



Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas
Universidad Nacional de Rosario

Tesis de Doctorado en Ciencias Químicas

*Copolímeros fotoentrecruzables y su aplicación
como alternativa para la determinación de
contaminantes en agua*

Presentada por Julieta Ledesma

Rosario, Argentina

2020

*Copolímeros fotoentrecruzables y su aplicación como alternativa para la
determinación de contaminantes en agua*

Julieta Ledesma

Licenciada en química, Universidad Nacional de Rosario.

Esta Tesis es presentada como parte de los requisitos para optar al grado académico de Doctor en Ciencias Químicas, de la Universidad de Rosario y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta u otra Universidad. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el Área de Tecnología Química perteneciente al Instituto de Procesos Biotecnológicos y Químicos, dependiente de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, durante el período comprendido entre el 28/08/2014 y el 16/12/2020, bajo la dirección del Dr. Santiago A. Bortolato.

Nombres y firmas del Director y de los integrantes del Jurado de Tesis:

NOM. Director.....

NOM. Codirector.....

NOM.....

NOM.....

NOM.....

Defendida:

ÍNDICE

1-	AGRADECIMIENTOS	iv
2-	RESULTADOS PUBLICADOS	v
	2.1 ARTÍCULOS ORIGINALES	v
3-	ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS	vi
4-	RESUMEN.....	ix
5-	INTRODUCCIÓN.....	2
	5.1 BIOPOLÍMEROS	5
	5.1.1 Monómero de VBT.....	8
	5.1.2 Copolímero de VBT-VPS	10
	5.2. SENSOR QUÍMICO PARA CONTAMINANTES EN AGUA BASADOS EN COPOLÍMEROS VBT-VPS	13
	5.2.1 Estudio de afinidad sobre HPAs.....	16
	5.2.2 Cuantificación de HPA.....	17
	5.2.3 Micelas de copolímero en bloque.....	19
	5.2.4 Copolímeros sobre soporte solido	20
6-	OBJETIVOS	25
	6.1 OBJETIVO GENERAL	25
	6.2 OBJETIVOS PARTICULARES.....	25
7-	TEORÍA.....	27
	7.1 MODELADO MOLECULAR	28
	7.2 QUIMIOMETRÍA.....	30
	7.2.1 PARAFAC	32
	7.2.2 MCR-ALS.....	34
8-	SECCIÓN EXPERIMENTAL.....	40
	8.1 BIOPOLÍMEROS	43
	8.1.1 Síntesis de polímeros	43
	8.1.2 Caracterización de polímeros.....	45
	8.2 SENSOR QUÍMICO PARA CONTAMINANTES EN AGUA BASADOS EN COPOLÍMEROS VBT-VPS	47
	8.2.1 Estudio de afinidad sobre HPAs.....	47
	8.2.2 Cuantificación de HPA.....	47
	8.2.3 Micelas de copolímero en bloque.....	51
	8.2.4 Copolímeros sobre soporte solido	52

8.3	SOFTWARES UTILIZADOS	54
9-	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	56
9.1	ESTUDIO DE AFINIDAD SOBRE HPA	56
9.1.1	Análisis del sistema en solución acuosa	56
9.1.2	Análisis de la polaridad del disolvente del sistema	59
9.1.3	Análisis del modelado molecular	60
9.2	CUANTIFICACIÓN DE HPA	64
9.2.1	Análisis de la relación entre el sensibilizador de fluorescencia, HPAs e interferentes	64
9.2.2	Tratamiento quimiométrico de las muestras	67
9.2.3	Desempeño analítico de los métodos	69
9.2.4	Aplicación del método desarrollado en muestras de agua reales	73
9.3	MICELAS DE COPOLÍMERO EN BLOQUE	77
9.3.1	Análisis de la síntesis del copolímero en bloque	77
9.3.2	Análisis de las micelas de VBT-b-VPS	79
9.3.3	Interacción entre las micelas de VBT-b-VPS y HPA	86
9.4	COPOLÍMEROS SOBRE SOPORTE SÓLIDO	90
9.4.1	Análisis del sistema sobre soporte sólido	90
9.4.2	Cinética de foto-entrecruzamiento	95
10-	CONCLUSIONES	107
11-	INFORMACIÓN ADICIONAL	110
11.1	CARACTERIZACIÓN DE LOS POLÍMEROS SINTETIZADOS	110
12-	BIBLIOGRAFÍA	115

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1. Ejemplo de polímeros según la unidad repetitiva.....	6
Figura 2. Clasificación de polímeros según la forma de las cadenas.	6
Figura 3. Dimerización foto-inducida de timinas adyacentes en una cadena de ADN	8
Figura 4. Polifuncionalidad del monómero 1-(4-vinilbencil) timina (VBT).....	9
Figura 5. Monómero vinilfenilsulfonato de sodio, VPS.....	9
Figura 6. Foto-entrecruzamiento, entre dos timinas, de cadenas de polímeros de VBT-VPS.....	11
Figura 7. Distribución típica de pesos moleculares en un polímero.....	12
Figura 8. Estructuras de los 16 HPAs considerados como prioritarios.....	14
Figura 9. Ejemplo de interacción H- π entre dos bencenos	17
Figura 10. Descripción del proceso de fotolitografía.....	21
Figura 11. Estructura del modelado molecular definitivo: VBT:VPS 4:4 y BaP.....	29
Figura 12. Objetos de complejidad creciente que pueden construirse con mediciones.....	30
Figura 13. Diferentes nomenclaturas respecto a la jerarquía de datos para una muestra o un grupo de muestras.....	31
Figura 14. Representación gráfica del modelo PARAFAC para datos de segundo orden	34
Figura 15. Metodología MCR-ALS para tres vías.....	36
Figura 16. Metodología MCR-ALS para cuatro vías.	38
Figura 17. Lámpara UV de mano utilizada en las irradiaciones.....	42
Figura 18. Varilla para revestimientos	42
Figura 19. Polimerización radicalaria mediada por AIBN.....	44
Figura 20. Polimerización radicalaria mediada por TEMPO.....	45
Figura 21. Pictogramas según el GHS.....	49
Figura 22. Espectros de emisión de fluorescencia para soluciones acuosas de Copolímero-BaP....	56
Figura 23. Espectros de excitación y emisión de fluorescencia para diferentes soluciones donde se mantiene constante la concentración de BaP y varía la concentración de VBT:VPS 1:1.....	57
Figura 24. Espectros de emisión de fluorescencia para diferentes soluciones donde se mantiene constante la concentración de VBT:VPS 1:1 y varía la concentración de BaP.....	58
Figura 25. a) MEEF solución acuosa de BaP. b) MEEF solución acuosa BaP y VBT:VPS 1:1.	58
Figura 26. Espectros de emisión de fluorescencia: A) del BaP en diferentes solventes. B) de soluciones de BaP-VBT:VPS 1:1 en diferentes proporciones de DMSO:H ₂ O.....	60
Figura 27. Geometría optimizada de la interacción Hp- π	61
Figura 28. Geometría optimizada de la interacción Hp- π entre la metilamina y el benceno.	61
Figura 29. Diferentes geometrías de interacción Hp- π	62

Figura 30. Geometrías optimizadas para el sistema mediante el método ONIOM.....	63
Tabla 1. Valores energéticos relativos y longitud del enlace no covalente Hp- π	63
Figura 31. Curvas de saturación superpuestas para soluciones de VBT:VPS-BaP y VBT:VPS-Pir.	64
Figura 32. MEEFs de diferentes soluciones acuosas: (A) BaP y Pir; (B) VBT:VPS 1:1; (C) BaP, Pir y VBT:VPS 1:1; y (D), BaP, Pir y VBT:VPS 1:1 más interferentes ACE y ANT	66
Figura 33. Espectros de emisión de fluorescencias: (A) BaP y Pir; (B) VBT:VPS 1:1 con BaP, VBT:VPS 1:1 con Pir y VBT:VPS 1:1 puro. (C) Perfiles espectrales recuperados por PARAFAC	68
Tabla 2. Cifras de mérito analíticas para la determinación de BaP y Pir estimadas por PARAFAC...	69
Tabla 3. Cifras de mérito analíticas por el método HPLC-FD para estándares de BaP y Pir.....	70
Tabla 4. Estadísticas de las determinaciones de HPAs en diversos tipos de muestras. Comparación de métodos.....	71
Figura 34. Gráficos de concentraciones predichas por PARAFAC en función de los valores nominales de BaP y Pir en las muestras de validación y de prueba.	72
Figura 35. Gráfico de concentraciones predichas por PARAFAC de BaP y Pir en función de los valores nominales para muestras reales de agua con ACN y ANT como interferentes.....	73
Tabla 5 Estudio de recuperación (mediante PARAFAC) del BaP y el Pir.	74
Tabla 6. <i>Eco-Escalas</i> calculadas para ambos métodos.....	75
Figura 36. Espectros de RMN del homopolímero de VPS	77
Figura 37. Espectros de RMN del copolímero VBT-b-VPS sintetizado	78
Figura 38. Cromatogramas obtenidos para los patrones y el copolímero en bloque.....	79
Figura 39. Esquema del proceso de formación de las micelas de VBT-b-VPS.....	79
Tabla 7. Diámetros promedios y desvíos estándares de las soluciones micelares.....	80
Figura 40. Espectro de absorción de una solución acuosa de AM.....	81
Figura 41. Espectros de absorción de soluciones formadas por AM y diferentes concentraciones de solución micelar	82
Figura 42. Evolución de la absorbancia del AM, a 610 y 662 nm, en función de la CM.....	83
Figura 43. Espectros de excitación de fluorescencia de soluciones formadas por Pir y diferentes concentraciones de solución micelar.....	84
Figura 44. Espectros de emisión de fluorescencia (exc. a 331 nm) para soluciones micelares y Pir.85	
Figura 45. Espectros de emisión de fluorescencia (exc. a 339 nm) para soluciones micelares y Pir.85	
Figura 46. Intensidad de emisión de fluorescencia de la sonda en función de la CM.	86
Figura 47. Espectros de excitación de fluorescencia de solución de Pir a diferentes tiempos	87
Figura 48. Espectros de emisión de fluorescencia de solución de Pir a diferentes tiempos.....	87
Figura 49. Espectros de excitación de fluorescencia de solución acuosa de Pir con solución micelar medidos a diferentes tiempos.....	88

Figura 50. Espectros de emisión de fluorescencia de solución acuosa de Pir con solución micelar medidos a diferentes tiempos.....	89
Figura 51. Espectros de emisión de fluorescencia de diversos extendidos: PET solo; BaP; VBT:VPS 1:1; y, VBT:VPS 1:1-BaP.....	91
Figura 52. Imágenes SEM de diferentes sistemas: (A y B) Extendido VBT:VPS 1:1; (C y D) Extendido VBT:VPS 1:1 con BaP.....	92
Figura 53. Espectros de emisión de fluorescencia para diversos extendidos: PET solo; BaP; VBT:VPS 1:4; y, VBT:VPS 1:4-BaP.....	93
Figura 54. Espectros de emisión de fluorescencia para diversos extendidos: PET solo; BaP; VBT:VPS 1:8; y, VBT:VPS 1:8-BaP.....	94
Figura 55. Espectros de emisión de fluorescencia para diversos extendidos: PET solo; BaP; VBT:VPS 1:16; y, VBT:VPS 1:16-BaP.....	94
Figura 56. Imágenes SEM de diferentes extendidos sobre PET: VBT:VPS 1:1; VBT:VPS 1:1-BaP; VBT:VPS 1:4; VBT:VPS 1:4-BaP; VBT:VPS 1:8; VBT:VPS 1:8-BaP; VBT:VPS 1:16; VBT:VPS 1:16-BaP.....	95
Figura 57. MEEFs <i>front-face</i> en extendidos de copolímero VBT:VPS 1:1.....	96
Figura 58. Salidas del modelo MCR-ALS de segundo orden.....	97
Figura 59. Perfiles cinéticos resueltos por el modelo MCR-ALS de segundo orden.....	99
Tabla 8. Selectividad calculada acorde a la Ecuación 7.4 para ambos modelos.....	100
Figura 60. Perfiles obtenidos por MCR-ALS de tercer orden.....	102
Figura 61. Estructuras propuestas para las especies involucradas en el proceso de curado.....	103
Figura 62. Curvas de regresión para las tres especies principales según el enfoque quimiométrico de tercer orden.....	105
Figura 63. Espectro de RMN ¹ H de VBT en DMSO.....	110
Figura 64. Espectro de RMN ¹ H de VPS en DMSO.....	110
Figura 65. Espectro de RMN ¹ H de VBT:VPS 1:1 en DMSO.....	111
Figura 66. Espectros de RMN ¹ H de VBT:VPS 1:1 y VBT:VPS 1:4 en DMSO.....	112
Figura 67. Espectros RMN ¹ H de VBT:VPS 1:8 y VBT:VPS 1:16 en DMSO.....	112
Tabla 9. PM determinados por SEC.....	113
Tabla 10. Análisis elemental por LECO.....	113

1- AGRADECIMIENTOS

De todas las páginas de la tesis, sin lugar a duda, esta es la que más me ha costado escribir y la más incompleta.

Es difícil enumerar a todas las personas que en estos años y en este proceso me han ayudado, han sido muchísimas. Familia, amigos, colegas, directores, profesores, alumnos, vecinos, las nuevas amistades, las personas que pasan por un tiempo acotado en nuestra vida, y también, aquellas personas que por algún motivo hicieron que la cuesta sea un poco más empinada. A todas y a cada una GRACIAS.

Gracias a la beca otorgada por CONICET y a las personas que apuestan a la educación y a la ciencia, durante esta etapa de formación pude tener un sustento económico que me permitió ayudar y disfrutar.

Gracias Santi por haber sido vos mi director y Débora por estar siempre presente más allá de la distancia.

Quiero detenerme en las personas que tanto amo: Mamá, Papá, Juan, Jere, Lela, Tere, Pimpi, Nico, Emi, Ro, Teresita, Agus, Chiari, Angie, Elen y Alfon; gracias por estar siempre. Este logro es de toda la familia. Hoy me tocó llegar a la meta, muchos de ustedes también llegaron y van a llegar, y otros desde su lugar (nuestro hogar) sostienen y empujan a toda la familia. Gracias a Dios por tanto.

La mayor riqueza que me llevo de la tesis es el tiempo que me brindó cada persona en esta hermosa etapa, y el mejor título hasta el día de la fecha sigue siendo el de Tía Juli!

Gracias.



2- RESULTADOS PUBLICADOS

Parte de los resultados reportados en esta tesis han sido publicados en revistas internacionales con referato y presentados en congresos nacionales.

2.1 ARTÍCULOS ORIGINALES

J. LEDESMA; C. BOSCHETTI; D. MARTINO; S. BORTOLATO. Application of thymine-based copolymers in the quantification of organic pollutants in water by sensitized fluorescence. *Microchemical Journal*. 2020. ISSN 0026-265X.

J. LEDESMA; P. L. PISANO; D. M. MARTINO; C. E. BOSCHETTI; S. BORTOLATO. Thymine based copolymers: a feasible sensor to detect persistent organic pollutants in water. *The Royal Society of Chemistry*. 2017. ISSN 2046-2069.

J. LEDESMA; S. BORTOLATO; D. M. MARTINO; C. E. BOSCHETTI. Fluorescence spectroscopy and multivariate analysis as a greener monitoring tool: characterization of the curing kinetics of bioinspired polymers. *Green Chemistry Letters and Reviews*. Taylor & Francis. 2015. ISSN 1751-8253.

J. LEDESMA; S. BORTOLATO; C. E. BOSCHETTI; D. M. MARTINO. Optimization of environmentally benign polymers based on thymine and poly vinyl sulfonate using Plackett-Burman design and surface response. *Journal of Chemistry*. New York: Hindawi Publishing Corporation. 2013. ISSN 2090-9063.



3- ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

λ : Longitud de onda

ACE: Acenaftileno.

ACN: Acetonitrilo.

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

AIBN: 2,2'-azobis (2-metilpropionitrilo).

ALS: Cuadrados mínimos alternantes (*Alternating Least Squares*).

AM: Azul de metileno.

ANT: Antraceno.

BaP: Benzo[a]pireno.

CM: Concentración Micelar.

CMC: Concentración Micelar Crítica.

DCM: Diclorometano.

DLS: Dispersión dinámica de luz (*Dynamic Light Scattering*).

DMSO: Dimetilsulfóxido.

FT-IR: Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier.

GHS: Sistema Globalmente Armonizado de Clasificación y Etiquetado de Productos Químicos (*Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals*).

HPAs: Hidrocarburos Policíclicos Aromáticos.

HPLC: Cromatografía líquida de alta eficacia (*High Performance Liquid Chromatography*).

HPLC-FD: Cromatografía líquida de alta eficacia acoplada a un detector de fluorescencia.

H- π : Interacciones hidrógeno no polar- π .

Hp- π : Interacciones hidrógeno polar- π .

IUPAC: Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (*International Union of Pure and Applied Chemistry*).



MCR-ALS: Resolución multivariada de curvas asistida por cuadrados mínimos alternantes (*Multivariate Curve Resolution-Alternating Least Squares*).

MEEF: Matriz de excitación y emisión de fluorescencia.

Mn: Promedio en número (*Mean number*).

MSR: Metodología de Superficie de Respuesta (*response-surface methodology*).

Mw: Promedio en peso (*Mean weight*).

PARAFAC: Análisis paralelo de factores (*Parallel Factor Analysis*).

PET: Polietilenterftalato.

Pir: Pireno.

PM: Peso molecular.

PPS: Poli(estireno sulfonato) de sodio.

RMN: Resonancia Magnética Nuclear.

SEC: Cromatografía de exclusión por tamaño (*Size Exclusion Chromatography*).

SEM: Microscopía electrónica de barrido (*Scanning Electron Microscopy*).

TEMPO: (2, 2, 6, 6-tetrametilpiperidin-1-il)oxil.

Tol: Tolueno.

UV: Ultravioleta.

VBA: Cloruro de vinilbenciltrietilamonio.

VBT: 1-(4-vinilbencil) timina.

VBT-VPS: Copolímeros de 1-(4-vinilbencil) timina y vinilfenilsulfonato de sodio sin proporción definida de cada monómero.

VBT_n:VPS_m: Copolímero de proporción de monómeros definida, n a m.

VBT:VPS 1:1: Copolímero de proporción de monómeros definida, 1 a 1.

VBT:VPS 1:4: Copolímero de proporción de monómeros definida, 1 a 4.

VBT:VPS 1:8: Copolímero de proporción de monómeros definida, 1 a 8.



VBT:VPS 1:16: Copolímero de proporción de monómeros definida, 1 a 16.

VBT:VPS 1:32: Copolímero de proporción de monómeros definida, 1 a 32.

VBT-b-VPS: Copolímero en bloque. Formado por un bloque de poli VBT y otro bloque de poli VPS.

Vis: Visible.

VPS: Vinilfenilsulfonato de sodio.



4- RESUMEN

En la actualidad nadie discute el hecho de que todos los procesos que se llevan a cabo para diseñar y preparar compuestos químicos deberían contemplar el impacto social y medioambiental tanto de la síntesis del producto en sí como de sus posibles desechos. Esto implica trabajar bajo los principios de la Química Verde: evitar la formación de desechos contaminantes y propiciar la economía de tiempo y recursos. Bajo esta filosofía, surge la necesidad de desarrollar tecnologías analíticas que cumplan con los requisitos necesarios para considerarlas herramientas sustentables. Específicamente, desarrollar metodologías para la detección y determinación de contaminantes, a niveles de trazas, en un recurso tan primordial para la vida como el agua.

Los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAPs) se encuentran entre los principales contaminantes orgánicos persistentes en el agua. Los problemas que se enfrentan cuando se quiere determinar son los niveles de concentración muy bajos; y la selectividad necesaria dado que estos compuestos son estructuralmente similares y suelen encontrarse varios en una misma muestra. Los métodos de referencia para su detección utilizan estrategias analíticas que no presentan las características deseadas para ser considerados sustentables. Sin embargo, la espectroscopía de fluorescencia molecular sensibilizada por sensores fluorescentes sí puede ser considerada como tal. La principal ventaja que presenta esta técnica, rápida y simple, es la mejora en la sensibilidad. La clave de estos métodos luminiscentes es lograr una adecuada inmovilización del analito para facilitar su emisión fluorescente. En relación a este punto es importante mencionar el uso de biopolímeros solubles en agua como agentes estructurantes que dan rigidez a las moléculas de analito. Precisamente, los copolímeros bioinspirados hidrosoluble que contengan timina en su estructura pueden interactuar con los HAPs y, por tanto, utilizarse como sondas y agentes estructurantes en sensores ópticos para la determinación de estos contaminantes.

Para desarrollar un sensor químico el primer paso consistió en sintetizar el biopolímero a utilizar como sonda. Luego, estudiar la afinidad que demostraron tener estos copolímeros por el benzo(a)pireno (BaP) (uno de los HAPs más persistentes en el agua y dañinos); y su utilización para exaltar la luminiscencia nativa de este contaminante. El conocimiento adquirido de la interacción copolímero-BaP se aplicó para el desarrollo de un método analítico simple basado en la mejora de la fluorescencia de dos contaminantes (BaP y Pireno) en simultáneo. El siguiente paso: explorar la utilización de micelas de copolímeros como agentes estructurantes. Finalmente, para avanzar en



el desarrollo del sensor como un dispositivo portátil. Se trasladó el sistema de investigación a una superficie sólida, en la cual el copolímero sea capaz de adherirse para luego inmovilizar y cuantificar los contaminantes.

Al analizar la interacción entre diferentes tipos de copolímeros y el BaP, se observó que el copolímero influye en la fluorescencia nativa del BaP, disminuyendo la exaltación de fluorescencia a medida que disminuye el porcentaje de timina en el copolímero. A partir de dos métodos analíticos (espectroscopia de fluorescencia y microscopía electrónica de barrido) se pudo corroborar la existencia de una interacción no covalente entre el copolímero y el BaP; que mediante un modelado teórico se racionalizó encontrando una interacción del tipo *Hidrógeno polar- π* entre un átomo de hidrógeno de un resto de timina y un anillo del BaP.

Se desarrolló un nuevo método analítico que combina espectroscopia de fluorescencia sensibilizada y análisis multivariado, en el cual, el copolímero mejora la señal de fluorescencia de dos contaminantes haciendo posible cuantificarlos de manera confiable a niveles menores que los requeridos. La selectividad analítica se logró utilizando un algoritmo para procesar datos de segundo orden de espectros de excitación y emisión de fluorescencia. El rendimiento del método desarrollado se probó contra el método de referencia; y al analizar qué metodología de trabajo se enmarca mejor en los lineamientos de la Química Verde, resultó que el desarrollado en la tesis se adecúa mejor. Se logró sintetizar un copolímero en bloque, caracterizarlo y formar soluciones micelares, con las cuales se hicieron pruebas de fluorescencia con el Pireno. Los resultados indicarían una posible encapsulación del pireno en la micela.

Finalmente, al trasladar el sistema en estudio a un soporte sólido, fue posible utilizar dos enfoques analíticos que combinan fluorescencia en fase sólida con herramientas quimiométricas, para proporcionar información precisa sobre la inmovilización foto-inducida de los copolímeros, junto con la cinética de todas las especies involucradas. Estos enfoques utilizados cumplen con los requisitos del paradigma de la Química Verde.

Los resultados obtenidos muestran que es factible el uso de copolímeros bioinspirados a base de timina para el desarrollo de nuevas tecnologías sustentables (como sensores químicos) capaces de determinar con alta selectividad y sensibilidad contaminantes orgánicos en muestras de agua.



LA TIERRA

Gabriela Mistral

Niño indio, si estás cansado,
tú te acuestas sobre la Tierra,
y lo mismo si estás alegre,
hijo mío, juega con ella...

Se oyen cosas maravillosas
al tambor indio de la Tierra:
se oye el fuego que sube y baja
buscando el cielo, y no sosiega.

Rueda y rueda, se oyen los ríos
en cascadas que no se cuentan.

Se oyen mugir los animales;
se oye el hacha comer la selva.

Se oyen sonar telares indios.
Se oyen trillas, se oyen fiestas.

Donde el indio lo está llamando,
el tambor indio le contesta,
y tañe cerca y tañe lejos,
como el que huye y que regresa...

Todo lo toma, todo lo carga
el lomo santo de la Tierra:
lo que camina, lo que duerme,
lo que retoza y lo que pena;
y lleva vivos y lleva muertos
el tambor indio de la Tierra.

Cuando muera, no llores, hijo:
pecho a pecho ponte con ella
y si sujetas los alientos
como que todo o nada fueras,
tú escucharás subir su brazo
que me tenía y que me entrega
y la madre que estaba rota
tú la verás volver entera.



INTRODUCCIÓN



5- INTRODUCCIÓN

El *desarrollo sostenible* es aquel que permite el crecimiento económico y el uso de recursos naturales teniendo muy en cuenta el aspecto medioambiental y los sociales para que a largo plazo no se comprometa ni degrade la vida en el planeta y la calidad de vida de la especie humana. Esta conciencia de los costos humanos, naturales y del medioambiente del desarrollo y el progreso ha venido a modificar la actitud de despreocupación, o justificación, que imperó durante mucho tiempo [1]. Todos los procesos que se llevan a cabo para diseñar y preparar compuestos químicos deberían contemplar el impacto social y medioambiental tanto de la síntesis como del producto en sí y sus posibles desechos. En décadas pasadas se dieron a conocer numerosos desastres ambientales provocados por la liberación al aire, al agua y al suelo de sustancias químicas que producían efectos adversos sobre la salud humana y el medioambiente. Estos efectos adversos no se relacionaban con el uso para el cual dichas sustancias habían sido diseñadas, ni se habían previsto durante su diseño. Tales sucesos desencadenaron el surgimiento de la llamada “conciencia ecológica” [2].

Las regulaciones ambientales, en general, están destinadas a controlar la cantidad y la concentración final de las sustancias químicas liberadas al ambiente, y a medir los efectos involuntarios que podrían tener sobre los ecosistemas y la salud humana. Este enfoque ambientalista introduce modificaciones en el diseño tradicional de la industria, soluciones de final de tubería. Sin embargo, si lo que se busca es prevenir o minimizar la contaminación, debería trabajarse desde su origen y bajo las *Reglas de las 3 R* (Reducir, Reciclar, Reutilizar); tanto a escala industrial como en los laboratorios académicos o de investigación. Esto es lo que se denomina Química Verde [3] y supone un paso más allá de lo que sería el mero hecho de un correcto tratamiento de los residuos dañinos que puedan generarse: se trata de evitar la formación de desechos contaminantes y propiciar la economía de tiempo y recursos. Desde el enfoque de la Química Verde, el diseño de productos y procesos químicos debe llevarse a cabo de acuerdo a *Doce Principios* [3]:

- ✚ Principio Nº 1: Prevención de Desechos. *Es mejor prevenir la formación de desechos, más que tratarlos o eliminarlos una vez generados.*
- ✚ Principio Nº 2: Economía de Átomos. *Los métodos de síntesis deben diseñarse para maximizar la incorporación de todos los materiales usados en el proceso dentro del producto final.*



- ✚ Principio Nº 3: Síntesis Menos Peligrosa. *Cualquiera sea la práctica, las metodologías de síntesis deben diseñarse para usar o generar sustancias que posean baja o nula toxicidad para la salud humana y para el medioambiente.*
- ✚ Principio Nº 4: Sustancias Químicas Seguras. *Los productos químicos deben diseñarse para que, preservando la eficacia de su función, presenten reducción en su toxicidad.*
- ✚ Principio Nº 5: Sustancias Auxiliares Seguras. *El uso de sustancias auxiliares en un proceso de fabricación (solvente, agente de separación) debe eliminarse cuando sea posible, o éstas deben ser inocuas cuando deban utilizarse.*
- ✚ Principio Nº 6: Eficiencia Energética. *Los requerimientos de energía deben ser reconocidos por su impacto ambiental y económico, y deben ser minimizados.*
- ✚ Principio Nº 7: Reactivos Renovables. *Las materias primas o alimentaciones del proceso deben ser renovables en lugar de no renovables, cuando técnica y económicamente sea posible.*
- ✚ Principio Nº 8: Derivación Reducida. *La derivación innecesaria (grupos de bloqueo, protección/desprotección, modificación temporaria por procesos físicos/químicos) debe evitarse siempre que sea posible.*
- ✚ Principio Nº 9: Catálisis. *Se emplearán reactivos catalíticos (tan selectivos como sea posible), reutilizables en lo posible, en lugar de reactivos estequiométricos.*
- ✚ Principio Nº 10: Diseño por Degradación. *Los productos químicos deben diseñarse de manera que al final de su vida útil, no sean persistentes en el medio ambiente y se degraden a productos inocuos.*
- ✚ Principio Nº 11: Análisis en Tiempo Real para Prevenir la Polución. *Deben desarrollarse metodologías analíticas para permitir el monitoreo y el control en tiempo real sobre los procesos, antes de la formación de sustancias peligrosas.*
- ✚ Principio Nº 12: Minimización del Riesgo de Accidentes Químicos. *Las sustancias y la forma en que se usan en un proceso químico deben elegirse para minimizar accidentes químicos potenciales, incluyendo derrames, explosiones y fuego.*

En el marco de esta nueva filosofía de trabajo, surge la necesidad de desarrollar nuevas tecnologías analíticas que cumplan con los requisitos necesarios para considerarlas herramientas



sustentables. Tradicionalmente, la química analítica desarrolla y aplica métodos e instrumentos para obtener información confiable sobre la composición y naturaleza de muestras. En la actualidad, esta disciplina enfrenta el gran desafío (entre otros) de desarrollar técnicas analíticas económicas y sustentables para la detección de manera sensible, precisa y selectiva de compuestos de interés (analitos) en muestras complejas.

