. Br, I, Tl) must be present in order to populate the excited triplet state of the phosphor by increasing the rate of intersystem crossing.<sup>17</sup> In some cases, the heavy atom is added to the samples using a high concentration of salt in aqueous solution, but such methodology lacks of general use and has some inconvenients,

including the cost of the heavy atom salts.<sup>18,19</sup> In this work, we have investigated the use of an iodinated monomer in the polymerization, so, ensuring that the heavy atom is already present in the polymeric structure. The potential applicability of this novel iodinated polymer for RTP fluoranthene optosensing has been evaluated and compared to that of the corresponding traditional non-iodinated polymer.

The iodination of bisphenol A to obtain the monomer tetraiodobisphenol A (4,4'-isopropylidenedi(2,6-diiodophenol)) was carried out in our laboratories, since this iodinated derivative is not commercially available. The iodination agent IPy<sub>2</sub>BF<sub>4</sub> (bis(pyridine)iodinium(I) tetrafluoroborate) was synthesized following a procedure previously described.<sup>19</sup>

A iodinated polyurethane was prepared through bulk polymerization at room temperature starting from fluoranthene as the template molecule, tetraiodobisphenol A and diphenylmethan-4,4'-diisocyanate (MDI) as functional monomers, phloroglucinol as an additional cross-linker and tetrahydrofurane as solvent† (see Figure 1). The analogous non-iodinated polyurethane was prepared exactly as the iodinated polymer, excepting that tetraiodobisphenol A was replaced by the appropriate equimolar amount of bisphenol A.



**Figure 1.** Chemical structures of the selected monomers for the synthesis of the iodinated molecularly imprinted polymer and the template molecule.

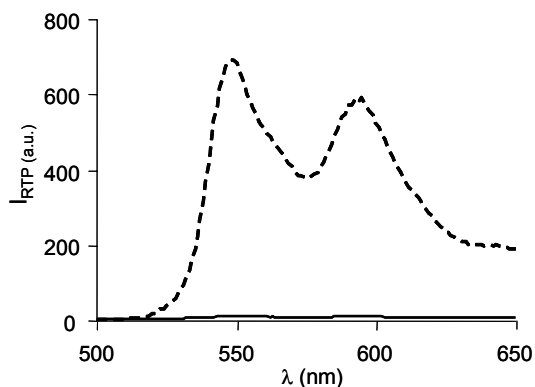
The performance of the non-iodinated MIP was initially tested. First, the template molecule (fluoranthene) was removed from the polymer by passing a continuous flow of acetonitrile until the template in the extraction solvent could not be detected by fluorescence. Then, the washed polymer was packed in a conventional luminescence flow-through quartz cell and this flow-cell was placed inside the sample holder of a Varian Cary Eclipse luminescence spectrometer. Since molecular oxygen is a very efficient quencher of phosphorescence, this was removed from the samples by its reaction with sodium sulfite.<sup>20</sup> Thus, fluoranthene water solutions containing 2% of acetonitrile, high concentration KI as an external heavy atom and Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> as

† Electronic Supplementary Information (ESI) available: [details of any supplementary information available should be included here]. See <http://www.rsc.org/suppdata/xx/b0/b000000x/>

\* xxx@aaa.bbb.ccc

oxygen scavenger were pumped through the polymer using a peristaltic pump. Although fluorescence emission from fluoranthene retained in the MIP could be observed, no phosphorescence emission was detected when working with the non-iodinated polymer.

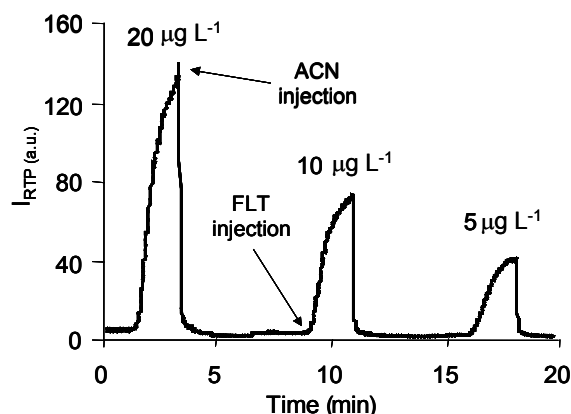
Then, the iodinated polymer was thoroughly tested. The polymer was packed in the flow cell and its RTP emission spectrum in water was recorded. Two very intense fluoranthene phosphorescence emission peaks (at 550 and 593 nm) were observed, even in the absence of a deoxygenating agent (see Figure 2). This fact suggests that fluoranthene imprinting molecules rest within an environment so rigid that even their phosphorescence emission is protected from dissolved oxygen quenching effect.