Conforme al concepto de Química Verde y sus doce principios introducidos por Anastas y Warner [3], la rama de la química que más contribuye al uso y generación de sustancias peligrosas es la síntesis orgánica. Por esta razón, la química orgánica ha dominado la Química Verde durante casi una década [4]. Como las métricas tradicionales de la Química Verde no se adaptan a la mayoría de los procesos analíticos, surgió la necesidad de desarrollar nuevas métricas que permitan evaluar los costos y beneficios de los procesos a utilizar. Galuszka y colaboradores han reportado una escala analítica, llamada *Eco-Escala*, para evaluar la ecología de la metodología analítica utilizada y compararla con los métodos de referencia; y así poder determinar qué metodología es la más ecológica para un determinado proceso. El método de medición se basa en asignar puntos de penalización a diferentes parámetros y pasos de un proceso analítico que se alejen de un “análisis verde ideal”, el cual se caracteriza por la eliminación o el uso mínimo de reactivos, el uso mínimo de energía y la no generación de residuos [4].

El objetivo principal del trabajo fue contribuir al avance de un sensor químico sustentable que, como resultado de su interacción con un analito, sea capaz de proporcionar información analítica útil en tiempo real en una muestra de agua contaminada. Para la construcción de este dispositivo, se trabajó en el marco de la química analítica verde, y se estudió la posibilidad de utilizar un biopolímero como sensor de contaminantes.



5.1 BIOPOLÍMEROS

Los polímeros tienen un rol fundamental en la industria y la tecnología moderna. Existen polímeros naturales y sintéticos [5]. La aplicación cada vez mayor de los polímeros sintéticos ha generado inquietudes relacionadas con la salud humana y el medio ambiente. Las características de durabilidad y rigidez que hacen que estos materiales sean muy útiles, también aseguran su persistencia en el medio ambiente y dificultan su degradación [6]. Estos problemas centraron la atención en los llamados biopolímeros [7], que presentan ventajas para el medio ambiente y la salud humana. Tradicionalmente se llamó “biopolímero” al polímero sintetizado por sistemas biológicos, o al polímero sintetizado químicamente pero que deriva de precursores biológicos como aminoácidos, azúcares o grasas y aceites naturales. Actualmente se incluyen en la definición los polímeros sintetizados químicamente que imitan procesos que ocurren en la naturaleza. Éstos se indican habitualmente con el nombre de polímeros bioinspirados. La naturaleza es la mejor referencia para la Química Verde, dado que sintetiza abundantes materiales, bien diseñados, especialmente en lo que respecta a la economía de átomos y la utilización de la energía [8].

Los polímeros son macromoléculas que se producen por la unión de moléculas pequeñas llamadas monómeros, que constituyen la unidad repetitiva del mismo. Cuando un solo tipo de monómero está presente, el polímero se denomina homopolímero. Cuando están presentes dos o más monómeros diferentes se tiene un copolímero y los monómeros que lo conforman se pueden ubicar en la cadena principal combinándose según diversos patrones, denominándose copolímero alternante, al azar, de injerto o en bloque. En la Figura 1 se esquematiza lo mencionado recientemente.

Según la forma de las cadenas, Figura 2, los polímeros pueden ser clasificados como:

- polímeros lineales, en los cuales los monómeros están unidos uno al otro en una sola dirección formando largas cadenas lineales;
- polímeros ramificados, en los cuales existen cadenas laterales cortas que se unen a una cadena principal, la presencia de ramificaciones tiene efectos significativos en muchas propiedades físicas del polímero;
- polímeros entrecruzados, los cuales presentan cadenas laterales pendientes que se unen a diferentes cadenas principales de moléculas poliméricas formando una red entrecruzada, el entrecruzamiento le proporciona al polímero propiedades diferentes;
- polímeros estrella, varias cadenas poliméricas unidas a un centro común;



- y dendrímeros, cadenas que crecen a partir de otras cadenas en donde no existe una cadena principal [9].

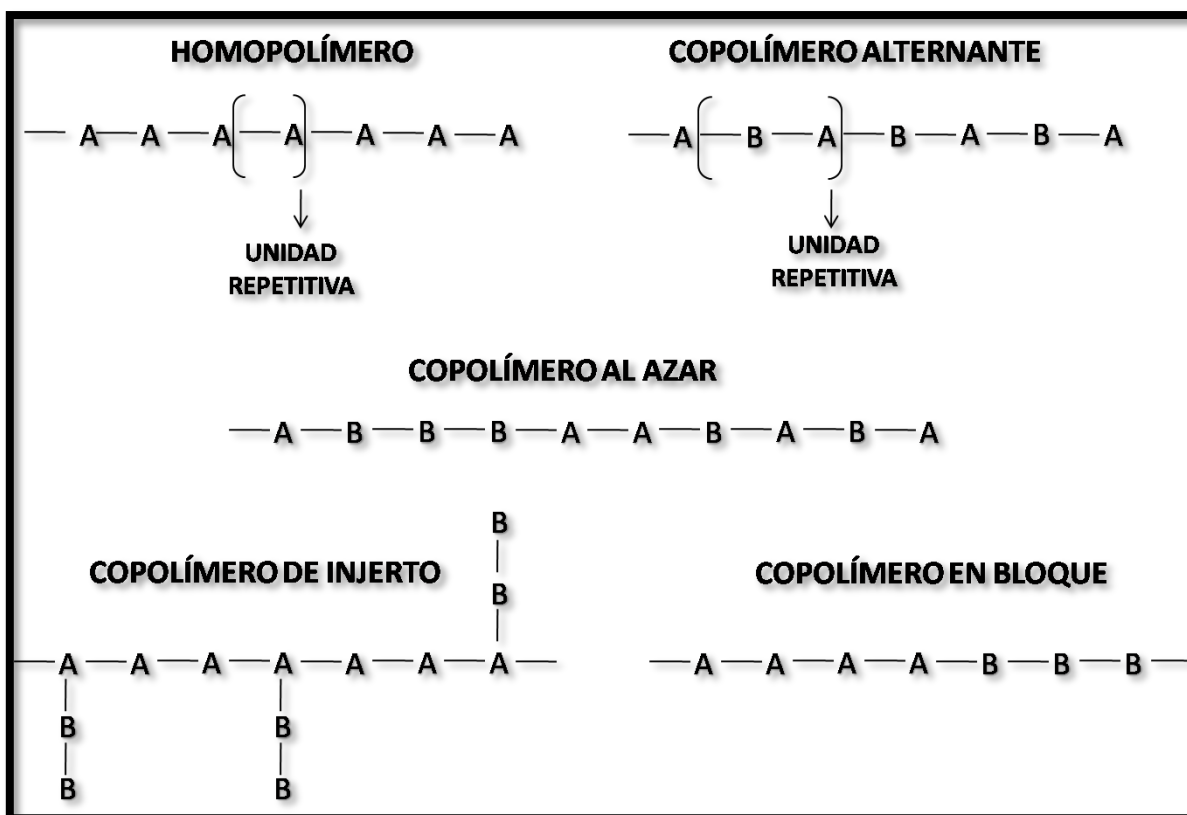


Figura 1. Ejemplo de polímeros según la unidad repetitiva.

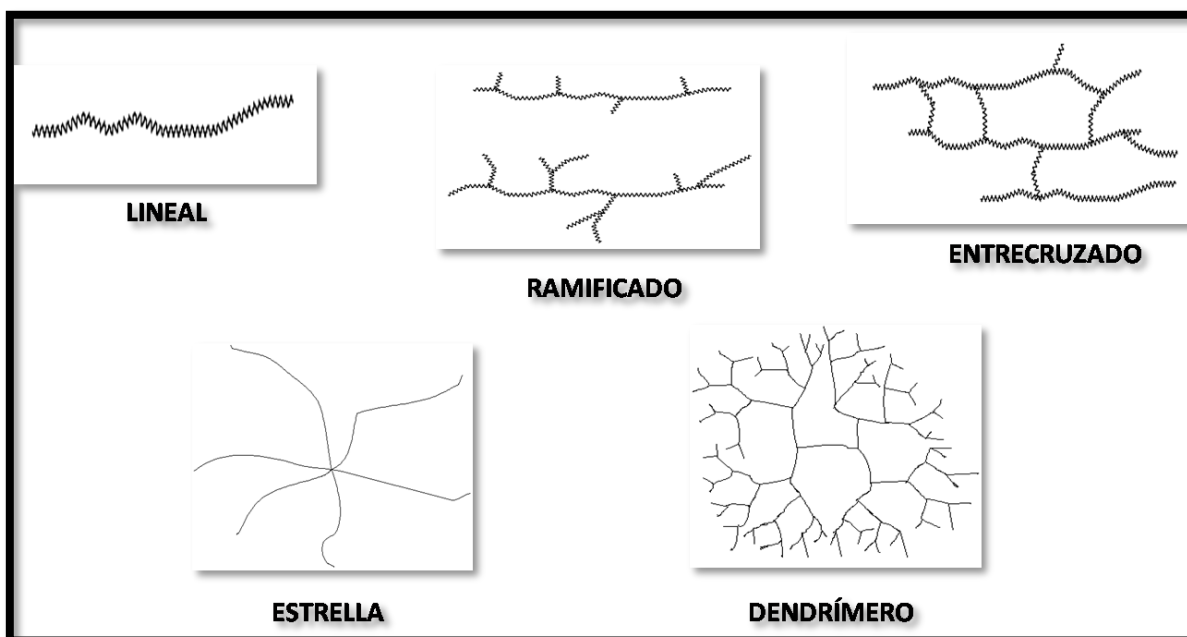


Figura 2. Clasificación de polímeros según la forma de las cadenas.



La reacción por la cual se sintetiza un polímero a partir de sus monómeros se denomina polimerización y según el mecanismo por el cual se unen los monómeros se pueden distinguir dos tipos:

-Polimerización por Crecimiento en Etapas: existen cadenas en crecimiento que reaccionan entre sí para formar cadenas aún más largas, aplicable a cadenas de todos los tamaños, un monómero o dímero puede reaccionar del mismo modo que una cadena de cientos de unidades monoméricas.

-Polimerización por Crecimiento de Cadena: los monómeros se adicionan al polímero de a uno por vez solo los monómeros pueden reaccionar con cadenas en crecimiento. En este tipo de polimerizaciones se definen tres etapas: iniciación, propagación y terminación. Según la naturaleza de las partículas reactivas propagadoras de la cadena se puede tener un proceso de polimerización por radicales libres o una polimerización catiónica o aniónica [10].

En las últimas décadas han surgido nuevas líneas de investigación centradas en el diseño de biopolímeros sintéticos que contengan bases de ácidos nucleicos. Éstos son atractivos debido a su capacidad para combinar las ventajas de los polímeros sintéticos con propiedades moleculares interesantes que se encuentran en la naturaleza [7]. En el ácido desoxirribonucleico (ADN), las bases heterocíclicas: timina, guanina, citosina y adenina, absorben luz en la región ultravioleta (UV) del espectro electromagnético. En 1941 se reportó por primera vez que el ADN puede ser dañado por exposición a radiaciones de este tipo [11-12]. Específicamente, cuando una timina es irradiada con luz UV ($\lambda \sim 285$ nm) experimenta una reacción de foto-ciclación $2\pi + 2\pi$ con otra timina adyacente en la misma hebra del ADN, conduciendo a la formación de un ciclobutano, un dímero de timina intrahebra [13-14]; esta reacción puede observarse en la Figura 3.

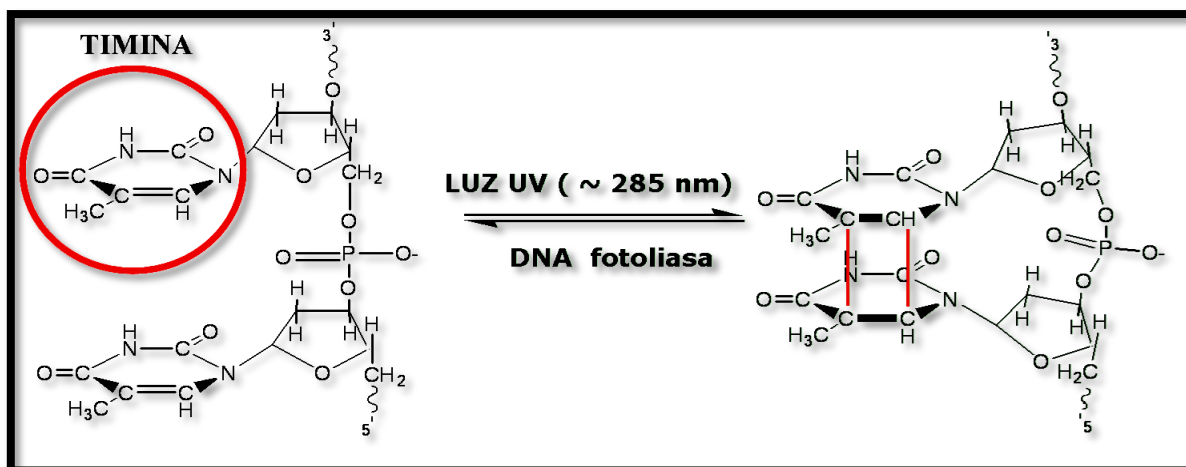


Figura 3. Dimerización foto-inducida de timinas adyacentes en una cadena de ADN [15].

Estos dímeros de pirimidina distorsionan en forma local la estructura de los apareamientos de bases del ADN interfiriendo en procesos como replicación y transcripción. Los mismos pueden volver a su forma monomérica mediante la foto-reactivación catalizada por enzimas que absorben luz, conocidas como DNA fotoliasas. Estas enzimas se hallan en muchos procariontes y eucariontes pero no en seres humanos [15]. En los individuos, este proceso se ha relacionado con el desarrollo de ciertas formas de cáncer de piel; aun así, la foto-actividad de la timina ha sido aprovechada con éxito por la comunidad médica en métodos de tratamiento de psoriasis basados en radiación UV [16]. Esta reacción, a su vez, puede revertirse mediante un proceso inducido por luz UV de menor longitud de onda ($\lambda = 240 \text{ nm}$) produciendo la apertura del anillo de ciclobutano [17].

5.1.1 Monómero de VBT

El monómero sintético de 1-(4-vinilbencil) timina (en adelante denominado, VBT), se diseñó específicamente para incorporar la foto-reactividad de esta base heterocíclica dentro de un sistema polimérico [18-23]. Como muestra la Figura 4, el monómero de VBT tiene una gran variedad de funcionalidades. El grupo vinilo del estireno es un sitio de polimerización. El anillo de benceno puede formar interacciones por apilamiento de bases, interacciones conocidas como π -stacking. En el anillo de timina, los enlaces C=O y N-H, generan un grupo aceptor-donante-aceptor para enlaces de hidrógeno que permite la conjugación con sistemas complementarios; el doble enlace carbono-carbono funciona como sitio de foto-dimerización $2\pi + 2\pi$.

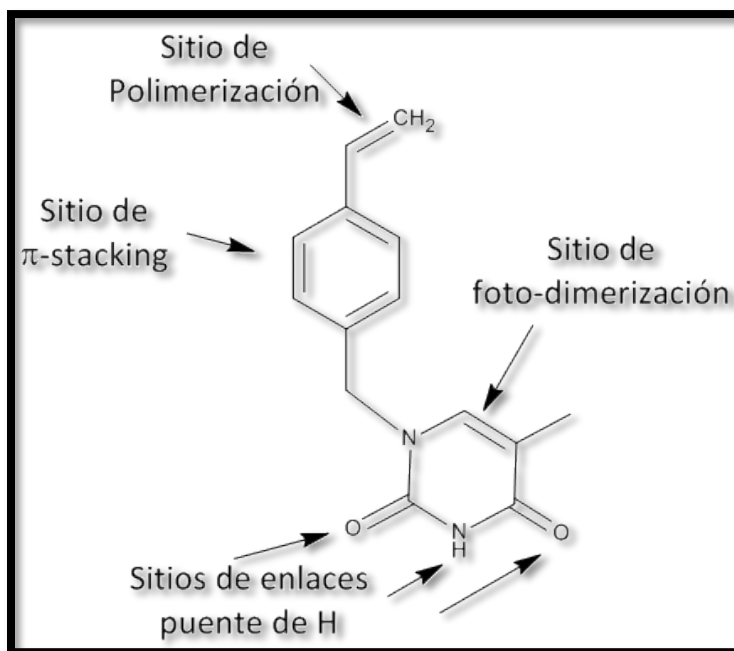


Figura 4. Polifuncionalidad del monómero 1-(4-vinilbencil) timina (VBT).

El homopolímero de VBT es insoluble en agua debido a las fuertes interacciones del tipo enlace de hidrógeno intermoleculares. Para sortear este inconveniente, y poder contar con un polímero soluble en agua y solventes más benévolos para el medio ambiente, se puede realizar una síntesis de un copolímero que incluya el monómero de VBT (con sus potenciales aplicaciones) y un monómero iónico [24]. De esta manera se obtiene copolímeros hidrosolubles que incluyen en su estructura la molécula de la timina con sus variadas funcionalidades. Un monómero aniónico útil y práctico para la copolimerización es el vinilfenilsulfonato de sodio (o VPS) representado en la Figura 5.

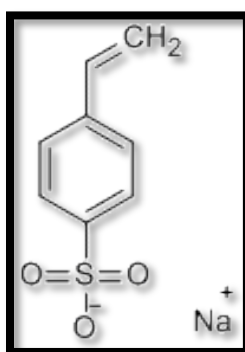


Figura 5. Monómero vinilfenilsulfonato de sodio, VPS.



5.1.2 Copolímero de VBT-VPS

La síntesis de copolímeros VBT-VPS se realiza mediante un proceso de polimerización por crecimiento de cadena mediante radicales libres. La relación entre la estructura molecular (distribución de pesos moleculares y composición química) y las propiedades físicas (foto-reactividad y solubilidad) de estos polímeros quedan determinadas por las condiciones de síntesis. Por ejemplo, la relación entre el monómero de VBT y el monómero iónico tiene una influencia significativa en la solubilidad del copolímero. La ubicación de los diferentes monómeros en la cadena principal también influye en las características de estas macromoléculas que, según el diseño o patrón que sigan las unidades repetitivas, se pueden obtener varios tipos de copolímeros: copolímeros al azar o copolímeros en bloque [25]. Para formar copolímeros al azar o en bloque hay variaciones en el proceso de polimerización, principalmente, en la disponibilidad del sustrato a medida que crecen las cadenas por radicales libres. Sin embargo, es importante resaltar que en las dos macroestructuras se cuenta con ambos tipos de monómeros y las funcionalidades aportadas por la timina. En la Figura 6 se puede observar la reacción de foto-dimerización (inspirada en el proceso biológico de bases adyacentes de timina irradiadas por luz UV) de copolímeros con n unidades de VBT y m unidades de VPS.

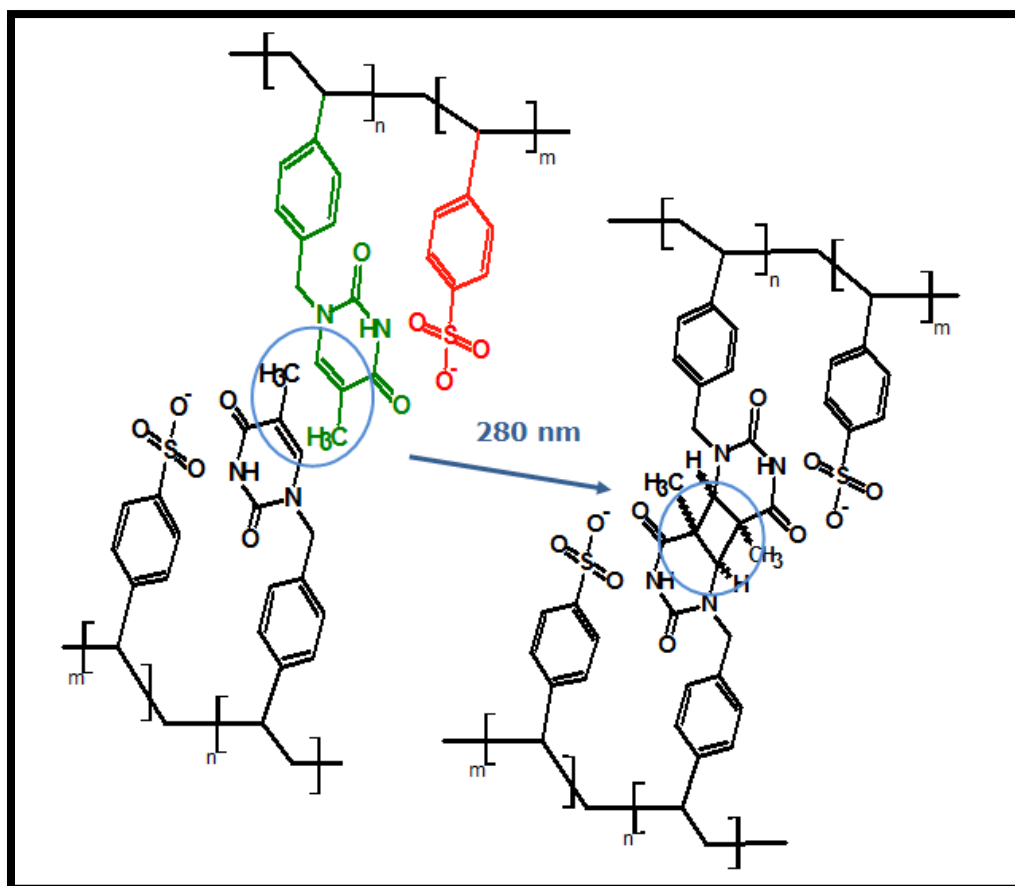


Figura 6. Foto-entrecruzamiento, entre dos timinas, de cadenas de polímeros de VBT-VPS.

Estos copolímeros combinan la foto-reactividad de la timina con la posibilidad de ajustar sus propiedades, lo que otorga versatilidad para un gran número de potenciales usos. En efecto, han surgido interesantes aplicaciones en una variedad de campos que van desde productos para el cuidado del cabello y esmalte para uñas [26], el diseño de superficies conductoras eléctricas [27] y de superficies antibacterianas [28], hasta sistemas de liberación controlada de drogas para uso farmacéutico y agrícola y micelas capaces de encapsular materiales huéspedes [29].

Por otra parte, los enlaces que mantienen unidas las moléculas que conforman un polímero son idénticos a los de las moléculas sencillas, sin embargo, las propiedades de estas macromoléculas son distintas. Una característica de las sustancias poliméricas es que presentan pesos moleculares (PM) muy superiores si se los compara con otras sustancias de naturaleza no polimérica. Tanto los polímeros sintéticos como la mayoría de los naturales (a excepción de las proteínas) están formados por una mezcla de moléculas que han alcanzado diferentes grados de polimerización y, por lo tanto, tienen una distribución de PM en vez de un único PM para cada cadena [30]. En la Figura 7 se muestra una curva típica de distribución de PM.

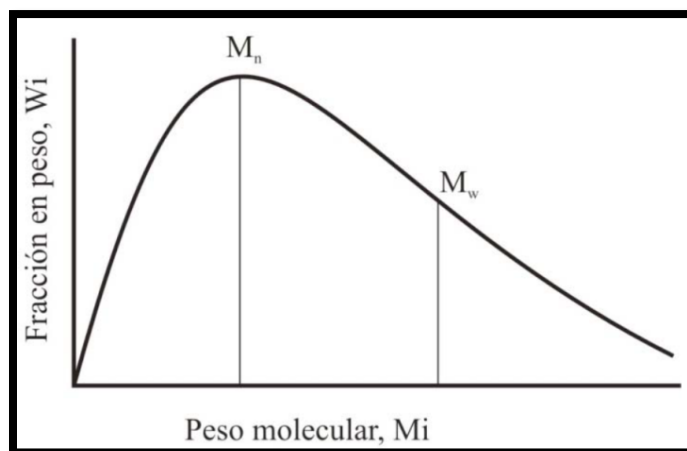


Figura 7. Distribución típica de pesos moleculares en un polímero.

Los valores medios más importantes utilizados para representar el PM de un polímero son el promedio en número, M_n (media aritmética):

$$M_n = \frac{\sum N_i M_i}{\sum N_i}$$

y el promedio en peso, M_w (media cuadrática):

$$M_w = \frac{\sum N_i M_i^2}{\sum N_i M_i}$$

donde N_i representa el número de moles de la especie i de PM M_i .

La relación M_w/M_n se utiliza frecuentemente como medida de la heterogeneidad de la distribución del PM de un polímero y se conoce como índice de polidispersidad (D). Esta relación es igual a la unidad para polímeros monodispersos, aumentando su valor a medida que la distribución se ensancha. El índice de polidispersidad suele tomar valores entre 1,5 y 3, aunque ocasionalmente puede alcanzar valores mayores dependiendo del tipo de polimerización [30].

Una de las técnicas más comunes para determinar el M_n y el M_w de un polímero es la cromatografía de exclusión por tamaño. En este método, los polímeros se separan en virtud de su volumen hidrodinámico. La técnica implica pasar una solución del polímero a través de una columna rellena con una fase sólida porosa, donde las moléculas pequeñas pueden acceder a los poros más fácilmente que las moléculas más grandes y, como consecuencia, las moléculas de mayor tamaño eluyen primero. La técnica no aporta valores absolutos, sino que brinda valores relativos, por lo tanto, requiere de una curva de calibración con una serie de polímeros de PM conocidos [31].



5.2. SENSOR QUÍMICO PARA CONTAMINANTES EN AGUA BASADOS EN COPOLÍMEROS VBT-VPS

Un sensor químico se define comúnmente como un dispositivo que, como resultado de su interacción química con un analito, es capaz de proporcionar información analítica útil [32]. Estrictamente hablando, un sensor es un dispositivo miniaturizado capaz de proporcionar información continua en tiempo real y en línea sobre la presencia de analitos específicos en una muestra. La relevancia de aplicar sensores a las mediciones frente a los métodos tradicionales radica en las ventajas que ofrecen estos dispositivos, como la detección en línea, la miniaturización que permite mediciones en el sitio y una producción mínima de desechos, lo que contribuye a la Química Verde [33]. Por tanto, el desarrollo de este tipo de herramientas para análisis medioambientales sigue siendo un tema dinámico dentro del campo de los sensores, especialmente, cuando se quieren determinar contaminantes en muestras de agua.

El agua está vinculada esencialmente a la vida cotidiana y a nuestra posibilidad de supervivencia como seres humanos. Dentro de las principales fuentes de alteración de aguas y suelos se encuentran los efluentes y desechos de plantas industriales, ya que contienen, entre otros componentes, a los hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPAs). Los HPAs son moléculas que consisten en anillos aromáticos fusionados sin heteroátomos ni sustituyentes [34]. La solubilidad en agua de estos compuestos decrece al ir aumentando el PM y el tamaño de la molécula, con el consiguiente aumento del carácter lipofílico. Basados en sus fuentes de origen se pueden clasificar como biogénicos, pirogénicos o petrogénicos [34]. Las dos fuentes principales de generación de estos contaminantes al medioambiente surgen de la combustión incompleta de carbono contenido en combustibles fósiles para la producción de energía y de la combustión incompleta de desechos [35]. Otras fuentes de origen, que pueden causar niveles elevados de HPAs en algunos alimentos, se encuentran en ciertos procesos tecnológicos y procedimientos de cocción de alimentos [35]. Por lo tanto, la exposición del ser humano a estos contaminantes puede ocurrir no sólo a través del agua, sino también por medio de alimentos, aire y suelos contaminados [36].

Debido a que varios de estos compuestos han sido identificados como carcinógenos y mutagénicos [37, 38], y que la probabilidad de exposición humana es alta, resulta necesario poder identificarlos y establecer métodos para su determinación y cuantificación, junto con la legislación correspondiente. La Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos prioriza a dieciséis HPAs



(Figura 8) como agentes contaminantes [39], destacando al benzo[a]pireno (BaP) como el más tóxico. La Unión Europea y la Organización Mundial de la Salud establecieron una concentración máxima admisible para el BaP de 10 ng/L en agua para consumo humano [40]. Debido a la toxicidad de estos compuestos se han establecido rigurosos métodos para la determinación precisa en diferentes tipos de muestras [41, 42].

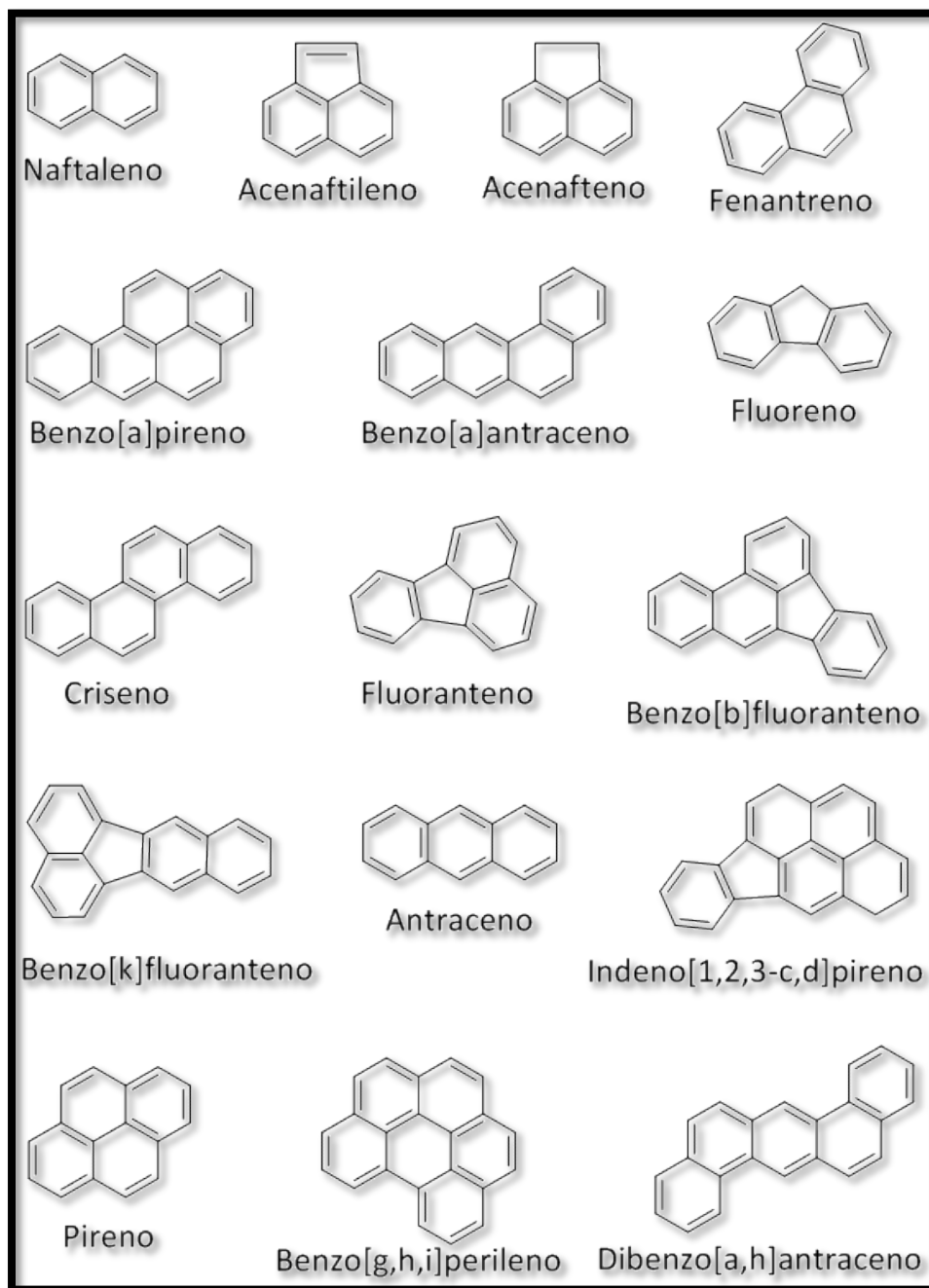


Figura 8. Estructuras de los 16 HPAs considerados como prioritarios por la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos.



El primer problema que se enfrenta cuando se quieren determinar los HPAs en muestras de agua natural son los niveles de concentración muy bajos, debido a su baja solubilidad en agua. Otro problema es la selectividad necesaria de la metodología dado que estos compuestos son estructuralmente similares y suelen encontrarse varios de ellos en una misma muestra [33]. Usualmente, las estrategias analíticas que se aplican incluyen técnicas cromatográficas combinadas con esquemas de detección específicos [43]. Sin embargo, estos métodos no presentan las características deseadas para ser una herramienta sustentable, ya que son relativamente caros, consumen mucho tiempo experimental e incluyen un pre-procesamiento de la muestra, como extracciones líquido-líquido o líquido-sólido [41, 42]. Además, estos procedimientos suelen utilizar grandes cantidades de solventes orgánicos nocivos para el medioambiente, como hexano o diclorometano. En síntesis, los recursos empleados por la mayoría de los métodos informados en la literatura para alcanzar la sensibilidad exigida representan una desventaja para el diseño de controles rutinarios en laboratorios ambientales.

Una técnica analítica sensible, selectiva, rápida y simple que ofrece ventajas en la determinación de contaminantes orgánicos en agua es la espectroscopía de fluorescencia molecular sensibilizada por sensores fluorescentes [44, 45]. La principal ventaja que presenta esta técnica es la mejora en la sensibilidad en varios órdenes de magnitud de los métodos estándar [33, 46]. Un sensor fluorescente es un caso particular de sensor químico, que transforma cualquier información química cuantitativa o cualitativa en una señal fluorescente útil desde un punto de vista analítico [47, 48]. Existen una amplia variedad de sensores fluorescente para diversas aplicaciones y muchos de ellos disponibles comercialmente. Sin embargo, hay una necesidad de seguir desarrollando sensores que, además de mejorar las cifras de mérito analíticas de la metodología, tengan un impacto negativo bajo tanto para el operador como para el sistema ambiental en análisis.

En los últimos años, las técnicas de espectroscopía fluorescente sensibilizada han utilizado principalmente dos tipos de sensores: sólido en polvo (partículas de tamaño pequeño dispersas finamente en una solución o bien en fase sólida); o membranas donde el analito en cuestión queda inmovilizado mediante algún proceso físico o químico [49]. Aunque la emisión de fluorescencia no presente cambios significativos al utilizar un soporte sólido o en solución, el rendimiento cuántico (relación entre número de fotones emitidos y número de fotones



absorbidos) tiende a ser mayor en un soporte sólido. Acoplado un analito potencialmente fluorescente sobre un sensor se limita su movilidad a un ambiente más rígido y se reduce la probabilidad de desactivación no radiante incrementando de esta manera la eficacia cuántica (factor directamente proporcional a la intensidad de fluorescencia). Por tanto, este tipo de espectroscopia presenta un interés analítico notable que permite mejorar el proceso de emisión fotofísico y generar datos multidimensionales (espectros de emisión, de excitación, tiempo de vida, polarización, y otras medidas en simultáneo) con alta resolución [50, 51].

La clave, entonces, de los métodos espectroscópicos de fluorescencia sensibilizada es lograr una adecuada inmovilización del analito para facilitar su emisión fluorescente. Una de las técnicas de inmovilización más utilizadas es la retención del analito sobre una fase sólida a temperatura ambiente. Una vez que el analito es retenido, el fenómeno de fluorescencia se produce a partir de la superficie del sistema, dando como resultado una luminiscencia difusa debido a la dispersión múltiple por partículas en fase sólida. Una forma más simple de lograr la protección del analito es mezclarlo directamente con el sensor (como sólido en polvo) en la muestra. Dentro de esta posibilidad, se pueden mencionar el uso de micelas como agentes estructurantes y el uso de polímeros solubles en agua que dan rigidez a las moléculas de analito.

5.2.1 Estudio de afinidad sobre HPAs

Una motivación clave para el desarrollo de sensores poliméricos de contaminantes fueron los resultados preliminares conseguidos por nuestro grupo de trabajo que demostraron que el copolímero VBT-VPS presenta alta afinidad por el BaP y puede utilizarse para exaltar la luminiscencia nativa de este contaminante. Esta interacción entre el copolímero y el BaP, desconocida hasta el momento, fue el punto de partida. No solo resultó indispensable abordar la problemática experimentalmente, también resultó preciso racionalizar la evidencia experimental mediante un modelo teórico que estudie las posibles interacciones no covalentes existentes entre estas moléculas.

Debido a las características de los compuestos en estudio resultan posibles las interacciones no covalentes del tipo π - π , "stacking", hidrógeno polar- π , etc. Las interacciones hidrógeno- π se clasifican en dos grupos: interacciones hidrógeno no polar- π (H- π) e interacciones hidrógeno polar- π (Hp- π). Este último grupo representa un tipo de interacción diferente en cuanto a su naturaleza física y sus propiedades [52]. Las energías de interacción de Hp- π son mucho más fuertes que las interacciones no polares (H- π), comparables incluso con los enlaces de hidrógeno



[52]. En las interacciones Hp- π , los átomos de hidrógeno polares son los “donantes” y los grupos aceptores son diversas moléculas aromáticas y grupos π -conjugados [52]. Una revisión de la literatura demuestra que las bases heterocíclicas timina, guanina, citosina y adenina son donantes y aceptores en las interacciones Hp- π debido a su aromaticidad y a la presencia de hidrógenos “donantes” [53].

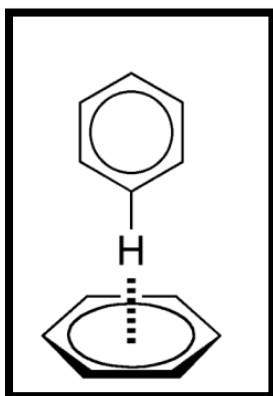


Figura 9. Ejemplo de interacción H- π entre dos bencenos [52].

Además, se sabe que algunas de las propiedades espectroscópicas de los analitos están relacionadas con el carácter hidrófilo o hidrófobo del medio donde están disueltas y con la capacidad para participar en el enlace de hidrógeno del disolvente [51]. Por lo tanto, un cambio de solvente modifica el entorno del sistema y, como consecuencia, se puede favorecer o no la interacción copolímero-BaP y, por ende, la exaltación de fluorescencia. El solvente utilizado, entonces, debe ser una variable a controlar para el desarrollo eficiente de una nueva técnica analítica basada en el uso de sensores fluorescentes.

5.2.2 Cuantificación de HPA

El objetivo fundamental de la química analítica es el desarrollo, optimización y aplicación de metodologías que permitan lograr mediciones químicas de calidad. Para garantizar la calidad de los métodos se establecen un conjunto de números llamados cifras de mérito, los cuales permiten calificar y comparar diversos métodos en cuanto a su eficiencia [54]. Hay diversas cifras de mérito: exactitud, precisión, selectividad, sensibilidad, límite de detección, límite de cuantificación, rangos lineal y dinámicos; sin embargo, dos de ellas cobran relevante importancia en la determinación de este grupo de contaminantes: la sensibilidad (debido a los bajos niveles a detectar) y la selectividad (por la presencia de especies interferentes en las muestras). De acuerdo con la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC), la sensibilidad se define como el cambio en la



respuesta instrumental dividido por el correspondiente cambio en el estímulo (la concentración del analito); y la selectividad, como el grado en que un método puede ser utilizado para determinar analitos particulares en mezclas o matrices sin interferencias de otros elementos de comportamiento similar [55].

Si nos enfocamos en mejorar la selectividad, una herramienta que ha cobrado importancia en los últimos años, dado a que su mayor ventaja radica en mejorar considerablemente esta cifra de mérito, es la quimiometría. En términos generales, la quimiometría tiene como finalidad extraer información de sistemas químicos mediante una combinación adecuada de métodos matemáticos, estadísticos e informáticos [56]. Los beneficios de la quimiometría se hacen importantes cuando la información no se encuentra accesible de una manera directa. Mientras que los métodos analíticos clásicos requieren de una selectividad total para su correcto funcionamiento, los métodos quimiométricos más avanzados son mucho más flexibles, permitiendo obtener buenos resultados analíticos, incluso en condiciones de selectividad parcial [56].

Un tratamiento de datos matemáticos que permite aislar las señales relacionadas con cada analito y separarlas de las interferencias es la calibración de segundo orden [57], concepto que se detallará más adelante en la sección 7 de Teoría. Esta calibración posee una valiosa propiedad, llamada *ventaja de segundo orden* [54], que evita el requisito de tener que eliminar las interferencias o trabajar con un conjunto de muestras de calibración muy grande. La generación de datos para poder aplicar este tratamiento matemático y obtener la información adecuada se realiza mediante varios modos o vías instrumentales. Es más sencillo de entender esta metodología pensando en la forma experimental del trabajo.

Debido a la propiedad luminiscente de la familia de los compuestos a censar (HPAs), los datos para realizar una calibración de estas características pueden obtenerse simplemente a través de matrices de excitación y emisión de fluorescencia (MEEFs). Lo importante a resaltar de la espectrofluorimetría es que puede proporcionar los datos necesarios para un análisis quimiométrico elevado con un solo instrumento. La mayoría de los espectrofluorímetros modernos son capaces de medir MEEF, registrando los espectros de emisión en varias longitudes de onda de excitación. Al planificar la generación de datos, normalmente, se selecciona un rango espectral de emisión adecuado que incluya las longitudes de onda donde se sabe que emiten los componentes de la muestra [58].



Por todas las bondades expuestas recientemente (incluyendo la sencillez operatoria de la técnica de medición y el bajo costo relativo del equipamiento) decanta que la fluorescencia junto con la quimiometría, fueron las herramientas seleccionadas al momento de determinar de manera simultánea más de un contaminante en diversas muestras de agua.

5.2.3 Micelas de copolímero en bloque

Como se introdujo anteriormente, la forma en la que se sintetiza el copolímero determina la ubicación de los monómeros en la cadena principal y las características físicas del polímero. Una de las principales funcionalidades de estos copolímeros al ser sintetizados en bloque (un bloque de poli-VBT unido a otro bloque de poli-VPS, VBT-b-VPS) surge de sus propiedades asociativas en solución como consecuencia de su estructura molecular. Estos presentan la capacidad de formar estructuras micelares donde los bloques hidrofóbicos se asocian para formar un dominio interno denominado núcleo micelar, que es capaz de solubilizar y albergar analitos liposolubles, mientras que los bloques hidrofílicos conforman una corona que se encuentra en contacto directo con el medio externo, usualmente acuoso, estabilizando físicamente la micela [59].

En el año 2011, Kaur y colaboradores reportaron la síntesis en bloque de VBT y el monómero catiónico cloruro de vinilbenciltrietilamonio (VBA). Además, demostraron formar micelas de buena estabilidad debido a los enlaces por puente de hidrógeno de las timinas en el núcleo hidrofóbico, y al foto-entrecruzamiento inducido (también de las timinas) al ser irradiadas con luz UV [29]. Estas micelas, por sus características físico-químicas, son potenciales cápsulas químicas para diversas aplicaciones, tales como surfactantes, nanocápsulas para uso biomédico y agentes removedores de contaminantes orgánicos en agua.

La concentración micelar crítica (CMC) de un sistema dado es una medida de la facilidad de formación de micelas y, por lo tanto, una medición indirecta de la estabilidad de las mismas. Un valor de CMC bajo indica una mayor estabilidad [60], éste puede determinarse mediante varias técnicas. En esta tesis se utilizaron dos métodos espectroscópicos diferentes para determinar el valor.

En uno de los métodos se utiliza como sonda el colorante azul de metileno (AM) el cual presenta espectros de absorción muy característicos y, al tener carga positiva, interacciona con la parte aniónica del copolímero; en efecto, monitoreando los cambios en los espectros de absorción del colorante, como consecuencia de sus interacciones con las micelas y las cadenas de copolímero no ensambladas, se determina la concentración micelar [61]. En el otro método la



CMC se comprueba mediante fluorescencia en solución acuosa empleando una sonda fluorescente, como puede ser el Pireno (Pir). Este compuesto tiene una fuerte fluorescencia en un ambiente no polar, pero en un entorno polar como el agua, el apagamiento de la fluorescencia es notable. Por lo tanto, un cambio en la matriz del sistema inducirá un cambio en la intensidad de emisión de fluorescencia de la sonda, propiedad que se monitorea y utiliza para determinar la CMC [60].

5.2.4 Copolímeros sobre soporte sólido

Uno de los beneficios principales de contar con un sensor portátil radica en el hecho de poder realizar la detección en línea y en el sitio de los contaminantes, sin necesidad de almacenar ni trasladar la muestra, reduciéndose considerablemente el tiempo de análisis. Tener un dispositivo sencillo de portar y trasladar simplifica las mediciones rutinarias en muchas industrias sin tener que recurrir a la determinación en el laboratorio. Consecuentemente, para avanzar en el desarrollo del sensor químico como un dispositivo portátil, el primer paso fue explorar la posibilidad de tener una sonda portable. Por lo tanto, se traslada el sistema de estudio (polímero/contaminante) a una superficie sólida, en la cual el copolímero sea capaz de adherirse, para luego inmovilizar y cuantificar los contaminantes.

Una motivación para la construcción del sensor portátil fue el trabajo publicado, por Trakhtenberg y otros autores, demostrando que es posible inmovilizar copolímeros de VBT-VPS formando películas delgadas (*coating*) sobre tereftalato de polietileno (PET) como sustrato [27]. Otro aporte significativo provino de todo lo aprendido: en el uso del copolímero en la técnica de *fotolitografía* y en el estudio de la *cinética de foto-entrecruzamiento*.

5.2.4.1 Fotolitografía

La fotolitografía es el proceso por el cual se utilizan métodos ópticos para transferir patrones de circuito de imágenes maestras o máscaras a sustratos. Los enfoques tradicionales para el desarrollo de los circuitos integrados (estructuras de dimensiones pequeñas de material semiconductor sobre la que se fabrican circuitos electrónicos) implican la obtención de pequeñas piezas a bajo costo, sin tener en cuenta la toxicidad de los materiales utilizados o fabricados.



Para el proceso de transferencia de máscaras a sustratos u obleas, éstas se recubren con un material fotosensible llamado fotorresistor, que cambia su solubilidad después de la exposición a la luz a través de una máscara apropiada de material opaco. Esto permite la irradiación selectiva transfiriéndose el patrón de la máscara al sustrato. Después de la irradiación, la oblea recubierta con el fotorresistor o resina fotosensible se introduce en una solución de revelado que elimina selectivamente la capa de resistor de las zonas no expuestas, dando como resultado una oblea con la superficie semiconductora parcialmente protegida por el resistor [62]. En los pasos subsiguientes, las áreas no protegidas se modifican, por ejemplo, por grabado químico, mientras que las áreas protegidas permanecen intactas. Por último, la resina fotosensible restante se remueve de la oblea, que ahora cuenta con un patrón idéntico al de la máscara [63]. La Figura 10 representa esquemáticamente el proceso descrito.

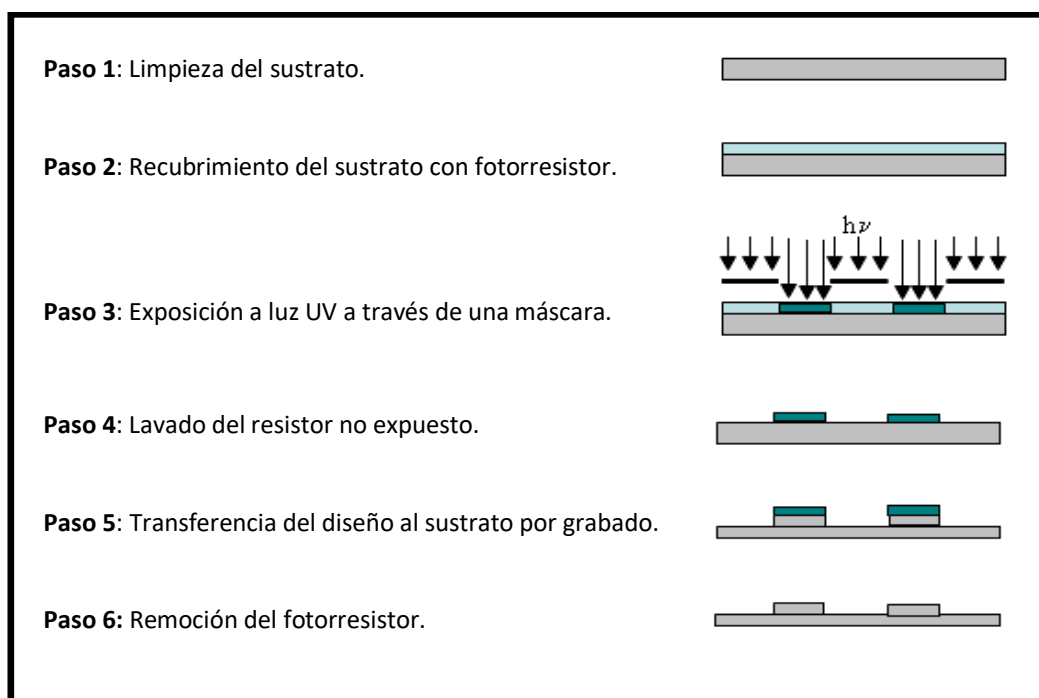


Figura 10. Descripción del proceso de fotolitografía.

Como se demostró en un trabajo previo [64], los fotopolímeros de VBT-VPS resultaron ser una alternativa sustentable en la fotolitografía dado que son ambientalmente más benignos que los fotorresistores usados habitualmente. Al copolimerizar el monómero de VBT con el monómero iónico VPS fue posible trabajar con soluciones acuosas que se sometieron a una reacción de fotodimerización de las timinas a niveles bajos de irradiación UV. En respuesta a la irradiación, se produjo la inmovilización del copolímero en una variedad de sustratos y, debido a la solubilidad



lograda en agua, las regiones no expuestas a la luz UV se eliminaron simplemente por lavado acuoso [27]. Para visualizar los *films* translúcidos de copolímero foto-inmovilizado se utilizó una solución de un colorante de carga opuesta al monómero iónico. El colorante fue adsorbido selectivamente sobre las cargas del copolímero entrecruzado, proporcionando un claro contraste con las regiones que no reaccionaron, y la cantidad de colorante adsorbido se monitoreó mediante espectroscopia UV-Vis [64, 65, 66].

5.2.4.2 Caracterización de la cinética de entrecruzamiento

Como introdujimos anteriormente, caracterizar la cinética de la reacción que permite que los copolímeros queden inmovilizados sobre sustratos es indispensable para el posterior desarrollo del sensor químico portátil.

Haciendo un recorrido bibliográfico se encontró que la cinética de la reacción de entrecruzamiento o curado para diferentes copolímeros de VBT y el monómero catiónico VBA es de segundo orden con respecto a la concentración de timina. Los autores determinaron esta cinética mediante espectroscopia UV-Vis [24]. Sin embargo, la complejidad de las señales espectroscópicas de nuestros sistemas, debido a la presencia de impurezas o especies interferentes no relevantes para el proceso de curado, dificultó el análisis. Para solucionar este inconveniente se utilizó nuevamente la quimiometría.

Durante los últimos años, el avance en los tratamientos de datos matemáticos permitió que se desarrollen metodologías basadas en mediciones directas sobre muestras sólidas sin necesidad de pre-tratamientos químicos y libres de disolventes [67, 68]. Estos nuevos tratamientos de datos presentan la capacidad de discriminar matemáticamente las señales relacionadas con cada especie que aportan a la respuesta instrumental. Una de estas metodologías es la resolución multivariada de curvas asistida por cuadrados mínimos alternantes (MCR-ALS) [69].

Haciendo uso de la *ventaja de segundo orden* mencionada anteriormente (sección 5. 2. 2), Bortolato y otros autores [70], lograron definir el mecanismo de reacción del entrecruzamiento de copolímeros de VBT-VBA mediante espectroscopia de FT-IR, identificando los principales parámetros asociados y las constantes de velocidad de equilibrio. Incluso lograron la cuantificación de todas las especies en presencia de un compuesto interferente. A pesar de los excelentes resultados obtenidos, el método desarrollado tiene desventajas significativas que lo hace poco atractivo desde un punto de vista analítico. Tiene una baja sensibilidad que requiere una gran



cantidad de muestra para un resultado medible, utiliza un soporte sólido de oro muy costoso, requiere tiempo prolongado por cada muestra y extremo cuidado en el manejo de las mismas. Por lo tanto, desde la perspectiva de la química analítica verde fue necesario desarrollar un nuevo procedimiento para caracterizar esta reacción, en concordancia con el enfoque de este nuevo paradigma [71].

Aprovechando que la timina tiene un espectro de fluorescencia conocido [72] y que esta técnica de espectroscopia permite una descripción detallada de estructuras desconocidas que combina selectividad, sencillez y sensibilidad, es posible estudiar la cinética de curado de copolímeros de VBT y VPS sobre *films* de PET mediante espectroscopia de fluorescencia. El soporte sólido elegido, PET, presenta ventajas y desventajas. La principal desventaja es que tiene señales fluorescentes en las mismas regiones espectrales que la timina [73, 74, 75]. Por lo tanto, podía no ser suficiente la selectividad espectral de esta técnica y no alcanzarse la caracterización de las especies involucradas en el proceso, inconveniente que puede superarse al combinar la técnica de espectroscopia de fluorescencia con la ventaja de segundo orden quimiométrico, empleando el algoritmo MCR-ALS.

Para aplicar este algoritmo es necesario que los datos tengan una estructura bilineal, lo que significa que la matriz de datos experimentales (matriz de intensidades de fluorescencia) debe expresarse como un producto de dos matrices, una matriz de concentración por una matriz que contenga la señal sin procesar de las especies existentes [76]. Esta condición se cumple en la mayoría de las técnicas espectroscópicas, en consecuencia, mediante la descomposición de las matrices de datos que se generan en el seguimiento de una reacción, es posible identificar la evolución de cada especie con su correspondiente espectro puro. Además, el modelo facilita la obtención de información acerca de la evolución de cada especie sin entender previamente el mecanismo de reacción ni su cinética [77], y al utilizar dos estrategias diferentes de procesamiento de datos se pueden determinar todas las especies involucradas en el proceso junto con sus concentraciones y espectros absolutos, además de las constantes cinéticas.



OBJETIVOS



6- OBJETIVOS

6.1 OBJETIVO GENERAL

Contribuir al desarrollo de tecnologías alternativas, como es el caso de un sensor químico, para la detección de contaminantes en aguas, trabajando bajo el paradigma de la Química Verde.

6.2 OBJETIVOS PARTICULARES

Investigar las propiedades de retención de nuevos soportes sólidos y su habilidad para extraer, concentrar y exaltar las señales luminiscentes de los analitos estudiados, identificando las variables fisicoquímicas que modifiquen la interacción analito-soporte y la intensidad de señales fluorescentes.

Desarrollar y validar métodos analíticos basados en la inducción de luminiscencia y otras técnicas espectroscópicas, en combinación con el modelado quimiométrico, para su aplicación en la detección, monitoreo y control de hidrocarburos aromáticos policíclicos (HPAs) en matrices de interés: efluentes y desechos industriales, aguas subterráneas y superficiales.



TEORÍA



7- TEORÍA

La finalidad de este capítulo es facilitar la comprensión de las herramientas más complejas utilizadas durante el desarrollo de la tesis, las cuales fueron el *modelado molecular* y la *quimiometría*.



7.1 MODELADO MOLECULAR

El modelado molecular es un término general que engloba métodos teóricos y técnicas computacionales para modelar y predecir el comportamiento de las moléculas. La química computacional simula tanto estructuras químicas como reacciones y se basa en fundamentos de leyes físicas. En definitiva, los cálculos computacionales permiten una mayor aproximación a un fenómeno químico, que realizando solamente las pruebas experimentales [78].

Hay dos grandes áreas dentro de la química computacional dedicadas a las estructuras moleculares y su reactividad: los *mecanismos moleculares* y la *teoría de la estructura electrónica*. Las simulaciones de los *mecanismos moleculares* utilizan las leyes clásicas de la física para predecir estructuras y propiedades de moléculas. En cambio, los métodos de *estructura electrónica* utilizan principalmente las leyes de la mecánica cuántica como bases de sus cálculos [78].