**Figure 2.** RTP emission spectrum ( $\lambda_{\text{ex}}=365$  nm) of fluoranthene (template molecule) in the iodinated imprinted polymer (dashed line). RTP spectrum of the polymer after template removal via a microwave treatment (solid line).

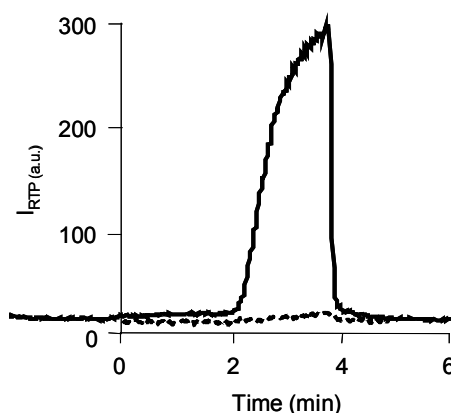
The tight confinement of the template molecules within the polymer structure was responsible for the need of an aggressive treatment to accomplish the polymer washing step. The imprinting molecule was removed by means of microwave-assisted extraction<sup>‡</sup>. Afterwards, the MIP phosphorescence emission at 550 nm was checked once again. As can be seen in Figure 2, as result of the microwave treatment the fluoranthene imprinting molecule was almost completely removed from the polymer, since the observed phosphorescence emission due to residual fluoranthene molecules can be considered as negligible.

To verify whether the so prepared iodinated polymer retained recognition properties after the microwave treatment and to evaluate the potential of the iodinated MIP as a sensing material, fluoranthene solutions of different concentrations were prepared and pumped through the MIP. As expected, after the microwave-assisted template extraction, subsequent fluoranthene rebindings seemed to be weaker, since deoxygenation of the samples with sodium sulfite was necessary in order to achieve a detectable fluoranthene RTP emission. Figure 3 shows the response profile of the MIP for three fluoranthene water samples injection, containing different analyte concentrations (2 mL sample). The removal of the so retained fluoranthene after injections is straightforward and can be accomplished by a 2 mL acetonitrile flow, proving that the MIP can be easily regenerated.



**Figure 3.** RTP response profile ( $\lambda_{\text{ex}}=365$  nm,  $\lambda_{\text{em}}=550$  nm) of the iodinated MIP for three successive fluoranthene aqueous samples injection. For polymer regeneration, acetonitrile (ACN) is injected after each sample injection.

In order to verify that the observed RTP emissions derive from fluoranthene retained in the MIP selective cavities and not from a simple adsorption on the material, the RTP emission from a  $50 \mu\text{g L}^{-1}$  fluoranthene water solution injected through the MIP was compared to that obtained after injecting the same fluoranthene solution through a non imprinted polymer (NIP) packed in the flow-cell. As can be seen in Figure 4, the RTP signal obtained from the NIP was negligible, proving that the observed RTP sensing effects are definitely a result from host-guest interactions between the iodinated MIP matrix and the target molecule.



**Figure 4.** RTP response profiles of the iodinated MIP (solid line) and the control NIP (dashed line) for a  $50 \mu\text{g L}^{-1}$  fluoranthene solution injection.

In summary, molecularly imprinting using a novel iodinated monomer, tetraiodobisphenol A, is proposed here for chemical recognition of luminescent target analytes by means of RTP detection. The occurrence of a “heavy atom effect” when the imprinted polymer contains iodine in its structure has showed to be responsible to induce high intense RTP emission. Finally, this novel iodinated MIP has showed a great potential for the development of very simple and easy to use RTP optosensors and opens new paths for the development of high performance MIP-RTP optosensors for different applications, using as template other target analytes.

This work was supported by the projects MCT-03-BQU-04671 and MAT2003-09074 (Feder Programme and Ministerio de Ciencia y Tecnología, Spain)..

**A.. Salinas-Castillo,<sup>a</sup> I. Sánchez-Barragán,<sup>b</sup> J. M. Costa-Fernández,<sup>b</sup> R. Pereiro,<sup>b</sup> A. Segura-Carretero,<sup>a</sup> A. Fernández-Gutiérrez,<sup>a</sup> and A. Sanz-Medel,<sup>a,b</sup>. ORGANICOS**

<sup>a</sup> Department of Analytical Chemistry. University of Granada.

Fuente Nueva s/n, 18071 Granada, Spain; E-mail: albertof@ugr.es

<sup>b</sup> Department of Physical and Analytical Chemistry. University of Oviedo.