Con el objetivo de reducir el tiempo en los cálculos computacionales el estudio teórico comenzó con un modelo simplificado del sistema, buscando la interacción de una única molécula de VBT con una molécula de BaP. El modelo definitivo involucró a un copolímero formado por 4 moléculas de VBT y 4 moléculas de VPS con una molécula de BaP (Figura 11).

Tanto para el modelo simplificado como para el definitivo, inicialmente se generaron un gran número de geometrías (hasta 100) utilizando el módulo de búsqueda conformacional del programa Hyperchem mediante el método de mecánica molecular MM+ [79]. Las estructuras seleccionadas fueron finalmente optimizadas mediante el intercambio de correlación funcional M06-2X junto con el conjunto de bases 6-31+G(d,p) [80], utilizando el método híbrido ONIOM (M06-2x/6-31+G (d,p):uff).

Esta metodología híbrida permite aproximar el cálculo de un sistema real de muchos átomos modelando sólo una pequeña cantidad de átomos centrales con un nivel elevado de teoría (M06-2x/6-31+G (d,p), nivel alto), que luego, se acopla con el cálculo del resto del sistema, el que se realiza con un nivel de teoría inferior (uff, mecánica molecular). La energía del sistema real al nivel de teoría superior se calculó de la siguiente manera:

$$E_{(\text{ONIOM,real})} = E_{(\text{DFT,modelo})} + E_{(\text{MM+,real})} - E_{(\text{MM+,modelo})}$$

El fragmento a modelar con el nivel elevado de teoría consistió en la molécula de BaP más un anillo de timina de la cadena polimérica como se resalta en la Figura 11.



Todas las optimizaciones geométricas ONIOM se realizaron en solución calculando el campo de reacción por separado en cada sub-cálculo y utilizando siempre la cavidad del sistema real [81]. Los disolventes utilizados fueron Acetonitrilo (ACN, $\epsilon = 35.69$), Dimetilsulfóxido (DMSO, $\epsilon = 46.83$), Diclorometano (DCM, $\epsilon = 8.93$) y Tolueno (Tol, $\epsilon = 2.37$). Finalmente, se realizaron cálculos de frecuencia para verificar la naturaleza de los puntos estacionarios (es decir, para no encontrar frecuencias imaginarias).

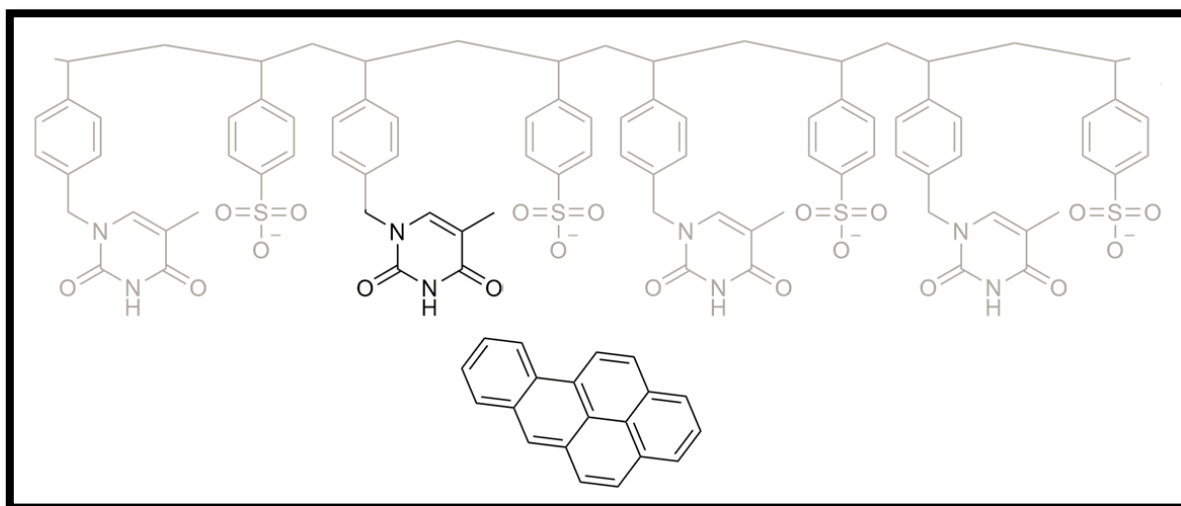


Figura 11. Estructura del modelado molecular definitivo: VBT:VPS 4:4 y BaP. Las estructuras resaltadas son las modeladas con un nivel superior de teoría.



7.2 QUIMIOMETRÍA

En términos generales, la quimiometría tiene como finalidad extraer información de los sistemas químicos mediante una combinación adecuada de matemática, estadística e informática. Por lo general, se aplica para resolver problemas químicos que pueden clasificarse como descriptivos o predictivos. En aplicaciones descriptivas el objetivo es aprender las relaciones y la estructura subyacentes del sistema en estudio. En las aplicaciones predictivas el énfasis está en predecir cierta característica de alguna de las especies del sistema. La calibración analítica pertenece a este último tipo de problemas, donde la propiedad de interés es típicamente la concentración de uno o más analitos seleccionados en una muestra [58].

La calibración, según la definición de la IUPAC, es una operación que relaciona una cantidad de salida con una cantidad de entrada para un sistema de medición bajo condiciones dadas. Las cantidades de entrada en la calibración analítica son las concentraciones de un analito de la muestra, mientras que las cantidades de salida son las señales analíticas o respuestas entregadas por instrumentos analíticos. Por tanto, en este contexto, calibración significará la operación de relacionar señales instrumentales con concentraciones de analitos [58].

La calibración en la analítica clásica se conoce como *calibración univariada*, porque se basa en la medición de un solo dato experimental para cada muestra. En cambio, en la *calibración multivariada* se miden varios datos para cada muestra experimental. En muchos de estos casos el analista mide un espectro para cada muestra, es decir, un conjunto de números que se pueden organizar en forma de un vector. Pero esto no queda acá... existe la posibilidad de medir datos que se pueden agrupar en objetos matemáticos más complejos que un vector para cada muestra como una matriz o un arreglo tridimensional (Figura 12) [56].

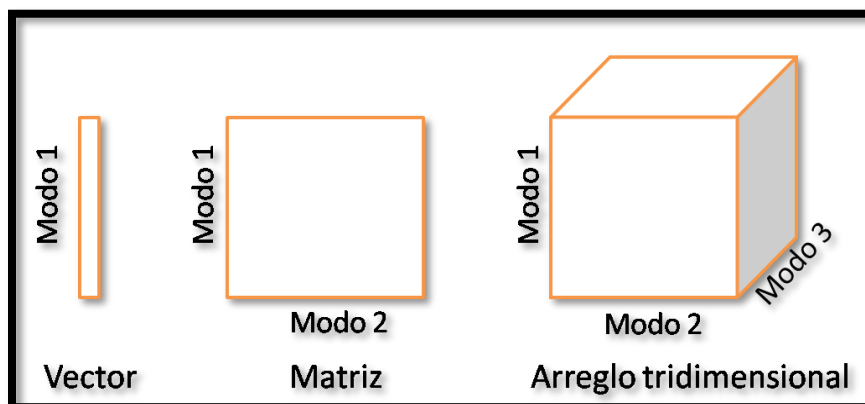


Figura 12. Diferentes objetos de complejidad creciente que pueden construirse con las mediciones de una muestra, con sus diferentes modos instrumentales [58].



Algebraicamente hablando, un escalar es un objeto de orden cero, un vector es uno de primer orden y una matriz es un objeto de segundo orden. Existe una nomenclatura para las diferentes calibraciones, basada en la medición de datos de varios órdenes, para una *sola muestra*: la calibración de orden cero es equivalente a la calibración univariada; la calibración multivariada de primer orden es equivalente a la calibración con datos vectoriales por muestra; la calibración multivariada de segundo orden es equivalente a una calibración con arreglo de datos de matriz por muestra; y la calibración multivariada de tercer orden es equivalente a una calibración con arreglos de datos tridimensionales por muestra [58].

Por otro lado, cuando contamos con datos de un *grupo de muestras* es posible crear un arreglo que tenga un modo adicional. Por este motivo hay una nomenclatura alternativa, dónde las calibraciones se nombran de acuerdo a la cantidad de vías (modos) de un arreglo de datos para un conjunto de muestras (Figura 13) [58].








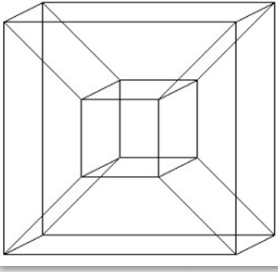
	Orden cero	Primer orden	Segundo orden	Tercer orden
Una muestra	Escalar 	Vector 	Matriz 	Arreglo tridimensional 
Un grupo de muestras	 Una vía	 Dos vías	 Tres vías	 Cuatro vías

Figura 13. Ilustración que muestra las diferentes nomenclaturas respecto a la jerarquía de datos para una muestra o un grupo de muestras [58].

Hay varias ventajas en la realización de la calibración analítica de múltiples vías. En la calibración de primer orden (o dos vías) la ventaja es que existe un indicador estadístico que muestra cómo se ajustan los datos de la muestra experimental a la calibración. Si los datos no se ajustan bien, las muestras se marcan como valores atípicos, lo que indica que sus composiciones



difieren de las de las muestras representativas empleadas para la calibración. A esta propiedad se la llama "*ventaja de primer orden*". En la calibración de segundo orden o tres vías, aparece la "*ventaja de segundo orden*", que se basa en el hecho de que los analitos se pueden determinar en presencia de componentes inesperados (interferencias) en las muestras [58].

El objetivo principal en el análisis de un sistema químico empírico es buscar información útil a partir de datos experimentales crudos e identificar el número de componentes químicos presentes. Para lograr el mismo se utilizaron dos metodologías diferentes de calibración multivariada. Para la determinación de dos analitos en simultáneo (BaP y Pir) se utilizó el modelo de análisis paralelo de factores (PARAFAC); y, para estudiar la cinética de reacción de foto-entrecruzamiento se utilizó la resolución multivariada de curvas acoplada a cuadrados mínimos alternantes (MCR-ALS).

7.2.1 PARAFAC

PARAFAC es, en esencia, un método de descomposición que puede interpretarse conceptualmente como un análisis de componentes principales para datos de múltiples vías. Para el caso particular de datos de tres vías logra una descomposición única de los datos con arreglos tridimensionales, permitiendo que se resuelvan las concentraciones y los perfiles espectrales de cada componente en una muestra. El primer paso es construir un arreglo de tres vías, **M**, de dimensiones $I \times J \times K$ para cada matriz de excitación y emisión de fluorescencia (MEEF) donde I , J y K son el número de muestras, el número de longitudes de onda de emisión y el número de longitudes de onda de excitación, respectivamente. El algoritmo trata de descomponer la matriz **M** en tres matrices de componentes principales: **A** (*scores*), **B** y **C** (*loadings*) cada una con sus respectivos elementos a_{in} , b_{jn} y c_{kn} , donde n indica el número de componente de acuerdo con la notación más utilizada. Se llama componente principal a cada *loading*, a cada *score*, y a cada par *loading/score*. Según este modelo, cada uno de los elementos de **M** viene dado por la siguiente expresión:

$$m_{ijk} = \sum_{n=1}^N a_{in} b_{jn} c_{kn} + e_{ijk} \quad \text{Ecuación 7.1}$$

donde m_{ijk} es la intensidad de fluorescencia para cada muestra i a la longitud de emisión de onda j y a la longitud de excitación k ; y e_{ijk} indica un elemento de la matriz **E**, que reúne la variabilidad no estimada por el modelo. Cada conjunto de datos de MEEF se ajusta de acuerdo con la Ecuación 7.1 mediante un procedimiento de cuadrados mínimos alternantes. Las salidas del modelo se



estructuran de la siguiente manera: para un dado componente n , los elementos a_{in} , b_{jn} y c_{kn} están dispuestos en un vector *score* \mathbf{a}_n donde cada elemento es directamente proporcional a la concentración en cada muestra, y en los vectores *loading* \mathbf{b}_n y \mathbf{c}_n que estiman los perfiles de emisión y excitación respectivamente [82].

El inicio del algoritmo generalmente se realiza con los mejores perfiles obtenidos después de 10 corridas de un máximo de 80 iteraciones. Como restricción al modelo se aplicó la no negatividad tanto en la concentración como en los modos espectrales de la matriz de datos de tres vías, lo cual permitió obtener resultados físicamente interpretables. El número de componentes responsables de la señal analítica (el índice n en la Ecuación 7.1) se definió evaluando la desviación estándar residual del ajuste de cuadrados mínimos alternantes, valor que se estabiliza cuando se alcanza el número correcto de componentes [58]. La cuantificación del analito se realizó mediante la construcción de una línea de calibración pseudo-univariada con los *scores* del analito en las muestras de calibración y luego interpolando el score del analito en la muestra de prueba. Si bien hubo ambigüedades en las salidas del modelo, estos inconvenientes se resolvieron al comparar los perfiles de emisión o excitación individuales con cada estándar.

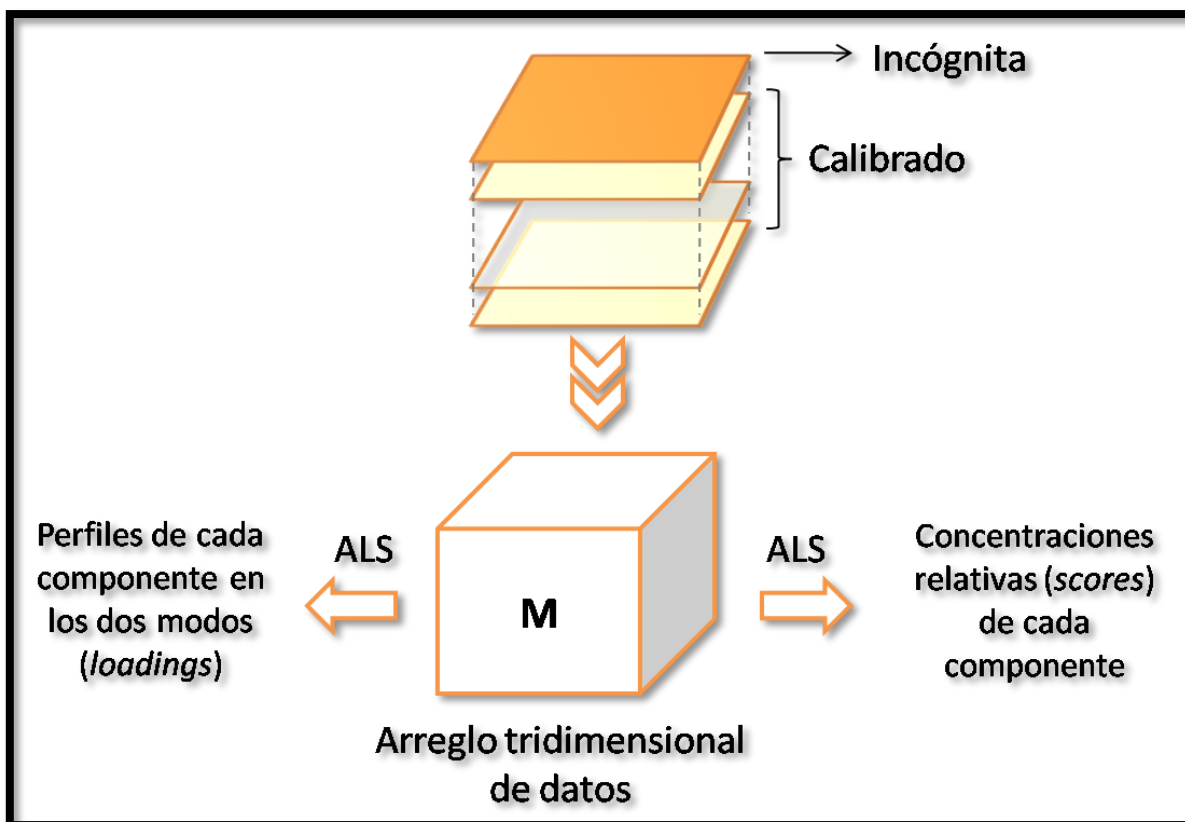


Figura 14. Representación gráfica del modelo PARAFAC para datos de segundo orden. Las matrices de datos para cada una de las muestras de calibración se ubican junto con la muestra que se desea determinar formando un arreglo de tres vías, que se analiza manteniendo la estructura original de los datos.

7.2.2 MCR-ALS

El algoritmo MCR-ALS proporciona un modelo lineal de las contribuciones de los componentes individuales a través de las mediciones experimentales crudas, descomponiendo matemáticamente la respuesta obtenida en contribuciones puras debido a cada componente del sistema [69, 76, 77]. La estructura de la matriz del modelo de MCR-ALS es siempre la misma, independientemente del número de vías o modos instrumentales en que se consideran los datos. Sin embargo, aumentar el número de vías permite acceder a más información sobre el sistema en estudio, dado que para los sistemas no selectivos esta estrategia puede aumentar la selectividad de las especies, al menos en sentido matemático [77]. A diferencia de otros algoritmos, con este modelo no hay necesidad de contar previamente con información química o física para analizar el conjunto de los datos [76]. Sin embargo, la información inicial obtenida a partir del análisis instrumental tiene una influencia positiva en la resolución del sistema, y se puede utilizar para construir buenas estimaciones iniciales de los perfiles de concentración y respuestas.



El modelo MCR-ALS transforma una matriz de datos, habitualmente llamada **D**, en el producto de dos matrices de datos, **C** y **S^T** (con el superíndice “**T**” se denomina la transpuesta de una matriz). Cada una de ellas incluye los perfiles de respuesta puros de los *N* componentes químicos, pero **C** reúne información sobre la concentración de los mismos y **S** sobre sus espectros. En notación matricial, la expresión general para este modelo es:

$$\mathbf{D} = \mathbf{C} \mathbf{S}^T + \mathbf{E} \quad \text{Ecuación 7. 2}$$

Donde **D** (*R* × *C*) es la matriz de datos originales, **C** (*R* × *N*) y **S^T** (*N* × *C*) son las matrices que contienen los perfiles puros de respuesta relacionados con la variación de los datos; y **E** es la variación residual del conjunto de datos que no está relacionado con ninguna contribución química. Cuando la matriz **D** se genera a partir de varias muestras, se conoce como matriz de datos 'aumentada', dado que tal matriz se construye colocando todas las matrices individuales adyacentes (cada matriz de cada muestra contigua a la otra).

En este trabajo, el significado de *R* y *C* se estableció de acuerdo a la estrategia quimiométrica empleada. Para un enfoque de tres vías, *R* contiene los perfiles fusionados de excitación-tiempo (perfil aumentado, en la terminología de MCR-ALS) de las *N* especies que participan en todos los experimentos, y *C* representa los espectros de emisión relacionados con las *N* especies. En los casos analizados, la matriz **D** tenía las siguientes dimensiones para cada arreglo de tres vías (por ejemplo, para una composición determinada de VBT-VPS): *JL* filas (*J* tiempos de irradiación, *L* longitudes de onda de excitación) × *K* columnas (*K* longitudes de onda de emisión), como se muestra en la Figura 15.

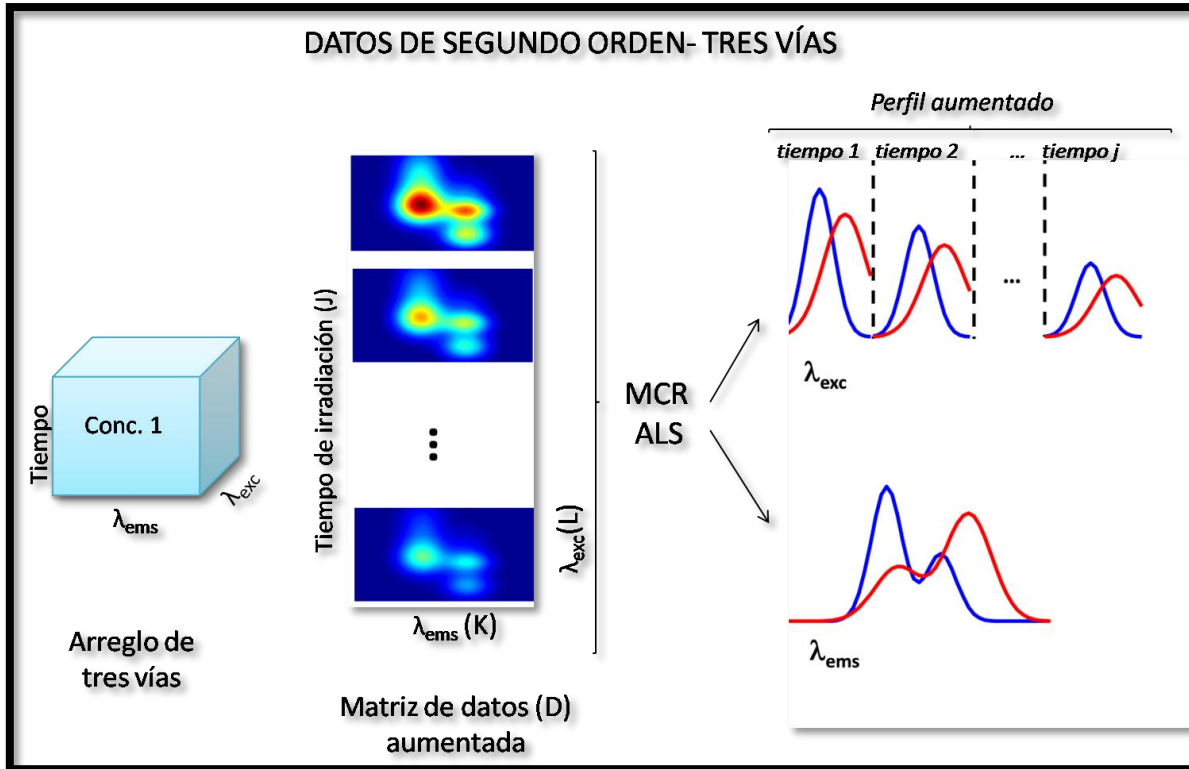


Figura 15. Metodología MCR-ALS para tres vías.

Sin embargo, es posible aumentar el número de vías instrumentales para generar un método quimiométrico de tercer orden (a los modos tiempo-excitación se agrega intensidad de emisión). Para implementar MCR-ALS en este modelo, es obligatorio vectorizar los datos originales de tercer orden en matrices, y luego disponerlos en una matriz lineal 'súper-aumentada' [83]. Por lo tanto, las MEEFs medidas a diferentes tiempos de irradiación para cada composición del copolímero VBT-VPS, son un ejemplo original de datos de cuatro vías. Estas 4 vías son tiempos de irradiación, espectros de excitación, espectros de emisión y composiciones del copolímero.

Cada MEEF ($L \times K$), donde L y K son el número de longitudes de onda de excitación y emisión respectivamente, se obtuvo midiendo la fluorescencia después de irradiar los copolímeros VBT:VPS_m de diferente composición (con $m = 1, 4, 8, 16$ o 32). Este procedimiento se repitió cada cinco min desde 0 a 180 min sumando un total de 37 veces (J). Una vez que se obtuvieron las 37 MEEFs para cada muestra, se organizaron los datos para el posterior análisis mediante MCR-ALS. En primera instancia se vectorizó cada MEEF generando un vector fila de dimensiones ($1 \times LK$). Luego, se construyó una matriz de tamaño ($J \times LK$) para cada muestra, y una matriz de datos **D** súper-aumentada de tamaño ($Jl \times LK$), siendo l el número de muestras analizadas. Como corolario



del trabajo, quedan definidos los índices R (o JI) y C (o LK) de la Ecuación 7.2 para un contexto de 4 vías.

Después de construir la matriz súper-aumentada, y de acuerdo con la Ecuación 7.2, el análisis de MCR-ALS genera: una matriz de concentración aumentada (\mathbf{C}) que contiene los perfiles de tiempo de irradiación puro para cada muestra en todas las JI fracciones de los N componentes resueltos, una matriz (\mathbf{S}^T) de los perfiles puros MEEF vectorizados para los N componentes, y una matriz residual (\mathbf{E}) que contiene el ruido y el fondo sin resolver. La matriz \mathbf{S}^T se puede reconfigurar en N diferentes MEEFs (de tamaño $L \times K$, una por cada componente) y utilizarse para la identificación de los componentes. Por otro lado, las áreas bajo los perfiles de los tiempos de irradiación correspondientes a cada muestra (*scores*, en terminología quimiométrica) se utilizan con fines cuantitativos. En consecuencia, se obtiene una matriz ($J \times N$) por cada muestra y la información de la concentración en \mathbf{C} se utiliza para construir un gráfico univariado mediante el trazado de los *scores* en función de la concentración nominal de los componentes. Por lo tanto, el *score* de la concentración de cada componente para la i -ésima muestra se puede definir mediante la siguiente ecuación:

$$a(i, n) = \sum_{j=1+(i-1)J}^{ij} \mathbf{C}(j, n) \quad \text{Ecuación 7.3}$$

donde $a(i, n)$ es el *score* para el componente n en la muestra i .

La Figura 16 presenta gráficamente todo el procedimiento utilizado para analizar los datos de cuatro vías con MCR-ALS.

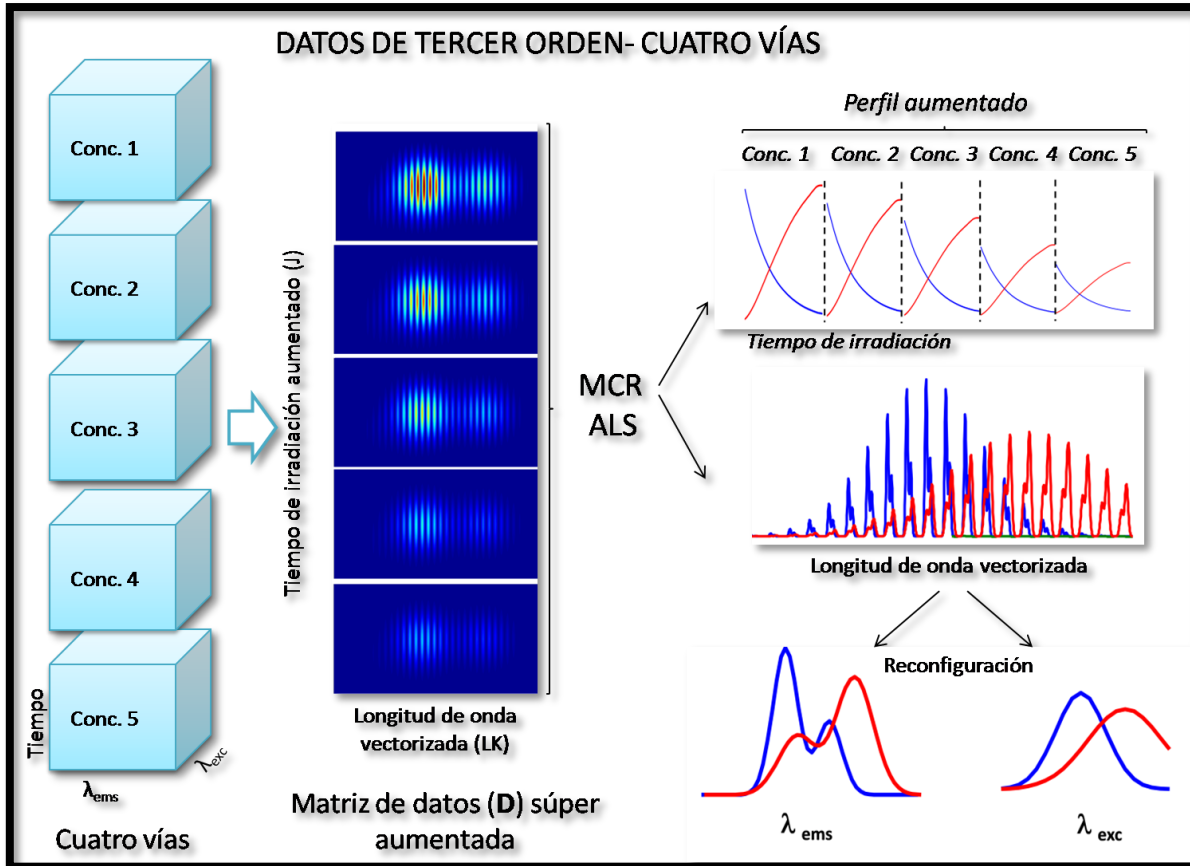


Figura 16. Metodología MCR-ALS para cuatro vías.

Finalmente, para evaluar el desempeño de ambos modelos utilizados MCR-ALS por tres o cuatro vías, se comparó los valores de selectividad (SEL) encontrados por el algoritmo en ambos casos. Se utilizó la siguiente expresión [84] para definir la selectividad:

$$SEL = [(S^T S)^{-1}_{nn}]^{-1/2} \quad \text{Ecuación 7.4}$$

donde el elemento (n, n) indica el analito de interés, S^T contiene los perfiles de todos los componentes de la muestra en la dirección no aumentada (es decir, los espectros de emisión en el caso de tres vías, o los espectros de excitación-emisión vectorizados en el caso de cuatro vías) y el superíndice "-1" significa inversión de la matriz.



SECCIÓN EXPERIMENTAL



8- SECCIÓN EXPERIMENTAL

Reactivos y materiales:

Todos los reactivos se adquirieron en el mayor grado de pureza posible y se utilizaron cómo se recibieron. A continuación se detallan, indicando entre paréntesis la procedencia de los mismos.

- 2,2'-azobis (2-metilpropionitrilo), AIBN, (Sigma-Aldrich S. A., Buenos Aires, Argentina).
- (2, 2, 6, 6-tetrametilpiperidin-1-il)oxil, TEMPO, (Sigma-Aldrich S. A., Buenos Aires, Argentina).
- Acenaftileno, ACN (Sigma-Aldrich, Milwaukee, EE.UU.)
- Acetona (Cicarelli, Buenos Aires, Argentina).
- Acetonitrilo, ACN (Sigma-Aldrich S. A., Buenos Aires, Argentina).
- Agua miliQ.
- Antraceno, ANT (Sigma-Aldrich, Milwaukee, EE.UU.).
- Azul de metileno, AM (Sigma-Aldrich S.A., Buenos Aires, Argentina).
- Benzo(a)pireno , BaP (Sigma-Aldrich, Milwaukee, EE.UU.).
- Diclorometano, DCM (Sigma-Aldrich S. A., Buenos Aires, Argentina).
- Dimetilsulfóxido, DMSO (Sigma-Aldrich S. A., Buenos Aires, Argentina).
- Etilenglicol (Sigma-Aldrich S. A., Buenos Aires, Argentina).
- Fosfato de potasio dibásico (Cicarelli, San Lorenzo, Argentina).
- Fosfato de potasio monobásico (Cicarelli, San Lorenzo, Argentina).
- Fosfato dibásico de sodio (Sigma-Aldrich S. A., Buenos Aires, Argentina).
- Hexano (Sigma-Aldrich S. A., Buenos Aires, Argentina).
- Isopropanol (Cicarelli, Buenos Aires, Argentina).
- Membrana semipermeable (Spectra/Por, Sigma-Aldrich S. A., Buenos Aires, Argentina).
- Metabisulfito de sodio (Sigma-Aldrich S. A., Buenos Aires, Argentina).
- Metanol (Sigma-Aldrich S. A., Buenos Aires, Argentina).
- Persulfato de potasio (Sigma-Aldrich S. A., Buenos Aires, Argentina).
- PET hidrófilo, PET-X4C1 (Dupont, EE.UU.).
- Pireno, Pir (Sigma-Aldrich, Milwaukee, EE.UU.).
- Poli (estireno sulfonato) de sodio, PPS (Jordi Labs LLC, EE.UU.).



- Sulfato de sodio (Sigma-Aldrich S. A., Buenos Aires, Argentina).
- Tolueno, Tol (Sigma-Aldrich S. A., Buenos Aires, Argentina).
- 1-(4-vinilbencil) timina, VBT (síntesis previa).
- Vinilfenilsulfonato de sodio, VPS (Fluka, Buenos Aires, Argentina).

Equipamiento instrumental

Se utilizó todo el material y las instalaciones disponibles del laboratorio de Tecnología Química de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas (Rosario, Argentina) donde se realizó el trabajo experimental.

- Analizador elemental de Carbono, Hidrógeno y Nitrógeno de combustión LECO CN 628 (Leco Corporation, EE.UU.)
- Balanza analítica (Ohaus Pioneer PA-214).
- Columna y pre-columna (Jordi Gel DVB Sulf+) para cromatografía por exclusión de tamaño.
- Columna Zorbax SB C18 (tamaño medio de partícula 5 μm , 150 mm x 4,6 mm diámetro interno).
- Cromatógrafo líquido de alta eficiencia (Thermo Scientific 3000-series) con bomba cuaternaria (Dionex UltiMate 3000) y detector de arreglo de diodos (UV-Vis DAD).
- Cromatógrafo líquido de alta eficiencia (Milford, MA, EE.UU.) con bomba 515 HPLC Waters, y un detector de fluorescencia.
- Equipo de dispersión dinámica de luz (DLS SZ-100) Nanoparticle Analyzer HORIBA Scientific.
- Espectrofluorímetro (Varian Cary Eclipse, Agilent, EE.UU.) con lámpara de flash de xenón.
- Espectrofotómetro Jasco V-630 UV-VIS (Jasco Inc., EE.UU.).
- Espectrofotómetro Spectronic Genesys (Thermo Electron Corporation, EE.UU.).
- Espectrómetro digital de Resonancia Magnética Nuclear (300 MHz) Bruker Avance 1.
- Espectrómetro de luminiscencia Perkin-Elmer LS-55 (Waltham, MA, EE.UU.) con lámpara de flash de xenón.
- Estufa (Tecnodalvo).



- Lámpara de mano de luz UV (Spectroline UL, Modelo ENF 260c, Spectronics Corporation Westbury, EE.UU.). Figura 17.
- Micropipetas (Gilson Microman M-10, M-100, M-1000).
- Microscopio electrónico de barrido (Leitz SEM AMR 1600T).
- PC INTEL Core i5.
- pH-metro (Altronix EZDO-PC).
- Sonificador (Cole – Parmer 8890).
- Varillas recubiertas de alambre para revestimientos (RDS Corp., Webster, EE.UU.).
Figura 18.



Figura 17. Lámpara UV de mano utilizada en las irradiaciones ($\lambda=254$).

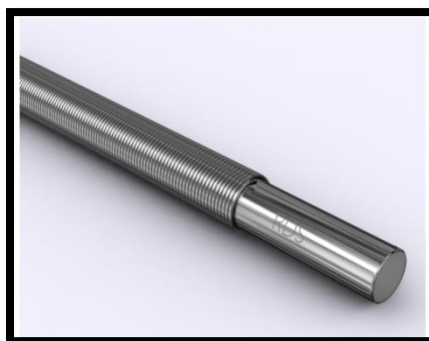


Figura 18. Varilla para revestimientos. Figura obtenida de <http://www.rdspecialties.com/wirewoundrods.html>



8.1 BIOPOLÍMEROS

8.1.1 Síntesis de polímeros

Como ya se discutió en la sección 5.1.2 de la Introducción, las condiciones de cada síntesis de copolímeros determinaron la estructura macromolecular (proporción de monómeros), las propiedades físicas (foto-reactividad y solubilidad) y el tipo de copolímero (azar o en bloque). A continuación, se detallan las síntesis realizadas.

8.1.1.1 Síntesis del monómero VBT

El monómero de VBT se sintetizó a partir de timina y cloruro de 4-vinilbencilo como se reporta en la bibliografía [18].

8.1.1.2 Síntesis de copolímeros VBT-VSP de diversas proporciones

Las síntesis al azar de copolímeros de VBT, con diversas proporciones del monómero aniónico VPS (Figura 19), se realizaron utilizando un proceso de polimerización por crecimiento de cadena mediante radicales libres. Para estudiar mejor el comportamiento del sistema, la manera de interactuar con los contaminantes y la reacción de entrecruzamiento entre timinas, fue necesario contar con copolímeros que variasen la concentración de timina en su estructura. Para conseguirlo se sintetizaron diferentes proporciones de copolímeros $VBT_n:VPS_m$ con $n = 1$ y $m = 1, 4, 8, 16, 32$.

Copolímero VBT:VPS 1:1. Se añadieron VBT (11,9 g, 0,049 moles) y VPS (10,1 g, 0,049 moles) a un balón de 300 mL, que contenía 250 mL de una solución acuosa de isopropanol al 50 % (v/v). Se calentó la solución a 65° C bajo agitación y se añadieron 0,22 g de AIBN. Se continuó agitando a 65°C durante 16 h bajo atmósfera de nitrógeno. La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente y se concentró hasta 125 mL en evaporador rotatorio. El polímero se precipitó adicionando dicha solución sobre acetona fría (500 mL). Posteriormente, se filtró el precipitado sólido blanco y luego se secó al vacío durante 2 días.

Copolímeros VBT:VPS 1:4, 1:8, 1:16 y 1:32. Se sintetizaron de forma similar al 1:1, sólo que variando las relaciones correspondientes de los monómeros de partida.

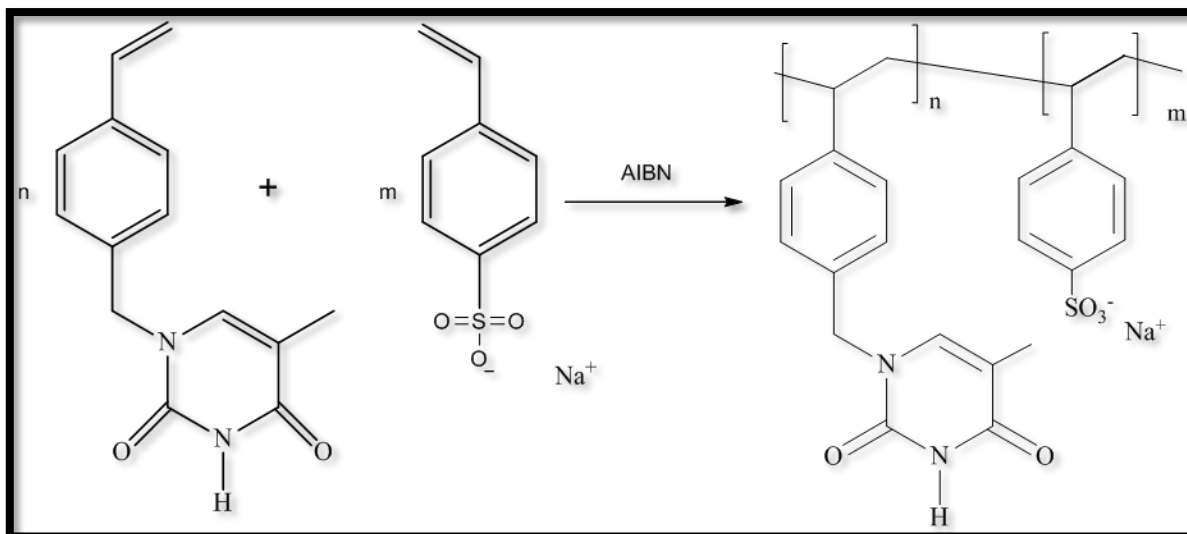


Figura 19. Polimerización radicalaria mediada por AIBN. Los n monómeros de VBT se intercalan aleatoriamente con los m monómeros de VPS.

8.1.1.3 Síntesis del copolímero en bloque VBT-b-VSP

Se disolvió VPS (1,0091 g, $4,89 \times 10^{-3}$ moles) en 15 mL de una mezcla de solventes agua:etilenglicol 1 a 1, se agregó TEMPO (0,0743 g, $0,48 \times 10^{-3}$ moles), se mantuvo la reacción con agitación y a una temperatura de 65°C hasta que se solubilizaron ambos sólidos. Después, se añadieron $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ (0,0340 g, $0,18 \times 10^{-3}$ moles) y $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ (0,0648 g, $0,24 \times 10^{-3}$ moles) a la mezcla de reacción sin cortar la agitación y a temperatura constante. Para iniciar la primera parte de la polimerización, formación del homopolímero de VPS, se incrementó la temperatura y se mantuvo la mezcla de reacción a 125°C con agitación constante durante 6 horas bajo atmósfera de nitrógeno. Luego, se cortó la agitación y se disminuyó la temperatura para finalizar la primera etapa. Se dejó enfriar el balón con la mezcla de reacción, hasta llegar a una temperatura entre 40 y 60°C y se añadió VBT (0,9436 g, $3,89 \times 10^{-3}$ moles). Se incrementó nuevamente la temperatura para iniciar la segunda etapa de la reacción, se continuó la misma durante 8 horas con agitación constante a 125°C bajo atmósfera de nitrógeno. El producto polimerizado se precipitó añadiendo la solución final a 225 mL de acetona fría. Los sólidos resultantes se recogieron por filtración al vacío y se secaron en estufa a 85°C durante dos días.

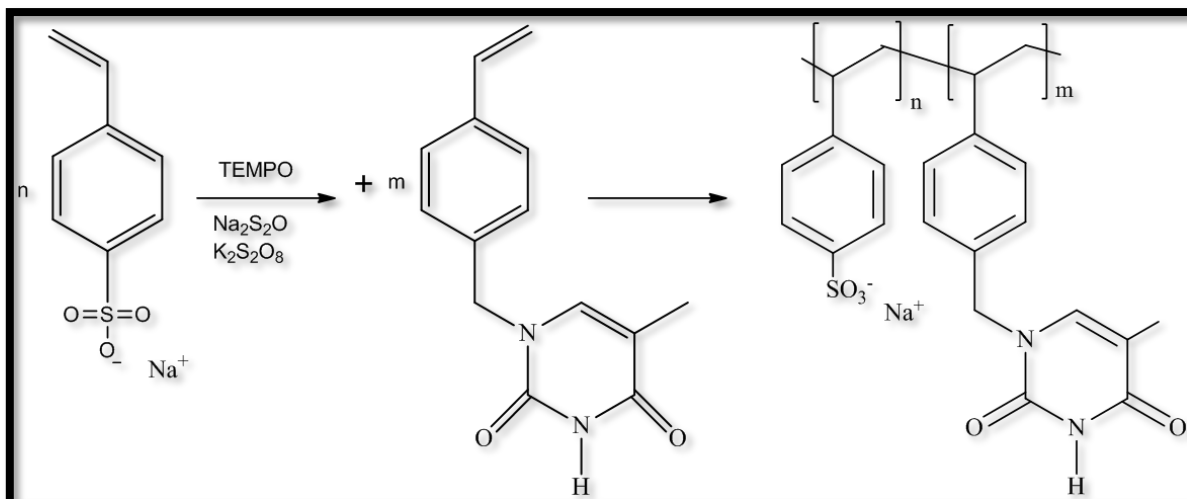


Figura 20. Polimerización radicalaria mediada por TEMPO. Copolímero formado por un bloque de n unidades de VPS unido a otro bloque de m unidades de VBT.

Es importante mencionar que las polimerizaciones se llevaron a cabo en una mezcla de solventes agua-etilenglicol o agua-isopropanol, cumpliendo de esta manera con uno de los principios de la Química Verde (*Principio Nº 5: Sustancias Auxiliares Seguras*); además el uso del agua permitió realizar la polimerización del VPS sin la protección y la posterior desprotección del ácido sulfónico, otro principio de la Química Verde (*Principio Nº 8: Derivación Reducida*).

8.1.2 Caracterización de polímeros

Para la caracterización de los copolímeros se realizaron espectros de Resonancia Magnética Nuclear de Protones (RMN ¹H). De esta manera se controla la formación de los polímeros al verificarse la ausencia de monómeros sin reaccionar.

El PM se determinó mediante cromatografía de exclusión por tamaño, utilizando un cromatógrafo líquido de alta eficiencia. Se utilizó un sistema de pre-columna y columna con un tamaño de poro 10⁴ Å, siendo las dimensiones de la primera de 50 x 10 mm y de la columna 250 x 10 mm. Para el copolímero en bloque se utilizó un método isocrático, fase móvil agua miliQ con un flujo de 0,8 mL/min y la temperatura de trabajo 25° C. La curva de calibración se realizó utilizando patrones comerciales de sal sódica de poliestireno sulfonato de PM entre 891 y 976000 Da. Para los copolímeros al azar (VBT:VPS 1:1, 1:4, 1:8, 1:16 y 1:32), la fase móvil utilizada fue una mezcla 70/30 agua (0,05M Na₂SO₄ + 0,01M Na₂HPO₄ pH: 8-9) y metanol, con un flujo de 0,6 mL/min y la temperatura de trabajo 25° C. La curva de calibración se realizó utilizando los estándares de poli(estireno sulfonato) de sodio.



La composición de los copolímeros fue verificada determinando la cantidad total de nitrógeno y carbono mediante un analizador elemental por combustión (LECO). Los resultados de estas técnicas se reportan en la sección 11 de Información Adicional.



8.2 SENSOR QUÍMICO PARA CONTAMINANTES EN AGUA BASADOS EN COPOLÍMEROS VBT-VPS

8.2.1 Estudio de afinidad sobre HPAs

Se prepararon diversas soluciones acuosas con diferentes copolímeros (VBT:VPS 1:1; 1:4; 1:8 y 1:16) y el BaP. Se midieron sus espectros de emisión de fluorescencia, entre 380 y 500 nm, excitando a 298 nm. En todos los casos, la concentración de BaP fue 5×10^{-3} mg/L y de cada copolímero 5×10^3 mg/L. Para el análisis entre el copolímero VBT:VPS 1:1 y el BaP se realizaron siete soluciones donde la concentración de VBT:VPS 1:1, se varió de 0.5×10^3 mg/L a 6.5×10^3 mg/L, cada 1×10^3 mg/L, mientras que la concentración de BaP se fijó en 5×10^{-3} mg/L. A estas soluciones se les realizaron mediciones de fluorescencia (espectros de excitación, $\lambda_{emi} = 410$ nm, y de emisión, $\lambda_{exc} = 360$ nm). Finalmente, en esta etapa de primeros ensayos, se realizaron cinco soluciones donde se mantuvo constante la concentración de VBT:VPS 1:1 (5×10^3 mg/L) y se varió la concentración de BaP de 5×10^{-5} mg/L a 5×10^{-4} mg/L. Con estas soluciones se realizaron espectros de emisión de fluorescencia, entre 380 y 500 nm, excitando a 298 nm y una MEEF con la solución que contenía la menor concentración de BaP junto con el copolímero.

Para el estudio del solvente y la polaridad del medio, se prepararon soluciones de BaP con una concentración 5×10^{-3} mg/L; de copolímero VBT:VPS 1:1 con una concentración de $0,25 \times 10^3$ mg/L; y de ambos compuestos BaP (5×10^{-3} mg/L) y copolímero ($0,25 \times 10^3$ mg/L), en los siguientes solventes: agua, tolueno, acetonitrilo, dimetilsulfóxido y diclorometano. También se prepararon soluciones de BaP = 5×10^{-3} mg/L y VBT:VPS 1:1 = $0,25 \times 10^3$ mg/L en diferentes proporciones de DMSO:H₂O. A las soluciones previamente mencionadas, se le midieron espectros de excitación de fluorescencia entre 230 y 400 nm, emitiendo a 410 nm, y espectros de emisión de fluorescencia, entre 380 y 500 nm, excitando a 298 nm.

8.2.2 Cuantificación de HPA

8.2.2.1 Eco-Escala

En esta tesis se realizaron determinaciones de contaminantes sobre muestras de agua que ya se efectuaban en laboratorios de análisis mediante otras técnicas analíticas. Por lo tanto, resultó oportuno realizar la cuantificación de los HPAs por ambos métodos analíticos y contrastar el método presentado en esta tesis (fluorescencia sensibilizada) contra el de referencia (cromatografía acoplada a fluorescencia). Para realizar este análisis y poder determinar que



procedimiento es más ecológico o “verde” (en la terminología de la Química Verde) se utilizó la *Eco-Escala* presentada por los autores Galuzka y colaboradores en el año 2012 [4].

La *Eco-Escala* es un novedoso enfoque integral que permite evaluar de manera semicuantitativa las metodologías analíticas, compararlas y seleccionar la alternativa más ecológica. Se basa principalmente en asignar puntos de penalización a parámetros de un proceso analítico que no están de acuerdo con el análisis verde ideal [4]... pero ¿a qué llamamos análisis verde ideal? A un análisis que se caracteriza por la eliminación o el uso mínimo de reactivos, el uso mínimo de energía y la no generación de residuos. Estos criterios se cumplen en métodos basados en mediciones directas; sin embargo, en la determinación de muchos analitos no existe un método directo disponible [4]. Por lo tanto, lo que proponen los autores de esta escala, es que el análisis verde ideal tenga las siguientes características: 1) los reactivos no presenten riesgos ya sea físicos, ambientales, ni para la salud, 2) que se consuma menos de 0,1 kWh de energía por muestra, y, 3) no se produzcan residuos.

La base de la *Eco-Escala* es asignar un valor de 100 puntos a un análisis verde ideal (enfoque análogo al propuesto por Van Aken y otros autores, para evaluar las síntesis de compuestos orgánicos [85]). Luego, a cada uno de los parámetros del procedimiento analítico (cantidad de reactivos, peligros, energía y residuos) si se aparta del análisis ecológico ideal, se le asignan puntos de penalización. Dado que la influencia de las sustancias peligrosas depende de su cantidad, el cálculo para cada parámetro se realiza multiplicando los puntos de penalización por un factor determinado. Finalmente, se incluye la suma de puntos de penalización para todo el procedimiento en el cálculo de la *Eco-Escala*, de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\text{Eco-Escala analítica} = 100 - \text{puntos de penalización totales}$$

El resultado permite clasificar la metodología analítica: mayor a 75 puntos representa un excelente análisis ecológico; menor a 75 puntos, pero mayor que 50 representa un análisis verde aceptable; y, menor a 50 representa un análisis verde inadecuado [4].

Para evaluar el peligro de los reactivos utilizados en los procedimientos analíticos, se pueden aplicar diferentes clasificaciones de sustancias peligrosas. En esta *Eco-Escala* se evaluaron los peligros físicos, ambientales y para la salud sobre la base del Sistema Globalmente Armonizado de Clasificación y Etiquetado de Productos Químicos (Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals, GHS), que es la clasificación de productos químicos más completa y actualizada [86]. Por conveniencia y simplicidad, se incluyen pictogramas y palabras de



señalización en la evaluación de los peligros que plantean los reactivos. Cada reactivo puede caracterizarse por uno o más de los nueve pictogramas (Figura 21), y a cada pictograma, se le asignan puntos de penalización. En el GHS se utilizan dos palabras de señalización: “peligro” (peligro más grave), y “advertencia” (peligro menos grave). Por lo tanto, se asignó el siguiente sistema de puntos de penalización a los reactivos [4]: sin pictograma= 0 puntos de penalización; pictograma con palabra de señalización “advertencia” = 1 punto de penalización; y, pictograma con palabra de señalización “peligro” = 2 puntos de penalización.

Los puntos de penalización por uso de energía se asignaron de acuerdo con los valores propuestos por Raynie y Driver [87]. Las prácticas e instrumentos de laboratorio que consumen menos energía (menor o igual a 0,1 kWh por muestra) se les asignó 0 puntos de penalización. Las técnicas que consumen una energía intermedia (mayor a 0,1 kWh y menor o igual que 1,5 kWh, por muestra) se les asignó 1 punto de penalización. Finalmente, a las técnicas que consumen más energía (> 1,5 kWh por muestra) se les asignó 2 puntos de penalización.

Finalmente, la cantidad de residuos se evaluó considerando el volumen de desechos generados por cada determinación realizada.

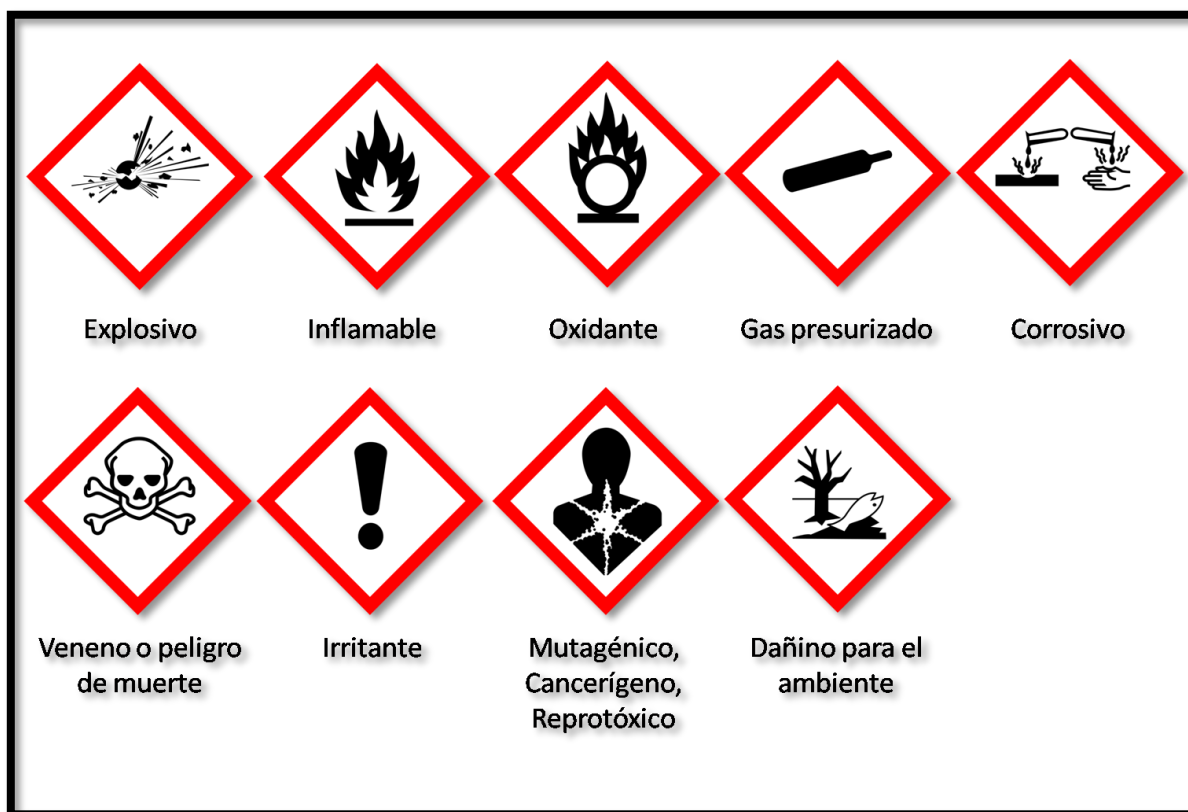


Figura 21. Pictogramas según el GHS.



8.2.2.2 Procedimiento

Se prepararon soluciones en acetonitrilo de Pir (4×10^{-4} g/mL), BaP ($1,4 \times 10^{-3}$ g/mL), acenaftileno (ACE, $4,4 \times 10^{-4}$ g/mL), y antraceno (ANT, 3×10^{-4} g/mL). Luego, a partir de estas soluciones, se prepararon diluciones acuosas de cada uno de los contaminantes para utilizar en el análisis: Pir (40 ng/mL), BaP (280 ng/mL), ACE (120 ng/mL), y ANT (120 ng/mL).

El procedimiento experimental correspondiente al análisis de segundo orden se realizó de la siguiente manera. Se prepararon un conjunto de 13 muestras de calibración transfiriendo los volúmenes apropiados de VBT:VPS 1:1 (1×10^{-2} g/mL), de BaP (280 ng/mL) y Pir (40 ng/mL) en matraces de 5 mL, y llevando cada uno a volumen con agua destilada. Las concentraciones de las muestras de calibrado fueron proporcionadas por un diseño central compuesto de dos factores. El rango del Pir testeado fue de 0,00 a 1,25 ng/mL, mientras que el rango del BaP fue de 0,00 a 2,00 ng/mL. La concentración de VBT:VPS 1:1 se estableció en 2×10^{-3} g/mL. Las MEEFs se expusieron al análisis de datos de segundo orden. Se preparó un conjunto de 10 muestras de validación, con concentraciones diferentes a las de calibrado, siguiendo un diseño aleatorio para las concentraciones de analito. A estas muestras se les dio el mismo tratamiento que a las de calibración. Luego, se expusieron al mismo análisis quimiométrico un conjunto de 15 muestras y 5 duplicados (muestras de prueba) que contenían ACE y ANT como potenciales interferentes en concentraciones entre 10 y 100 ng/mL. Finalmente, se realizó el análisis de muestras reales de diferentes fuentes de agua. Dado que las muestras no contenían HPA (o la concentración era inferior a los límites de detección del método), se llevó a cabo un estudio de recuperación.