Julián Clavería, 8, 33006 Oviedo, Spain. Fax: 34 985 10 31 25; Tel: 34 985 10 34 74; E-mail: asm@uniovi.es

## Notes and references

§ Bisphenol A (5 g, 21.90 mmol) was suspended in dichloromethane (200 mL), iodination reagent IPy<sub>2</sub>BF<sub>4</sub> (33.48 g, 90 mmol) was added and the mixture was stirred at room temperature overnight. Distilled water and HCl (1%) were added up to acid pH. The organic phase was separated and washed with water (3 x 100 mL), thiosulfate (5%, 100 mL) and again water (2 x 100 mL) and then was dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Finally, the organic solvent was removed by rotary evaporation and the crude solid was washed with ether (2 x 10 mL) to give a pure product in 85% yield. Spectral data (<sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C) were in full agreement with the assigned structure.

◇ Special caution was taken in the handling of fluoranthene and in the preparation of the MIPs. Nitrile gloves, protective clothing and safety glasses were worn all the time. A respirator equipped with two organic vapour/particulate filters was used. Hazardous wastes were collected, stored in glass containers, labelled and sent to waste management company.

† Fluoranthene (20 mg), phloroglucinol (70 mg) and tetraiodobisphenol A (612 mg) were placed into a glass vial and 5 mL of an MDI solution (70 mM) in THF were added. The mixture was stirred and stored uncapped in the absence of light for 4 days until complete evaporation of the organic solvent. The solid obtained was ground in an agate mortar, washed with acetonitrile (3 x 5 mL) and dried at 30-35°C. The ground polymer was sieved and particle sizes of diameters between 80 and 160 µm were selected. The blank non-imprinted polymer (NIP) was prepared and treated exactly the same way, except that no print molecule was used in the polymerization stage.

‡ 100 mg of the polymer were placed into a PTFE vessel and 4 mL of a MeOH/Hex (1:1) mixture were added. The vessel was tightly capped, placed in the microwave oven and treated at 30 W for 5 minutes. Then the polymer was finally cleaned with ethanol and left to dry at room temperature.

Chem., 1999, 71, 4559.

13. F.L. Dickert, P. Achatz and K. Halikias, *Fresenius J. Anal. Chem.*, 2001, 371, 11.

14. N. Kirsch, J.P. Hart, D.J. Bird, R.W. Luxton and D.V. McCalley, *Analyst*, 2001, 126, 1936.

15. J.P. Lai, R. Niessner and D. Knopp, *Anal. Chim. Acta*, 2004, 522, 137.

16. A. Patel, S. Fouace and J.H.G. Steinke, *Anal. Chim. Acta*, 2004, 504, 53.

17. P.G. Seybold and W. White, *Anal. Chem.*, 1975, 47, 1199.

18. A. Salinas-Castillo, A. Segura-Carretero, J.M. Costa-Fernández, W.J. Jin and A. Fernández-Gutiérrez, *Anal. Chim. Acta*, 2004, 516, 213.

19. A. Salinas-Castillo, J.F. Fernández-Sánchez, A. Segura-Carretero and A. Fernández-Gutiérrez, *Anal. Chim. Acta*, 2004, 522, 19.

19. ref Ballesteros

20. M.E. Díaz-García and A. Sanz-Medel, *Anal. Chem.*, 1986, 58, 1436.

1. Official Journal of the European Communities, 15.12.2001. L331.
2. J.F. Fernández-Sánchez, A. Segura-Carretero, J.M. Costa-Fernández, N. Bordel, R. Pereiro, C. Cruces-Blanco, A. Sanz-Medel and A. Fernández-Gutiérrez, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2003, 377, 614.
3. C. Sluszný, V.V. Gridin, V. Bulatov and I. Schechter, *Anal. Chim. Acta*, 2004, 522, 145.
4. U. Panne, F. Lewitzka and R. Niessner, *Anal. Chim. Acta*, 1992, 20, 533.
5. A. Ghauch, J. Rima, C. Fachinger, J. Suptil and M. Martin-Bouyer, *Talanta*, 2000, 51, 807.
6. A.H. Ackerman and R.J. Hurtubise, *Appl. Spectrosc.*, 1999, 53, 770.
7. A.D. Campiglia, J.P. Alarie and T. Vo-Dinh, *Anal. Chem.*, 1996, 68, 1599.
8. J.F. Fernández-Sánchez, A. Segura-Carretero, C. Cruces-Blanco and A. Fernández-Gutiérrez, *Anal. Chim. Acta*, 2004, 506, 1.
9. S. Al-Kindy, R. Badía, J.L. Suárez-Rodríguez and M.E. Díaz-García, *Crit. Rev. Anal. Chem.*, 2000, 30, 291.
10. F.L. Dickert and O. Hayden, *Trends Anal. Chem.*, 1999, 18, 192.
11. K. Haupt and K. Mosbach, *Chem. Rev.*, 2000, 100, 2495.
12. F.L. Dickert, M. Tortschanoff, W.E. Bulst and G. Fischerauer, *Anal.*