Las muestras reales de agua fueron de zanja (tomadas de dos lugares diferentes), de red (tomadas de dos ciudades pertenecientes a diferentes provincias) y de río (las 3 muestras utilizadas fueron del mismo río pero extraídas en diferentes puntos). Estas muestras se prepararon enriqueciendo cada una con soluciones estándar de los HPA estudiados, obteniendo 3 niveles de concentración (para cada HPA) en el rango de 3×10^{-2} a 1,60 ng/mL. Estos valores fueron seleccionados en base a los niveles que se pueden encontrar en diferentes aguas naturales. Además, se incorporaron a estas muestras los interferentes ACE y ANT en concentraciones entre 10 y 100 ng/mL. Finalmente, se agregaron los volúmenes apropiados de copolímero VBT:VPS 1:1 (1×10^{-2} g/mL) para lograr una concentración final del mismo de 2×10^{-3} g/mL en cada muestra. Estas muestras se prepararon por duplicado y no se sometieron a ningún tratamiento previo. Las MEEFs fueron obtenidas por un espectrofluorímetro (Varian Cary Eclipse) con lámpara de flash de



xenón, utilizando una celda de cuarzo de 1,00 cm. Los anchos de la rendija de excitación y emisión (*slit*) fueron de 5 nm. Los espectros se guardaron en formato ASCII y se transfirieron a una PC para su posterior manipulación. Las MEEF se registraron en el rango de λ_{exc} = 230-360 nm cada 1nm, y λ_{emi} = 390-500 nm cada 5nm; y fueron procesadas con PARAFAC [88].

8.2.2.3 Análisis de HPAs en agua mediante el método de referencia

Todo el conjunto de muestras (calibración, validación, prueba y muestras reales) se analizaron también con el método de referencia: cromatografía líquida de alta resolución acoplada a un detector de fluorescencia (HPLC-FD) [41]. Se utilizó un bucle (*loop*) de 20,0 μ L para introducir la muestra en la columna Zorbax SB C18. La fase móvil fue una mezcla de acetonitrilo:agua (75:25), con un flujo de 1 mL/min, y la detección de fluorescencia se llevó a cabo a 333 y 398 nm como longitudes de onda de excitación y emisión, respectivamente. La determinación de HPAs se realizó de manera isocrática a temperatura ambiente, manipulando una alícuota de 20 μ L de soluciones estándares o de muestras. La cuantificación de los mismos se llevó a cabo utilizando curvas de calibración externas. Para obtener estas curvas de calibración de cada HPA se utilizaron 5 soluciones acuosas en un amplio rango de concentración (trabajando por triplicado). Finalmente, se emplearon los parámetros analíticos de la curva de calibración del BaP y del Pir para calcular la concentración de HPA en muestras reales.

8.2.3 Micelas de copolímero en bloque

8.2.3.1 Formación de micelas

Para la formación de agregados micelares se preparó una solución con 0,1078 gramos de copolímero en bloque en 10 mL de DMSO, se filtró a través de un filtro de jeringa de 0,45 μ m y se colocó en una membrana semipermeable (Spectra/Por, PM de corte: 8000 Da) previamente activada con agua destilada durante 2 horas. Para formar los agregados micelares se dializó frente a 1 L de agua durante 24 horas. El solvente de intercambio (en este caso el agua) se cambió 3 veces durante la formación de las micelas, primer cambio a las 2 horas, segundo a las 6 horas del inicio y el tercer cambio a las 12 horas del inicio. La distribución del tamaño de las micelas se determinó mediante DLS con un ángulo de detección de 90° y un láser con longitud de onda de 532 nm a 25°C. Las muestras fueron filtradas utilizando filtros de jeringa de nylon de 0,45 μ m. Mediante el *software* del equipo (Nanoparticle Analyzer HORIBA Scientific [89]) se calculó el



diámetro promedio de las micelas con su desvío estándar para las diversas diluciones de la solución micelar, variando su concentración entre 0,0135 mg/mL a 2,7000 mg/mL.

8.2.3.2 Determinación de la CMC

La determinación de la CMC se realizó por dos métodos diferentes. Un método utiliza como sonda el colorante AM, para el cual se prepararon diferentes diluciones (volumen final= 1 mL) de la solución micelar de VBT-b-VPS, variando su concentración de 0,0135 mg/mL a 2,7000 mg/mL; y luego, se les agregó a cada una 20 μ L de una solución acuosa 1×10^{-3} M de AM. También se preparó una solución de AM en agua para control. Finalmente, los espectros de absorción se midieron en un espectrofotómetro entre 500 y 750 nm. En el segundo método la CMC se estimó mediante espectroscopía de fluorescencia usando como sonda el pireno. Se preparó una solución de Pir en acetona $6,0 \times 10^{-2}$ M, se añadió agua cantidad suficiente para una concentración final de $12,0 \times 10^{-7}$ M y se evaporó la acetona de la solución. Finalmente, se mezcló esta solución de Pir con diferentes diluciones de la solución micelar del copolímero en bloque. La concentración final de Pir en cada muestra fue de 0,12 mg/L y la concentración final de la solución micelar osciló entre 0,0068 mg/mL a 1,3500 mg/mL. Los espectros de excitación de fluorescencia se midieron entre 220 y 380 nm, con λ_{emis} = 400 nm; los espectros de emisión de fluorescencia, entre 350 y 500 nm, excitando a dos longitudes de onda diferentes λ_{exc} = 331 nm y λ_{exc} = 339 nm.

8.2.4 Copolímeros sobre soporte sólido

Para el estudio del sistema sobre un soporte sólido, se utilizó como sustrato láminas de PET hidrófilos sin tratamiento previo. Todos los extendidos o *films*, sobre estos soportes, se realizaron utilizando varillas recubiertas de alambre para revestimientos. Los foto-entrecruzamientos para la adhesión del copolímero al sustrato se realizaron por irradiaciones, utilizando una lámpara de mano UV. Las medidas de fluorescencia se realizaron en el espectrofluorímetro (Varian Cary Eclipse) con una lámpara de flash de xenón, y las medidas microscópicas se realizaron con el microscopio electrónico de barrido (Leitz SEM AMR 1600T).

Para los primeros estudios del sistema sobre este soporte, se prepararon soluciones acuosas de 100 mg/mL de diferentes copolímeros de VBT:VPS_m (siendo m: 1, 4, 8 y 16), las cuales fueron homogenizadas por sonicación a 60°C. Para el sembrado de las soluciones sobre la lámina de PET, se distribuyó homogéneamente solución de cada copolímero utilizando una varilla de revestimiento N° 6, dando un espesor uniforme de 13,6 μ m [90]. Cada film se secó a temperatura



ambiente durante una hora. Para la interacción del copolímero con el contaminante BaP se depositaron sobre los extendidos secos 0,05 mL de una solución de BaP 1 mg/L, manteniendo un grupo de *films* sin contaminar como control. Finalmente, se monitoreó la interacción en los extendidos a través de: (1) la medición de espectros de emisión de fluorescencia, entre 380 y 500 nm, excitando a 299 nm; (2) matrices de emisión y excitación de fluorescencia en las siguientes condiciones: $\lambda_{exc} = 299-365$ nm y $\lambda_{ems} = 370-450$ nm cada 1nm; y (3) el análisis morfológico mediante microscopía electrónica de barrido, donde las muestras fueron revestidas con una capa de oro con el fin de hacerlas conductoras.

8.2.4.1 Caracterización de la cinética de entrecruzamiento

Para este estudio se prepararon soluciones acuosas de 100 mg/mL de copolímeros de VBT:VPSm (siendo $m = 1, 4, 8, 16, 32$), las cuales se distribuyeron homogéneamente sobre láminas de PET utilizando una varilla de revestimiento N°6. Los *films* se secaron a temperatura ambiente durante una hora. Finalmente, los extendidos se irradiaron con una lámpara UV a 254 nm (intensidad 1.3×10^{-3} W/cm²) durante 180 min, frenando la irradiación para medir cada cinco min. Este proceso de irradiación conduce a la inmovilización del polímero en el soporte. Se monitoreó la reacción de foto-entrecruzamiento mediante MEEFs en función del tiempo de irradiación (equivalente a la energía dada).

Las mediciones de las matrices se realizaron utilizando un espectrómetro de luminiscencia Perkin-Elmer LS-55 con una lámpara de flash de xenón. El ancho de los *slits* fue de 10 nm, mientras que la sensibilidad del fotomultiplicador se fijó en 700 V. Los espectros se guardaron en formato ASCII y se transfirieron a una PC para su posterior manipulación. Las MEEFs *front-face* se registraron en las siguientes condiciones: $\lambda_{exc} = 290-330$ nm y $\lambda_{ems} = 350-530$ nm cada 1nm, irradiando la muestra de 0 a 180 min y midiendo cada 5 min, adquiriendo un total de 37 MEEFs por cada composición de copolímero. El ángulo formado entre los haces de excitación y emisión sobre la muestra fue de 90°, con un ángulo de incidencia de 45° respecto a la superficie soporte. Las matrices fueron procesadas con MCR-ALS.



8.3 SOFTWARES UTILIZADOS

Para estudiar las posibles interacciones entre el copolímero y el contaminante, y racionalizar toda la evidencia experimental se realizó un modelado molecular (descrito en la sección 7.1 de Teoría) donde se utilizaron los *softwares* Hyperchem [79] y Gaussian 09W [91].

Las rutinas empleadas para los algoritmos PARAFAC y MCR-ALS y para el cálculo de la *Eco-Escala* fueron escritos en MATLAB 7.0 [92]. PARAFAC se implementó utilizando la interfaz gráfica de la caja de herramientas del MVC2, disponible en Internet [93].



RESULTADOS Y DISCUSIÓN



9- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

9.1 ESTUDIO DE AFINIDAD SOBRE HPA

9.1.1 Análisis del sistema en solución acuosa

Para probar que existe una interacción entre copolímeros de VBT-VPS y los HPAs, se prepararon diversas soluciones acuosas con diferentes copolímeros y el BaP; y se midieron sus espectros de emisión de fluorescencia. En todos los casos, la concentración de BaP fue 5×10^{-3} mg/L y de cada copolímero 5×10^3 mg/L. En la Figura 22 se visualiza lo ensayado.

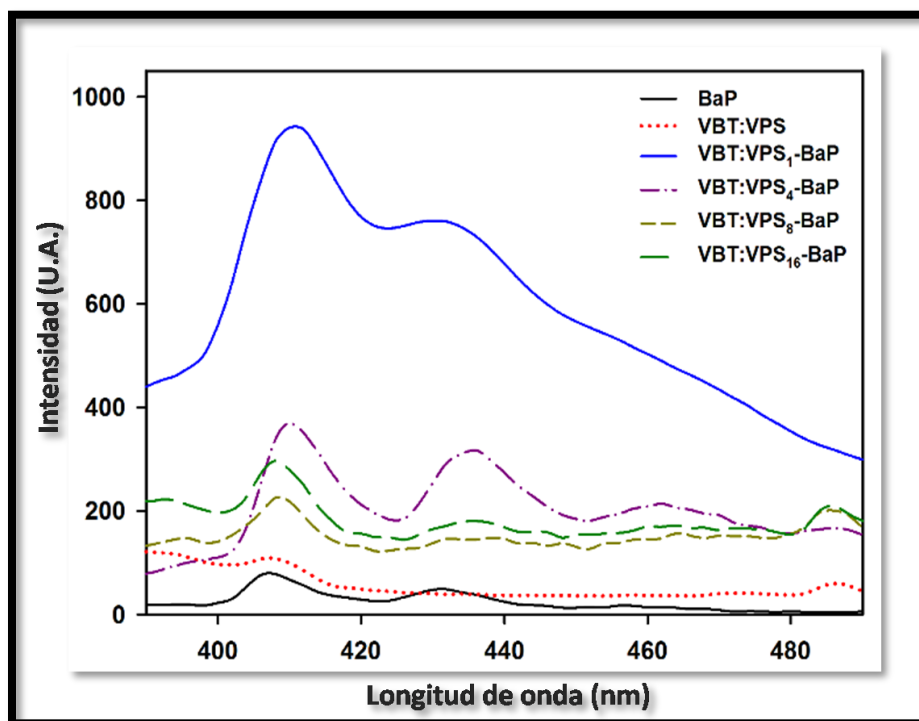


Figura 22. Espectros de emisión de fluorescencia para las diferentes soluciones acuosas de Copolímero-BaP, junto con los espectros de fluorescencia puros del BaP y el VBT:VPS (1:1).

En la Figura 22 se puede observar como disminuye la exaltación de la fluorescencia nativa del BaP a medida que disminuye el porcentaje de VBT en el copolímero, y la causa de la reducción se debe a la menor proporción de residuos de timina en la red polimérica. El copolímero con proporción un monómero de VBT cada 16 de VPS debería haber presentado menor exaltación de fluorescencia que el copolímero de proporción 1 a 8, sin embargo este no fue el resultado obtenido. De hecho no se observan diferencias significativas entre ambos espectros y esto podría adjudicarse a la aleatoriedad del copolímero asociada al tipo de síntesis. En vista del resultado



principal del ensayo, decidimos trabajar con la relación de VBT más alta, con el copolímero VBT:VPS 1:1 o simplemente VBT:VPS.

En la Figura 23 se muestran los espectros de excitación y emisión de fluorescencia de siete soluciones, donde la concentración del copolímero se varió entre $0,5 \times 10^3$ mg/L a $6,5 \times 10^3$ mg/L, aumentando cada 1×10^3 mg/L, mientras que la concentración de BaP se fijó en 5×10^{-3} mg/L. Los resultados mostraron una mejora notable en la fluorescencia intrínseca del BaP y el efecto proyectado se maximizó a concentraciones mayores o iguales a 5×10^3 mg/L de copolímero, por lo que no es necesario trabajar con concentraciones más altas que estas.

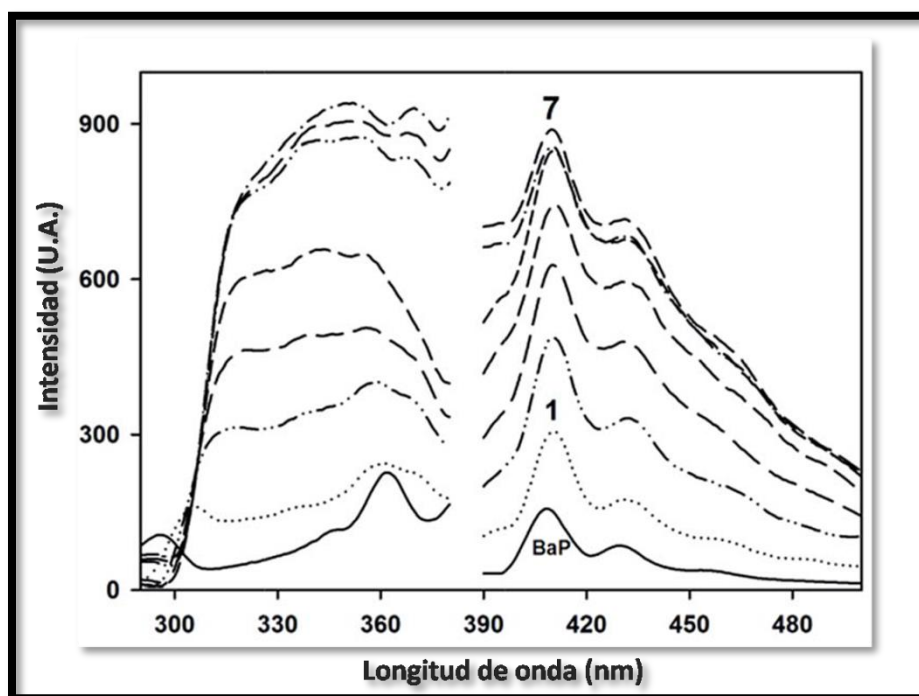


Figura 23. Espectros de excitación y emisión de fluorescencia para las diferentes soluciones. La concentración del copolímero se varió de $0,5 \times 10^3$ mg/L (línea etiquetada como “1”) hasta llegar a $6,5 \times 10^3$ mg/L (línea etiquetada como “7”) mientras que la concentración de BaP se mantuvo constante. Se adjunta el espectro de fluorescencia de la solución control de BaP (línea etiquetada como “BaP”).

El siguiente paso, consistió en añadir una masa conocida de copolímero (concentración final 5×10^3 mg/L) a soluciones de diferentes concentraciones de BaP con el fin de definir la relación óptima del efecto observado y delinear la utilidad analítica del sensor (la cantidad de BaP más baja posible con señal cuantificable). Para ello, se registraron los espectros de emisión de fluorescencia, que se observan en la Figura 24, y las matrices de excitación-emisión de fluorescencia, que se muestran en la Figura 25.

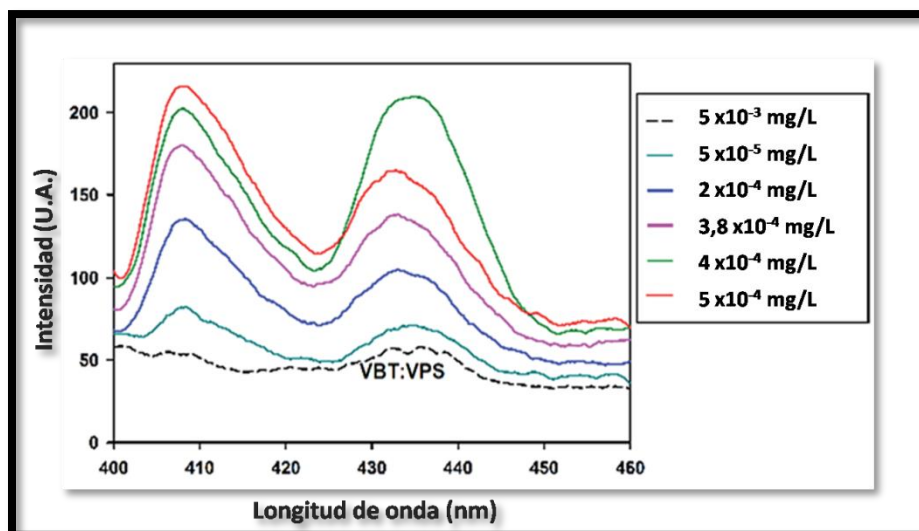


Figura 24. Espectros de emisión de fluorescencia (λ_{exc} = 298 nm) donde se mantiene constante la concentración de VBT:VPS 1:1 en 5×10^3 mg/L y se varía la concentración de BaP desde 5×10^{-5} mg/L a 5×10^{-4} mg/L. Espectro de VBT:VPS puro (línea etiquetada "VBT:VPS").

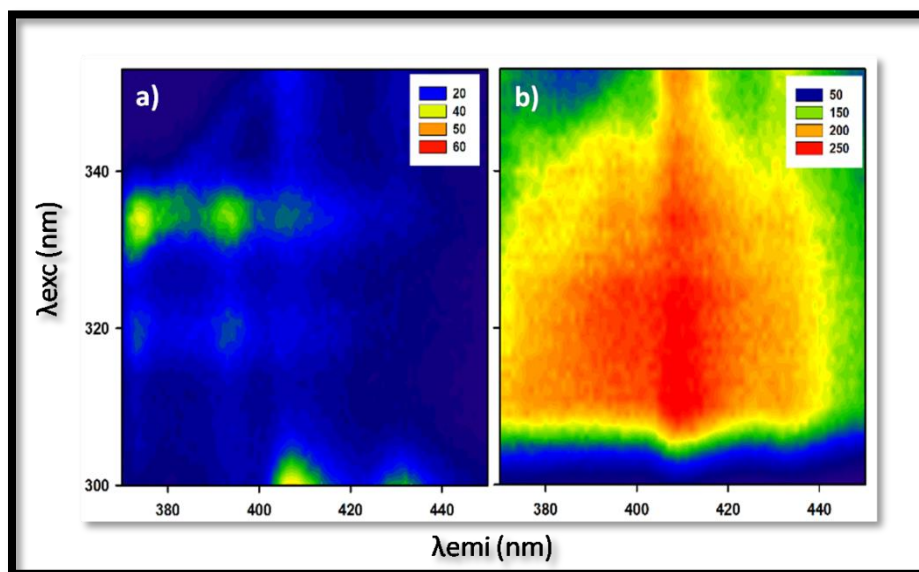


Figura 25. a) MEEF de una solución acuosa de BaP 5×10^{-4} mg/L. b) MEEF de una solución acuosa formada por BaP 5×10^{-4} mg/L y VBT:VPS 1:1 5×10^3 mg/L.

La Figura 25 muestra que la exaltación luminiscente persiste, sin embargo, pese al resultado encontrado, el sistema es inestable ya que se observan alteraciones en las bandas espectrales características del BaP y desplazamientos a longitudes de onda mayor (hacia el rojo espectral). Las modificaciones en las bandas de emisión pueden ser inducidas por un cambio en la naturaleza del solvente o la composición de la matriz, lo que es en realidad una evidencia de cambios en la energía de solvatación [94]. Varios ejemplos descritos en la literatura, demuestran que las interacciones no covalentes soluto-solvente deben considerarse entre los diversos



aspectos del fenómeno de fluorescencia [95, 96]. En consecuencia, una posible explicación a la distorsión observada radica en el tipo síntesis utilizada que produce copolímeros estadísticos solubles en agua que presentan diversos cambios conformacionales [97].

9.1.2 Análisis de la polaridad del disolvente del sistema

Se sabe que algunas de las propiedades espectroscópicas de los analitos están relacionadas con la polaridad del disolvente, por tanto, modificar la capacidad de un disolvente para formar enlaces no covalentes con el analito altera el orden de las transiciones en el estado excitado (π - π^* , en lugar de n - π^*) y aumenta la intensidad relativa de las bandas vibrónicas de los compuestos aromáticos [95]. En la Figura 26-A, tenemos diversas soluciones de BaP en los solventes DMSO, DCM, Tol, ACN y agua. Como puede observarse el DMSO induce al estado π - π^* a un contenido energético menor, por tanto, la fluorescencia nativa del BaP tiene una intensidad mayor en este solvente. Además, se puede establecer el siguiente orden decreciente de exaltación de fluorescencia del BaP conforme a los solventes ensayados DMSO > DCM > ACN \approx TOL > H₂O.

Para desarrollar un sensor ecológico y reducir el uso de solventes nocivos para el medio ambiente, el siguiente paso fue investigar el efecto producido por la adición de agua al sistema Copolímero-BaP-DMSO (siendo DMSO el solvente que causa el mayor aumento de fluorescencia). Se esperaba que el aumento del carácter prótico de la mezcla de solventes disminuyera la fuerte solvatación en el BaP, ya que el copolímero establece otras interacciones con el agua (es decir, enlaces de hidrógeno entre VBT y agua) [95]. Como puede observarse en la Figura 26-B, efectivamente al aumentar el carácter prótico del medio, disminuye el aumento de la fluorescencia de BaP. El efecto es completamente reproducible lo que sugiere que el nuevo entorno da menor rigidez al BaP. Ahora bien, hubo un hallazgo muy interesante: se observó que la señal de fluorescencia disminuye proporcionalmente con la cantidad de agua añadida a la mezcla de disolvente, salvo cuando el porcentaje de agua es del 80% (20% DMSO) donde la señal vuelve a crecer. Este resultado puede explicarse por el hecho de que se establece un equilibrio óptimo entre un efecto hidrofóbico (que acerca el BaP a la timina del VBT) y una interacción no covalente entre el VBT y el BaP (además el BaP cuenta con una solvatación rígida de DMSO). En consecuencia, este equilibrio presenta resultados similares a los observados cuando el analito se encuentra solo en el disolvente ideal aprótico DMSO.

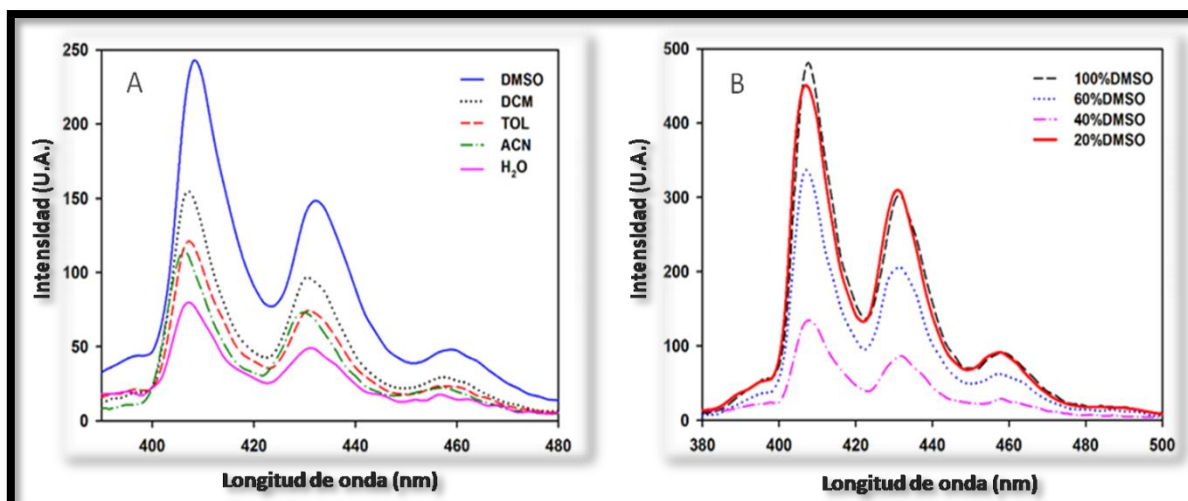


Figura 26. A. Espectros de emisión de fluorescencia del BaP (5×10^{-3} mg/L) en diferentes solventes. B. Espectros de emisión de fluorescencia de soluciones formadas por: BaP (5×10^{-3} mg/L) y VBT:VPS 1:1 ($0,25 \times 10^3$ mg/L) en diferentes proporciones de DMSO:H₂O.

9.1.3 Análisis del modelado molecular

El objetivo del estudio computacional fue encontrar indicios de la existencia de una interacción no covalente entre el copolímero VBT:VPS y el BaP. Racionalizar la evidencia experimental hallada permite diseñar sensores ajustando las condiciones en busca de mejores interacciones copolímero-analito.

En la Figura 27 se puede observar el modelo definitivo del sistema, formado por 4 monómeros de VBT, 4 de VPS y una molécula de BaP, para el cual se encontró una geometría optimizada en donde el átomo de hidrógeno unido al nitrógeno de la timina del copolímero se encuentra a una distancia de 3,17 Å del centroide del anillo aromático menos impedido estéricamente del BaP. Esta interacción no covalente encontrada es del tipo hidrógeno polar- π , en donde el átomo de hidrógeno se encuentra sobre el centro geométrico del anillo aromático en cuestión. Los resultados encontrados en el estudio teórico explican, en parte, la elevada afinidad evidenciada experimentalmente entre el copolímero de VBT:VPS y el BaP.

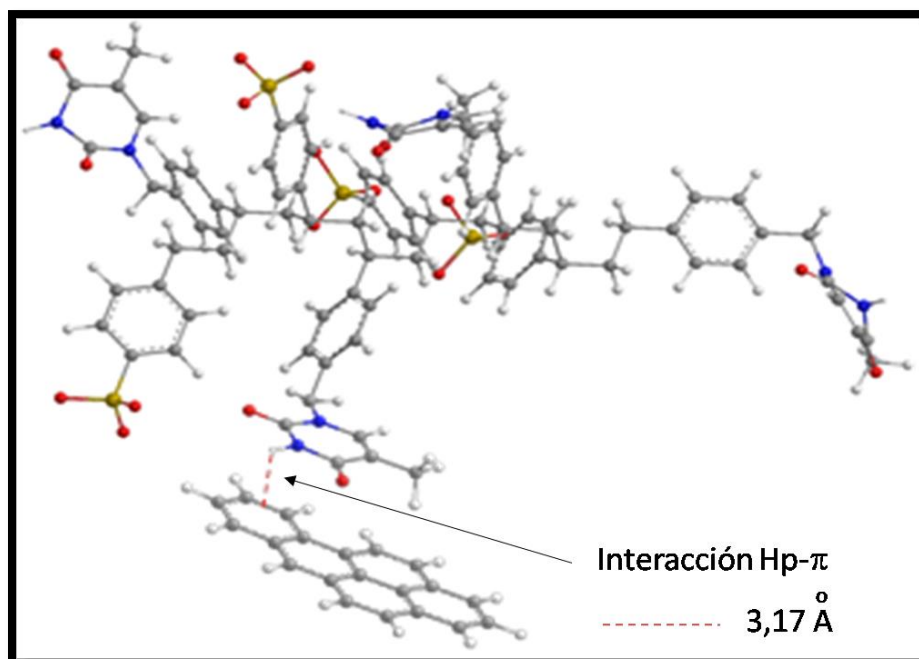


Figura 27. Geometría optimizada de la interacción Hp- π . En línea punteada roja se indica la distancia de interacción (3,17 Å).

Qi-Shi Du y sus compañeros [52], mediante modelados teóricos, encontraron que la distancia entre el hidrógeno polar de la molécula metilamina (CH_3NH_2) y el centroide del benceno es del orden de 3.093 Å (Figura 28), atribuyendo esta distancia a una interacción Hp- π . Lo cual revalida nuestra evidencia de interacción encontrada entre el copolímero y BaP.

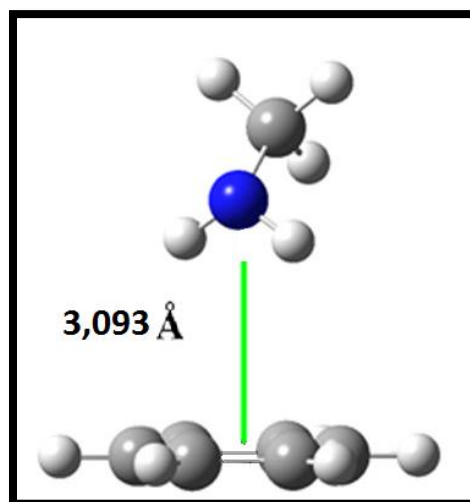


Figura 28. Geometría optimizada de la interacción Hp- π entre la metilamina y el benceno. En línea verde se indica la distancia de interacción (3,093 Å).

Las principales contribuciones físicas en las interacciones de este tipo (Hp- π) son las interacciones electrostáticas, las de dispersión electrónica y la coordinación de los orbitales



moleculares. Esta interacción es una interacción puntual con un grupo- π la cual puede suceder en cualquier posición del plano- π [52]. Sin embargo, la mejor geometría es cuando el hidrógeno polar se encuentra perpendicular al anillo aromático (*edge-face*). Por cuestiones estéricas en la interacción copolímero-BaP encontramos una geometría *offset-stacked*. En la Figura 29 se muestran 3 tipos de geometrías posibles en la interacción $H\pi$ - π utilizando dos moléculas de benceno a modo de ejemplo [98].

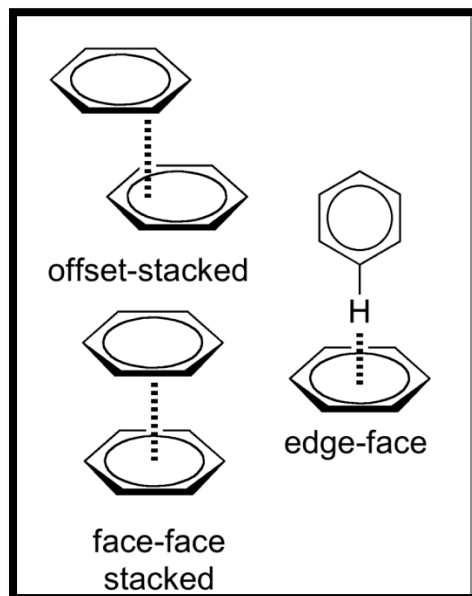


Figura 29. Diferentes geometrías de interacción $H\pi$ - π [98].

La Figura 30 muestra las geometrías optimizadas por el método ONIOM (descrito en el capítulo 7 de Teoría) del sistema VBT:VPS y BaP en los cuatro solventes estudiados. Como puede observarse, se obtuvieron conformaciones similares para todos los solventes, en los cuales el anillo de timina del resto de VBT está cerca del anillo aromático más externo del BaP con una interacción del tipo *offset-stacked*. Nuevamente, la interacción más cercana en todos los solventes fue entre el átomo de hidrógeno de la timina (enlazado al N) y el anillo más externo del BaP donde la distancia varió de 3,158 a 3,362 Å, dependiendo del solvente. Este tipo de interacción $H\pi$ - π , en la que el átomo de hidrógeno está en el centro geométrico del anillo aromático en cuestión, surge de un resto de timina que actúa como "donante" y un anillo aromático que actúa como "aceptor".

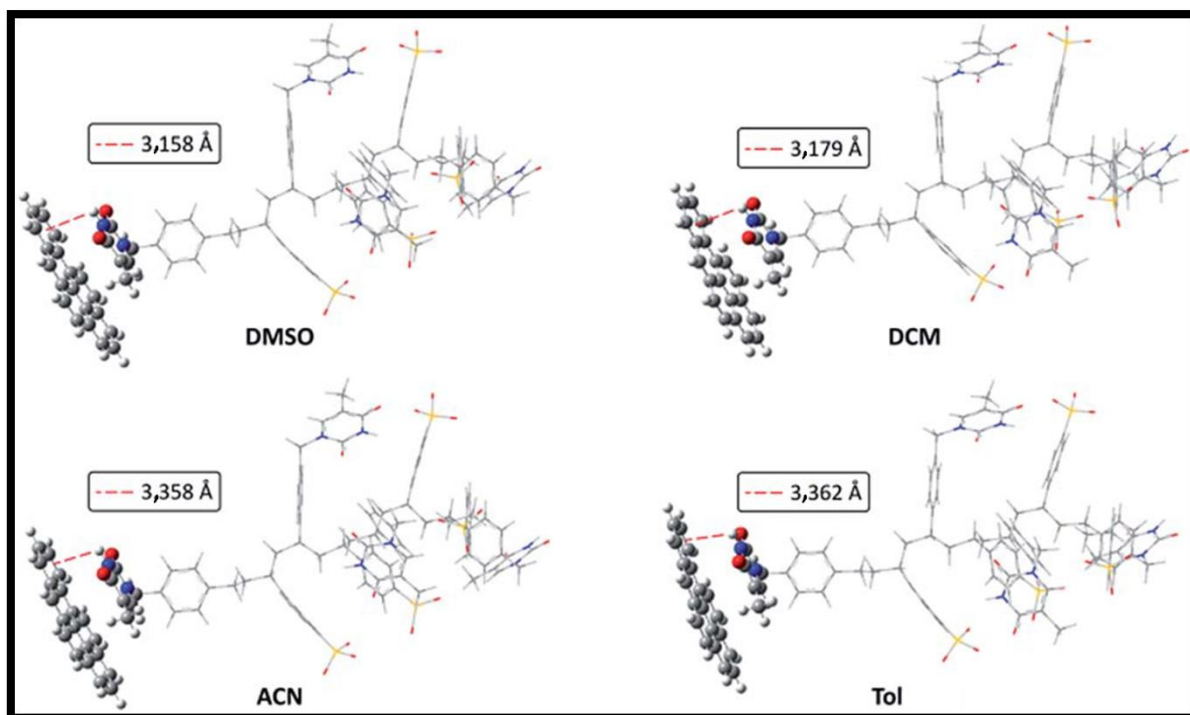


Figura 30. Geometrías optimizadas para el sistema mediante el método ONIOM. La línea punteada roja indica la distancia de interacción entre el copolímero y el BaP en diversos solventes.

En la Tabla 1 se presentan los valores de energía libre de Gibbs, calculados mediante el método híbrido ONIOM y las distancias de la longitud del enlace no covalente (Hp- π) para la interacción estudiada en los diversos solventes orgánicos ensayados. La mejor interacción se logra con el DMSO, ya que presenta la menor distancia y la energía libre relativa más chica, dato que corrobora la evidencia encontrada experimentalmente. Estos resultados son consistentes con la estabilización producida por la interacción Hp- π . La diferencia observada, en la serie de los solventes, se explica en vista del aumento de la polaridad iniciando con el tolueno de menor polaridad y finalizando con el DMSO.

Tabla 1. Valores energéticos relativos y longitud del enlace no covalente Hp- π para el sistema en los solvente apróticos.

Solvente	Energía libre de Gibbs (Kcal/mol)	Longitud de enlace (Å)
DMSO	0,20	3,1578
DCM	0,36	3,1785
ACN	2,12	3,3582
TOL	6,59	3,3617



9.2 CUANTIFICACIÓN DE HPA

9.2.1 Análisis de la relación entre el sensibilizador de fluorescencia, HPAs e interferentes

Para conseguir la cuantificación eficiente de HPAs el primer paso fue encontrar la mejor relación entre el sensibilizador de fluorescencia (VBT:VPS 1:1) y los analitos. Este estudio se realizó mediante curvas de saturación de fluorescencia para cada contaminante por separado. Para construir la curva del BaP se hicieron mediciones puntuales (a 410 nm) de espectros de emisión, realizados en soluciones acuosas donde se fijó la concentración del BaP (5 ng/mL) y se les fue adicionando cantidades sucesivas de VBT:VPS. Para construir la curva del Pir se realizaron los espectros de emisión de fluorescencia, y luego se hicieron las mediciones puntuales (a 395 nm), a soluciones acuosas de Pir (1 ng/mL) a las cuales se les adicionó cantidades sucesivas del sensibilizador. La Figura 31 muestra los resultados obtenidos para ambos analitos.

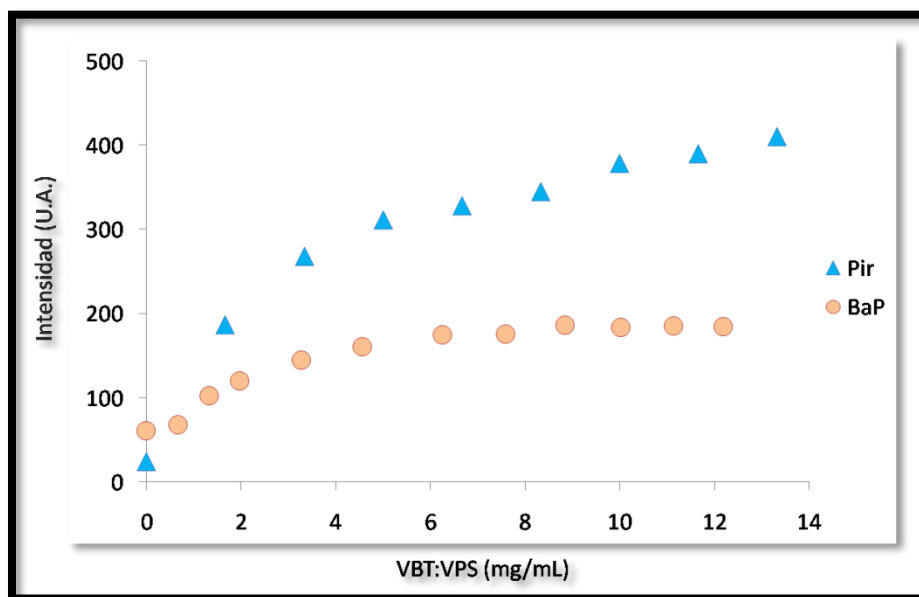


Figura 31. Curvas de saturación superpuestas para soluciones acuosas de VBT:VPS-BaP y VBT:VPS-Pir.

Como se concluyó en la sección anterior 9.1, para el BaP se observa que la señal satura a concentraciones mayores o iguales a 5 mg/mL de VBT:VPS; y que la señal de fluorescencia mejora en un factor aproximadamente de 3 (relación entre la señal mejorada y la señal del analito sin copolímero). En cambio, para el Pir se observa una saturación de la señal a concentraciones menores de copolímero (2 mg/mL) y un factor de exaltación bastante mayor, aproximadamente 10. Una posible explicación a esta notoria diferencia, es el tamaño menor del Pireno en relación al



BaP, lo cual le permite entremezclarse en las cadenas de polímero en mayor extensión, creando así múltiples interacciones no covalentes. Este fenómeno podría inducir un aumento de la rigidez estructural de la molécula y de su protección frente a procesos de desactivación no radiantes, provocando un aumento notable en la señal fluorescente.

A partir de los resultados obtenidos en este análisis, se decidió utilizar para las experiencias siguientes una concentración de VBT:VPS de 2 mg/mL. De esta manera se evita saturar la señal de fluorescencia cuando se trabaja con ambos analitos y con la presencia de potenciales interferentes.

La Figura 32 muestra los gráficos de contorno de las MEEFs correspondientes a cuatro muestras diferentes: Solución acuosa de BaP y Pir; solución acuosa de VBT:VPS; solución acuosa de VBT:VPS con ambos analitos; y solución acuosa de VBT:VPS con ambos analitos y dos interferentes, ACE y ANT. Es importante señalar que los espectros de los analitos e interferentes son muy similares y se superponen. Por lo tanto, es razonable aplicar el análisis quimiométrico con la “ventaja de segundo orden” a datos experimentales que contienen estos compuestos. En la literatura se encuentran varios ejemplos sobre el uso de este análisis (PARAFAC) en MEEF en los que el algoritmo pudo cuantificar contaminantes orgánicos en muestras de agua [99-103]; sin embargo, la innovación de este trabajo reside en el desarrollo de un algoritmo (PARAFAC) para datos de fluorescencia sensibilizados con el copolímero VBT:VPS.

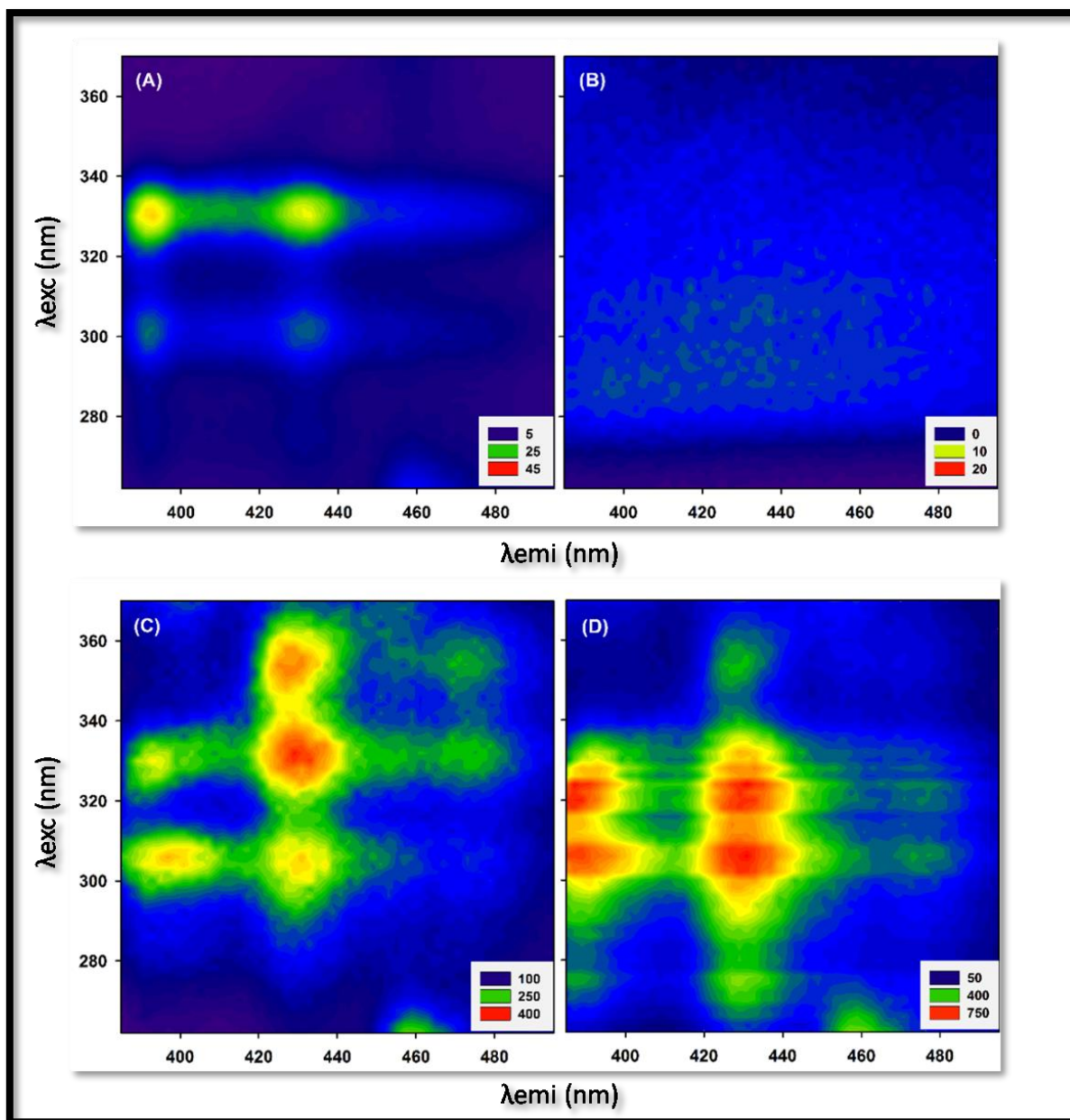


Figura 32. MEEFs correspondientes a las muestras: (A) Solución acuosa de BaP (5 ng/mL) y Pir (1 ng/mL); (B) Solución acuosa VBT:VPS (2mg/mL); (C) Solución acuosa de BaP, Pir y VBT:VPS (5 ng/mL, 1 ng/mL y 2 g/mL, respectivamente); y (D), misma solución del copolímero con analitos más los interferentes ACE (50 ng/mL) y ANT (100 ng/mL).



9.2.2 Tratamiento quimiométrico de las muestras

El algoritmo PARAFAC se aplicó utilizando como restricción la no negatividad en los tres modos instrumentales, ayudando a la convergencia de un modelo más realista mediante el uso de conocimientos previos (no son posibles los espectros ni las concentraciones negativas). El inicio del algoritmo se realizó con los mejores perfiles obtenidos después de una pequeña cantidad de ejecuciones de prueba. Para determinar efectivamente el número de componentes responsables de la señal analítica, se llevaron a cabo y se analizaron los residuos del modelo en función del número creciente de componentes o factores [3, 4, 54, 57, 58, 88, 92, 93, 99, 100]. La descomposición por PARAFAC de las matrices, correspondientes a las muestras de calibración y las de validación (muestras que solo contienen analitos), mostró que tres componentes explicaban consistentemente el conjunto de datos con un 95% de confianza. Siguiendo el mismo criterio, para las muestras de prueba se encontraron cinco componentes, los dos componentes adicionales corresponden a los interferentes ACE y ANT.

En la Figura 33 se observan los espectros de fluorescencia de excitación y emisión de las siguientes muestras: A) soluciones acuosas de BaP y Pir superpuestas (5 ng/mL y 1 ng/mL, respectivamente); B) soluciones acuosas de VBT:VPS (2 mg/mL) con BaP (5 ng/mL), VBT:VPS con Pir (1 ng/mL) superpuestas y el espectro puro del copolímero (figura como VBT). Además, en la gráfica C) se muestran los perfiles recuperados por PARAFAC para la solución formada por VBT:VPS 2 mg/mL con BaP (5 ng/mL), Pir (1 ng/mL) y los interferentes ACE (50 ng/mL) y ANT 100 (ng/mL).

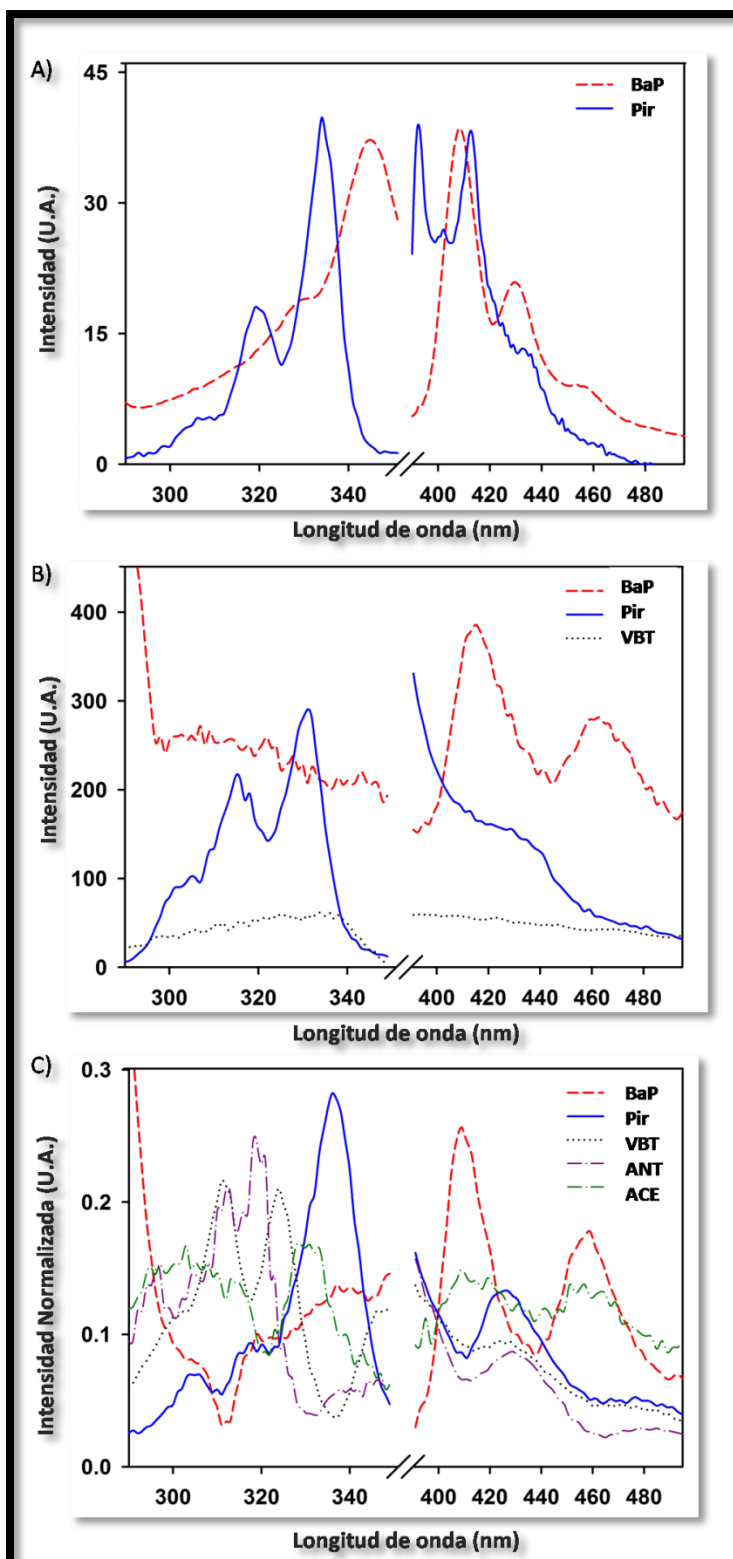


Figura 33. A) Espectros superpuestos para soluciones acuosas de BaP y Pir; B) Espectros superpuestos para soluciones de VBT:VPS con BaP, VBT:VPS con Pir y VBT:VPS puro (figura como VBT); y C) perfiles recuperados por el modelo para una solución acuosa con VBT:VPS, BaP, Pir, ACE y ANT. Donde dice VBT corresponde al copolímero VBT:VPS.



9.2.3 Desempeño analítico de los métodos

En la Tabla 2 se muestran las cifras de mérito analíticas (calculadas según la ref. [104]) para la determinación de BaP y Pir en muestras de validación y de prueba. En general, el desempeño de PARAFAC fue satisfactorio, siendo más confiable la cuantificación de Pir, dado que el parámetro de sensibilidad fue de diez veces mayor para este analito. A pesar de la notable superposición espectral entre los analitos (como se observa en la Figura 33), el método fue selectivo para ambos. El parámetro de selectividad varía entre 0, para un sistema enteramente no selectivo, y 1 para un sistema completamente específico [57]. Como puede observarse, los valores de este parámetro fueron satisfactorios para ambos compuestos, lo que indica que es posible alcanzar la ventaja quimiométrica de segundo orden. Finalmente, respecto al análisis entre ambos métodos, es importante mencionar que las cifras de mérito analíticas para el método de referencia (que pueden verse en la Tabla 3) fueron comparables a las logradas con el procesamiento PARAFAC, lo que indica que nuestro método es una opción confiable para la cuantificación de BaP y Pir a niveles de trazas.

Tabla 2. Cifras de mérito analíticas para la determinación de BaP y Pir en muestras de validación y de prueba estimadas por PARAFAC.

Muestras de validación ^a	BaP	Pir
Sensibilidad (mL/ng) ^c	274	2200
γ (mL/ng) ^d	48	366
Selectividad ^e	0,78	0,89
Límite de detección (ng/mL) ^f	0,10	0,06
Límite de cuantificación (ng/mL) ^g	0,29	0,20
Muestras de prueba ^b	BaP	Pir
Sensibilidad (mL/ng) ^c	198	1260
γ (mL/ng) ^d	71	454
Selectividad ^e	0,71	0,61
Límite de detección (ng/mL) ^f	0,11	0,06
Límite de cuantificación (ng/mL) ^g	0,34	0,20

^aNúmero de muestras = 10 (analitos).

^bNúmero de muestras = 20 (analitos e interferentes).

^cSensibilidad, señal neta del analito en unidades de concentración [104].

^dSensibilidad analítica (calculada = sensibilidad/ruido instrumental).

^eSelectividad, cociente entre la sensibilidad y un valor de sensibilidad hipotético para el analito puro.

^fLímite de detección, calculado acorde a la ref. [104].

^gLímite de cuantificación, definido = (10/3,3) x Límite de detección.



Tabla 3. Cifras de mérito analíticas correspondientes a las curvas de calibración por el método de referencia HPLC-FD para estándares de BaP y Pir.

Analito	BaP	Pir
Pendiente ^a	2,99 (0,02)	11,46 (0,27)
Ordenada al origen	0,95 (0,90)	5,91 (3,92)
($S_{y/x}$) ^b	1,90	7,85
(γ^{-1}) ^c	0,64	0,68
F_{exp} ^d	0,93	1,01
p ^d	0,55	0,51
D.E.R. (N = 3) ^e	1,13 [40 ng/mL]	13,11 [17 ng/mL]
Límite de detección (ng/mL) ^f	2,49	2,71
Límite de cuantificación (ng/mL) ^g	7,03	7,66

El número de datos para cada curva de calibración corresponde a cinco niveles de concentración diferentes, con tres réplicas para cada nivel ($n = 15$).

^aEs equivalente a la sensibilidad. Entre paréntesis los desvíos estándares correspondientes.

^bDesvíos estándar residuales [105].

^cInverso de la sensibilidad analítica en mmol/L y representa la diferencia de concentración mínima que puede medirse.

^dLa prueba F define a $F_{exp} = (S_{y/x})^2 / (s_y)^2$, donde s_y es la estimación del ruido instrumental. El valor de F_{exp} se compara con $F_{\alpha, M-2, M-P}$, donde M es el número de mediciones en los P puntos de calibración y α es el intervalo de confianza (en nuestro caso, $M = 15$, $P = 5$, por lo tanto $F_{crit} = 2,89$).

^eD.E.R. = Desviación estándar relativa (%) para las concentraciones entre corchetes.

^fLímite de detección en ng/mL, calculado acorde a la ref. [104].

^gLímite de cuantificación en ng/mL, definido = $(10/3,3) \times$ Límite de detección.

El siguiente paso consistió en evaluar la capacidad predictiva de los métodos. Para lo cual, los resultados obtenidos utilizando el modelo PARAFAC (para muestras de validación y de prueba) se compararon estadísticamente con el método de referencia (HPLC-FD) mediante una *prueba t de Student pareada* [105]. En la Tabla 4 se muestran los valores *t experimental* para el BaP y el Pir, correspondiente a cada método y conjunto de muestras. Además, se reporta el error relativo de predicción (REP por sus siglas en inglés, *relative error of prediction*) y el error estándar cuadrático medio de predicción (RMSEP, por *root-mean-standard error of prediction*) para cada analito. En todos los casos, los valores *t experimental* fueron menores que los valores *t críticos* para $n-1$ grados de libertad, con un nivel de confianza del 95%. Estos resultados, indican que no hay una diferencia significativa entre las concentraciones predichas por nuestro modelo asistido quimiométricamente, y las concentraciones calculadas por el método de referencia. El uso de los errores (RMSEP) para evaluar la precisión de la predicción de una calibración determinada, no es



suficiente para indicar si un método tiene un mejor rendimiento analítico que otro. Una prueba estadística adecuada para realizar la comparación requerida, es la *prueba de aleatorización* propuesta por H. van der Voet [106, 107]; mediante esta prueba de comparación se concluye que no existen diferencias significativas entre ambos métodos.

Tabla 4. Estadísticas de las determinaciones de HPAs en diversos tipos de muestras. Comparación entre el método desarrollado (PARAFAC) y el de referencia (HPLC-FD).

Muestras de validación ^a				
	BaP		Pir	
	HPLC	PARAFAC	HPLC	PARAFAC
RMSEP ^c	0,01	0,03	0,03	0,02
REP ^d	1,82	4,07	5,14	3,65
t experimental ^e	0,41		0,13	
Prueba de RMSEP ^f	Valor de p = 0,083		Valor de p = 0,052	
Muestras de prueba ^b				
	BaP		Pir	
	HPLC	PARAFAC	HPLC	PARAFAC
RMSEP ^c	0,01	0,09	0,04	0,03
REP ^d	2,04	7,12	5,96	4,22
t experimental ^e	0,08		0,09	
Prueba de RMSEP ^f	Valor de p = 0,204		Valor de p = 0,357	

^aNúmero de muestras = 10

^bNúmero de muestras = 20.

^cRMSEP, Error estándar cuadrático medio de predicción en ng/mL.

^dREP, error relativo de predicción en %.

^eValores t críticos para n-1 grados de libertad con un nivel de confianza del 95% (n número de muestras evaluadas), son $t_{(0,05, 9)} = 1,833$ (muestras de validación) y $t_{(0,05, 19)} = 1,729$ (muestras de prueba).

^fPrueba de aleatorización para comparar valores de RMSEP. La hipótesis nula indica que el RMSEP del método de referencia y nuestro método son iguales, y la hipótesis alternativa indica que el RMSEP del nuestro método es mayor que el método de referencia. La hipótesis nula se rechaza si el valor de p es <0,05, lo que implica que los valores de RMSEP son estadísticamente diferentes y que existen diferencias significativas entre ambos métodos. En nuestro caso, la hipótesis nula no fue rechazada en ningún caso.

El análisis estadístico demuestra que PARAFAC presenta un mejor rendimiento, frente al método de referencia, en la determinación del Pir y BaP. Una diferencia adicional entre ambos métodos, es que cada ejecución de HPLC-FD implica 45 min por muestra y el uso de una gran cantidad de solvente orgánico, mientras que PARAFAC implica menos de 3 min por muestra y no requiere el uso de solventes orgánicos.



Finalmente, se aplicó la *prueba estadística de la región elíptica de confianza* (EJCR, por *elliptical joint confidence region*) para la pendiente y la ordenada al origen en la regresión de la concentración predicha frente a los valores nominales, tanto para las muestras de validación como para las muestras de prueba [108]. La Figura 34 muestra las concentraciones predichas por PARAFAC en función de los valores nominales de BaP y Pir, y las elipses correspondientes. Para la prueba de la elipse se utilizó un ajuste de cuadrados mínimos en los valores de concentración predichos y concentración nominal. Esta prueba respalda que no hay diferencia estadística significativa entre las concentraciones encontradas y las nominales, lo que sugiere que los compuestos agregados (ACN y ANT) no tienen una interferencia significativa en el análisis.

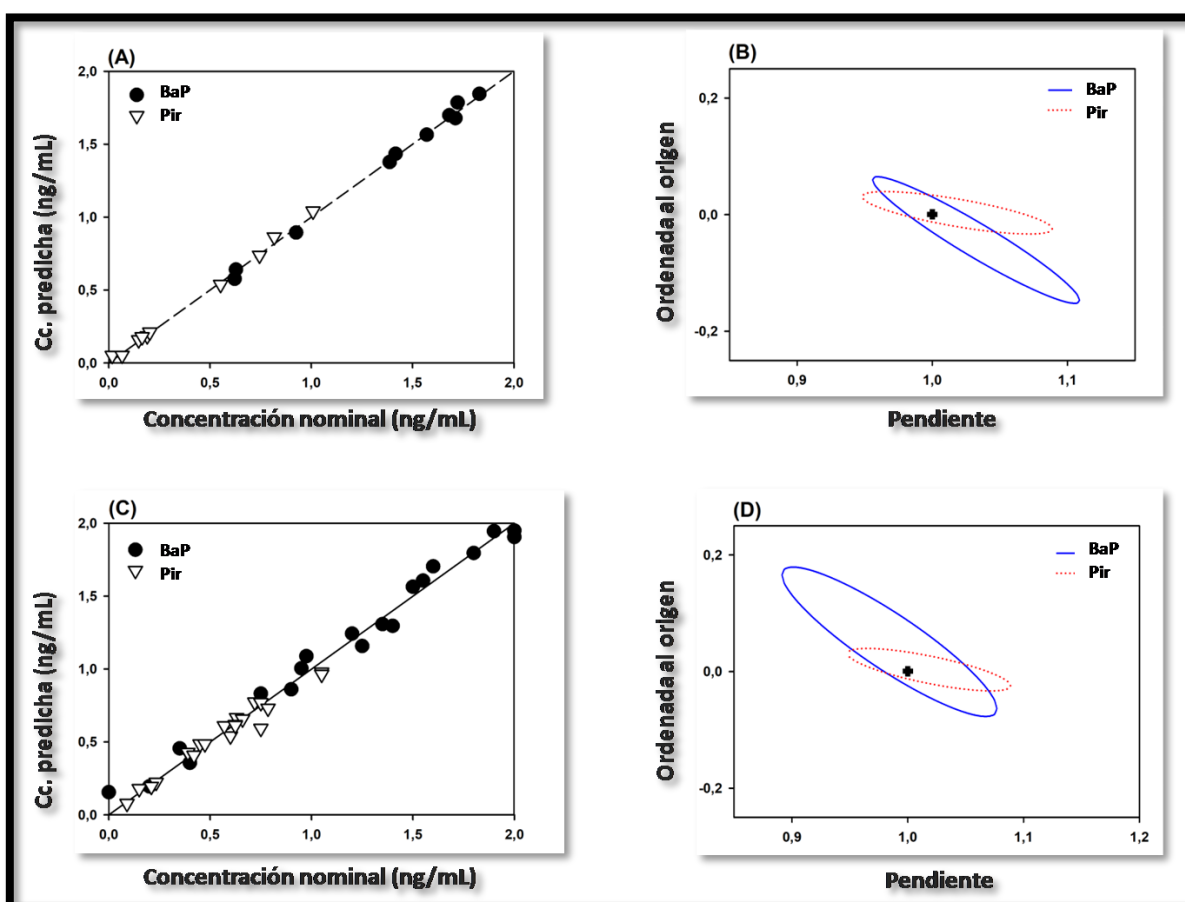


Figura 34. Gráficos de concentraciones predichas por PARAFAC en función de los valores nominales de BaP y Pir en las muestras de validación (A) y muestras de prueba -en presencia de interferentes- (C) y de las regiones elípticas (con un nivel de confianza del 95%) para la pendiente y la ordenada al origen de las regresiones (B y D, respectivamente). La cruz, en B y D, marcan el punto ideal (pendiente = 1, ordenada = 0).



9.2.4 Aplicación del método desarrollado en muestras de agua reales

En base al desempeño analítico satisfactorio (descrito anteriormente), se aplicó el nuevo método para determinar BaP y Pir en muestras de agua potable. La existencia de múltiples fuentes de origen de los HPAs hace que se encuentren diferentes cantidades de estos contaminantes en las aguas naturales [50, 51]. En las aguas superficiales, el contenido de BaP y Pir, puede variar desde ng/L hasta $\mu\text{g/L}$ [111]. Para el agua potable, la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (*US EPA*) estableció un nivel máximo de BaP de $0,2 \mu\text{g/L}$ [112]; y aunque para Pir no haya indicado una concentración específica, recomienda las cuantificaciones en los niveles más bajos posibles. Los límites de detección reportados en la Tabla 2 indican que el método desarrollado cumple con los requisitos solicitados por diferentes estándares.

Los experimentos preliminares mostraron que las muestras reales analizadas no contenían los analitos estudiados, al menos por encima de los límites de detección de las metodologías comparadas (es decir, HPLC-FD y MEEFs-PARAFAC). Por lo tanto, se enriquecieron las muestras de agua con los analitos, BaP y Pir y con posibles interferentes, ANT y ACE. Estos resultados se presentan en la Tabla 9.5. En la Figura 35 se muestra el gráfico para las concentraciones predichas por PARAFAC de BaP y Pir en función de los valores nominales, y la región elíptica (con un nivel de confianza del 95%) para la pendiente y la ordenada al origen de la regresión lineal.

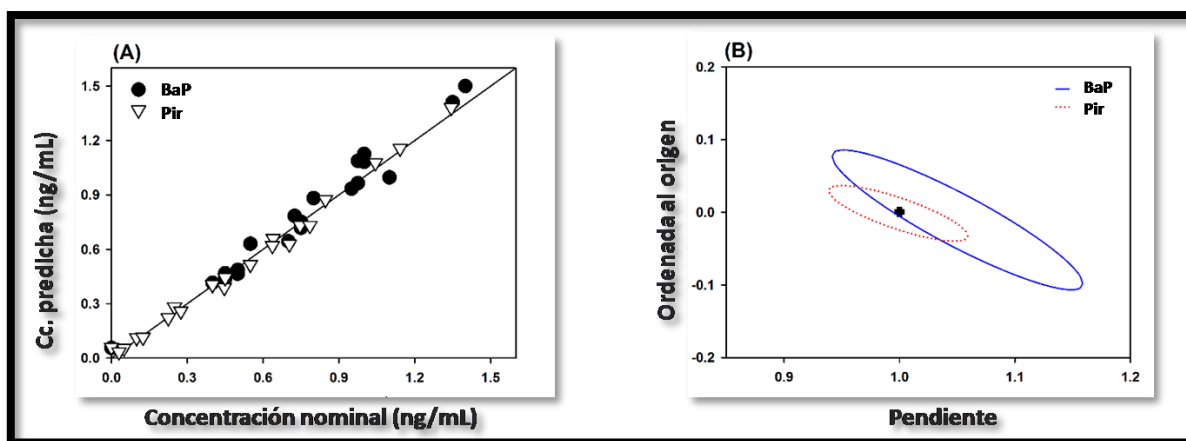


Figura 35. (A) Gráfico de concentraciones predichas por PARAFAC de BaP y Pir en función de los valores nominales para muestras reales de agua con ACN y ANT como interferentes. (B) Región elíptica (con un nivel de confianza del 95%) para la pendiente y la ordenada al origen de la regresión lineal. La cruz marca el punto teórico (pendiente = 1, ordenada al origen=0).

Como puede observarse en la Tabla 5, se analizaron los promedios de recuperación tanto del BaP como el Pir en muestras de agua a tres niveles de fortificación mediante la *prueba t de Student*. La hipótesis nula corresponde al 100% de recuperación y se rechaza cuando el valor de *t*



experimental es mayor al valor de *t crítico*. Los valores de *t* obtenidos para *n-1* grados de libertad con un nivel de confianza del 95% (donde *n* es el número de niveles evaluados), fueron menores que el valor correspondiente tabulado para la *t crítica*, $t_{(0,05, 2)} = 4,30$. Estos resultados indican que el método propuesto es adecuado para la determinación de los compuestos investigados. Además, demuestran que la posible presencia de HPAs no calibrados u otros compuestos orgánicos e inorgánicos en muestras de agua naturales no generará una interferencia significativa en el análisis.

Tabla 5 Estudio de recuperación (mediante PARAFAC) del BaP y el Pir en muestras de agua enriquecidas en presencia de posibles interferentes.

Muestras de agua ^a	BaP				Pir			
	Valor	Dup. ^b	Rec. (%)	t ^c	Valor	Dup. ^b	Rec. (%)	t ^c
zanja I	0,45	0,44 (0,01)	98	0,19	0,25	0,28 (0,02)	113	0,05
	0,55	0,63 (0,06)	115		0,28	0,26 (0,01)	94	
	1,10	1,00 (0,07)	91		0,55	0,52 (0,02)	94	
zanja II	0,50	0,49 (0,01)	97	0,59	0,05	0,05 (0,00)	108	0,11
	0,75	0,75 (0,00)	100		0,45	0,39 (0,04)	87	
	0,80	0,88 (0,06)	110		0,64	0,66 (0,01)	103	
río I	0,45	0,47 (0,01)	104	0,88	0,10	0,11 (0,01)	113	1,53
	0,75	0,72 (0,02)	96		0,40	0,40 (0,01)	101	
	1,00	1,13 (0,09)	113		0,85	0,87 (0,02)	103	
río II	0,40	0,42 (0,01)	104	1,07	0,13	0,11 (0,01)	91	0,87
	0,95	0,93 (0,01)	98		0,64	0,62 (0,01)	97	
	1,35	1,41 (0,04)	105		1,04	1,08 (0,02)	103	
río III	1,00	1,08 (0,06)	108	1,14	0,75	0,73 (0,01)	98	0,46
	1,40	1,36 (0,03)	97		1,14	1,16 (0,01)	101	
	1,60	1,70 (0,07)	107		1,34	1,38 (0,03)	103	
agua de red I	0,00	0,06 (0,04)	N.A.	1,29	0,00	0,06 (0,04)	N.A.	1,44
	0,70	0,64 (0,04)	92		0,23	0,22 (0,00)	98	
	0,98	0,97 (0,01)	99		0,70	0,63 (0,05)	99	
agua de red II	0,50	0,47 (0,02)	93	0,75	0,03	0,03 (0,01)	113	0,22
	0,73	0,78 (0,04)	108		0,45	0,44 (0,01)	98	
	0,98	1,09 (0,08)	112		0,79	0,73 (0,04)	93	

N.A.: no aplicable.

^aMuestras de agua: zanja I, agua de zanja de la ciudad de Pérez, Santa Fe, Argentina. Zanja II: agua de zanja de la ciudad de Rosario, Santa Fe, Argentina. Río I: agua del río Paraná de la ciudad de Rosario, Santa Fe, Argentina. Río II: agua del río Paraná de la ciudad de Paraná, Entre Ríos, Argentina. Río III: agua del río Paraná de la ciudad de San Lorenzo, Santa Fe, Argentina. Agua de red I: agua de red de la ciudad de La Plata, Buenos Aires, Argentina. Agua de red II: agua de red de la ciudad de Rosario, Santa Fe, Argentina.

^bMedia de duplicados. Entre paréntesis el desvío estándar.

^cValores *t* Student para el promedio de los valores de Recuperación. Valor de *t* crítico para *n-1* grados de libertad (con un nivel de confianza del 95%), es $t_{(0,05, 2)} = 4,30$.



Finalmente, se realizó la *Eco-Escala* analítica según la ref. [4], por medio de una interfaz gráfica creada en MATLAB siguiendo las pautas propuestas. De esta manera se evaluó qué técnica es más ecológica, si el método de referencia o el nuevo método desarrollado. En dicha evaluación, se asignaron puntos de penalización a los parámetros de un proceso analítico que no concuerdan con el análisis verde ideal. Las *Eco-Escalas* calculadas para ambos métodos se presentan en la Tabla 6.

Tabla 6. *Eco-Escalas*. Puntos de penalización (PP) para determinaciones de BaP y Pir utilizando MEEFs-PARAFAC y HPLC-FD.

	MEEFs-PARAFAC				HPLC-FD			
	PPs ^a	Cantidad	Riesgo	Sub-Total PPs ^b	PPs ^a	Cantidad	Riesgo	Sub-Total PPs ^b
Reactivos								
Agua	0			0	0			0
Metanol	1	<10mL	1	1	-	-	-	-
Hexano	-	-	-	-	2	10-100 mL	4	8
Acetonitrilo	-	-	-	-	2	10-100 mL	2	4
Cartuchos C ₁₈	-	-	-	-	2	10-100 g	0	0
Instrumentos								
Energía	0	<0,1 Kwh		0	1	0,1-1,5 Kwh		1
Riesgo Lab. ^c	0			0	0			0
Residuos	3	1-10 mL	3	9	5	>10mL	5	25
Total de PPs				10				38
Puntaje Eco-Escala^d				90				62

^aPPs: puntos de penalización.

^bEl Sub-Total PPs se calculó: multiplicando PPs x Riesgo.

^cRiesgo Lab.: riesgo laboral.

^dPuntaje Eco-Escala: el puntaje de la escala analítica se calculó restando al total de 100 la suma de los puntos totales de penalización.

Para más detalles sobre los puntos de penalización asignados sugerimos revisar la ref. [4]

De acuerdo con la clasificación propuesta, nuestro método representa un excelente análisis verde (10 puntos de penalización sobre un total de 100); mientras que el método de



referencia representa un análisis aceptable (38 puntos de penalización). En consecuencia, podemos afirmar que el método propuesto (basado en fluorescencia sensibilizada y análisis quimiométrico de datos) es un procedimiento simple que cumple con la mayoría de los requisitos de la química analítica verde. Además, los copolímeros utilizados (VBT-VPS) son materiales ecológicamente benignos, no tóxicos, solubles en agua, con un porcentaje de biodegradabilidad, y que requieren bajas energías para su procesamiento [113].



9.3 MICELAS DE COPOLÍMERO EN BLOQUE

9.3.1 Análisis de la síntesis del copolímero en bloque

Una vez realizada la síntesis del copolímero en bloque se controló su formación mediante espectroscopia de RMN de ^1H verificándose la ausencia de monómeros sin reaccionar. La señal típica del grupo vinilo, desplazamiento químico que se observa entre 5 y 6 ppm, es la perteneciente a los monómeros. En la Figura 36 se observa el espectro del homopolímero de VPS, y en la Figura 37 el espectro del copolímero completo VBT-b-VPS. En ninguno se observó la señal típica del grupo vinilo.

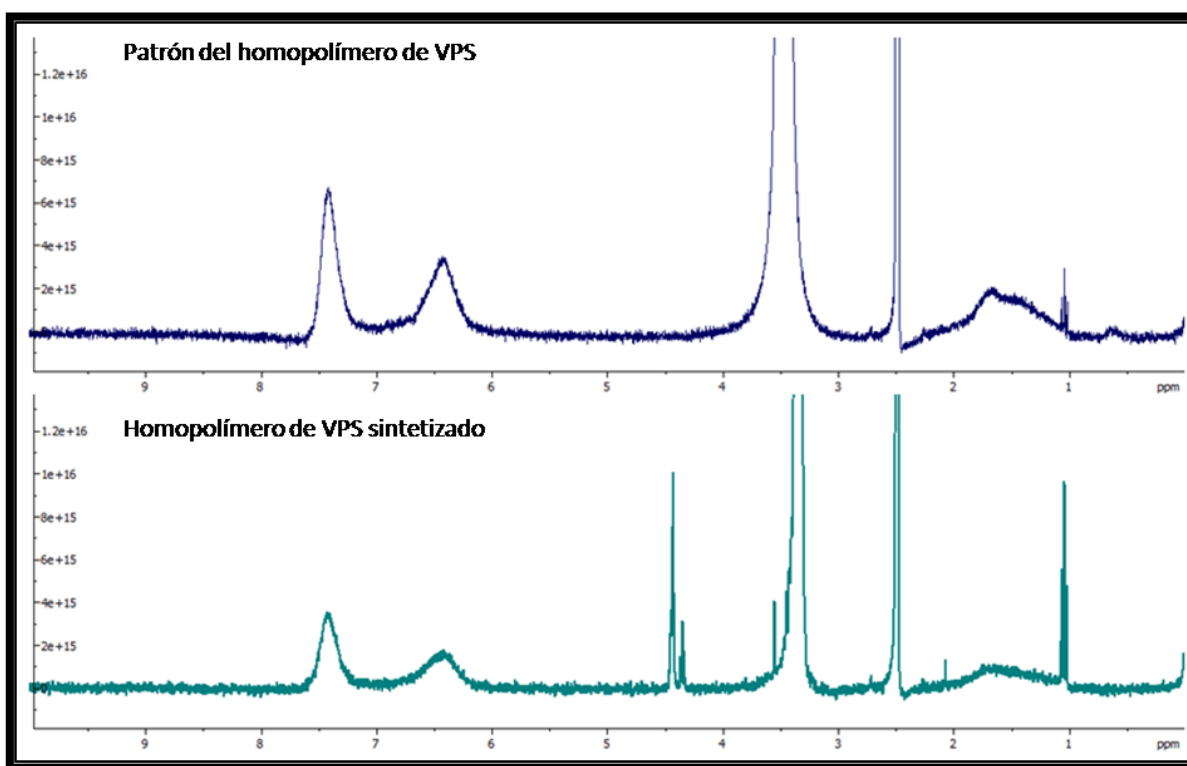


Figura 36. Espectros de RMN. El espectro superior pertenece al patrón del homopolímero de VPS (patrón PPS de Jordi Labs). El espectro inferior pertenece al bloque de VPS sintetizado.

Se observa de la Figura 36 que los espectros del homopolímero de VPS, ya sea el patrón o el sintetizado, no presentan diferencias significativas. La Figura 37, en la cual se comparan los espectros de VBT-b-VPS, tampoco presenta diferencias significativas. Salvo por una señal entre 4 y 5 ppm que aparece en los espectros sintetizados que se atribuye al etilenglicol (solvente utilizado para la síntesis).

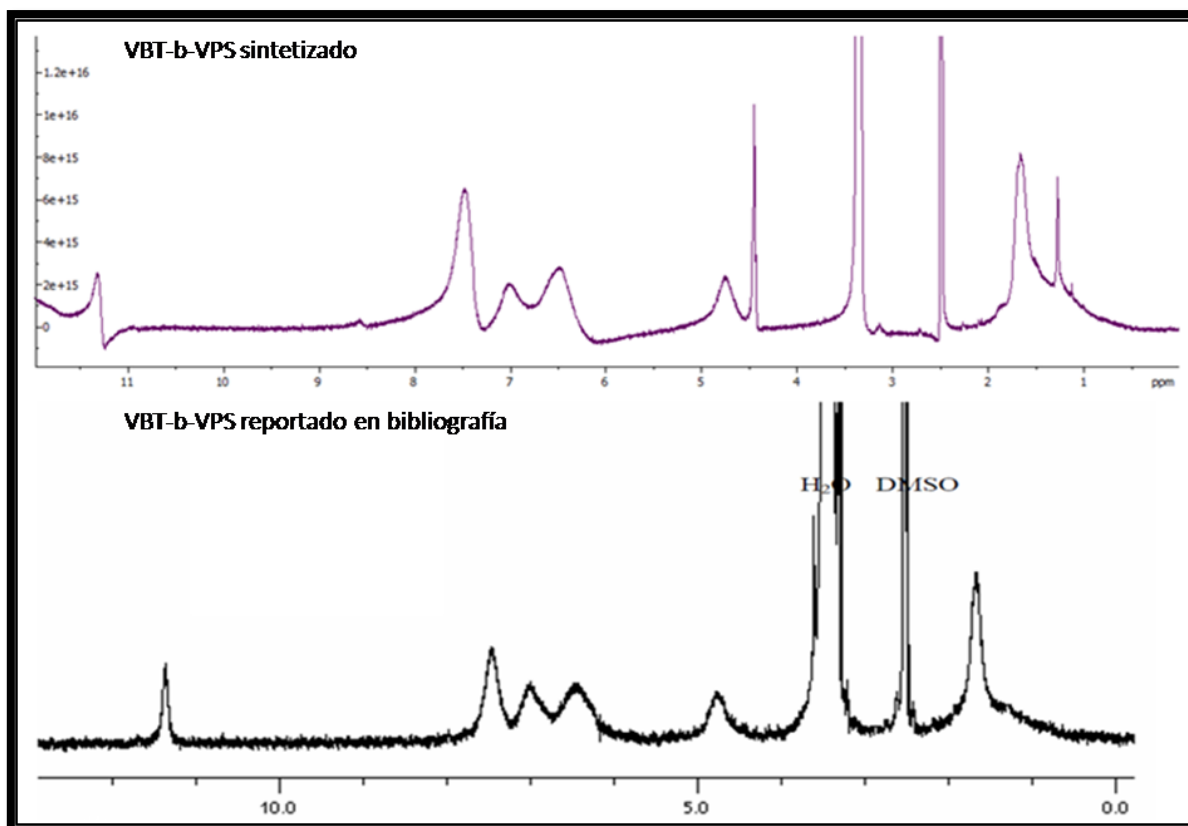


Figura 37. Espectros de RMN. El espectro superior pertenece al VBT-b-VPS sintetizado. El espectro inferior pertenece al VBT-b-VPS reportado en bibliografía [25].

El M_n y el M_w del copolímero en bloque se determinaron mediante cromatografía de exclusión por tamaño utilizando una curva de calibración realizada con los patrones de sal sódica de poliestireno sulfonato. En la Figura 38 se presentan los cromatogramas obtenidos para los patrones y el copolímero. Los valores obtenidos fueron $M_n = 141000$ Da, $M_w = 362000$ Da y $D = M_w/M_n = 2,56$, muy similares a los valores reportados en bibliografía (ver ref. [25]). El valor de D , también resultó aceptable para el tipo de polimerización utilizada (por radicales libres) donde el crecimiento de las cadenas no se puede controlar fácilmente.

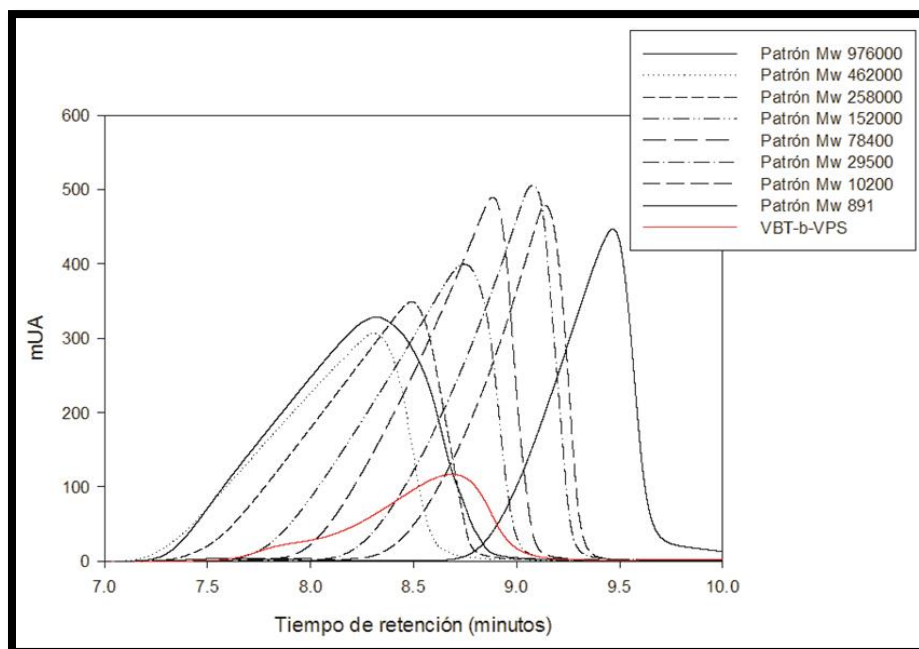


Figura 38. Cromatogramas obtenidos para los patrones y el copolímero en bloque.

9.3.2 Análisis de las micelas de VBT-b-VPS

En la Figura 39 se muestra un esquema del proceso de formación de las micelas. En primer lugar, el copolímero se disuelve completamente en DMSO y a continuación, mediante diálisis se lleva a cabo el intercambio de solvente y se sustituye el DMSO por agua. Debido a la baja afinidad de los segmentos de VBT en agua y a la alta solubilidad de los segmentos de VPS el copolímero al alcanzar cierta concentración (micelar crítica) tiende a auto-ensamblarse formando micelas.

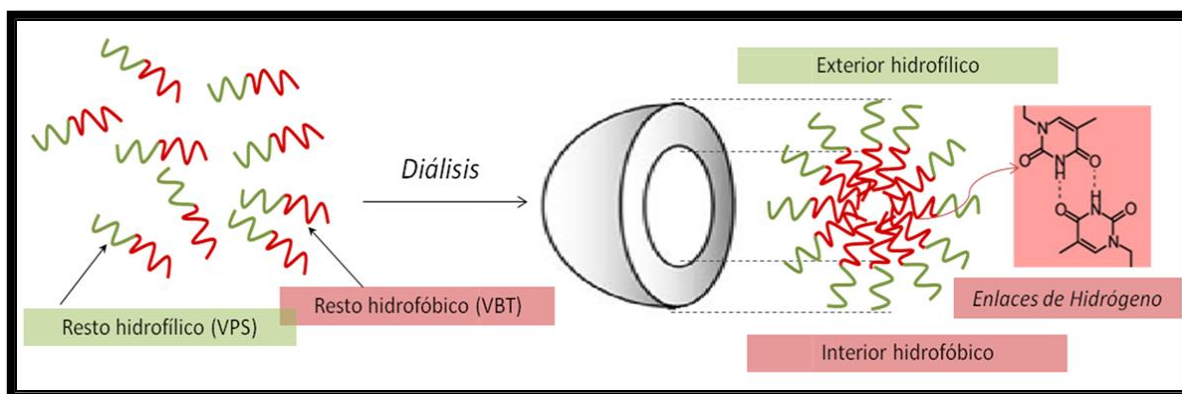


Figura 39. Esquema del proceso de formación de las micelas de VBT-b-VPS.

Parte de la caracterización de las micelas consistió en medir su diámetro, mediante DLS, en diversas soluciones acuosas de concentraciones micelares diferentes. El diámetro promedio



(dp) con sus correspondientes desviaciones estándar (σ), resultantes del modelo utilizado por el software del equipo [89], se resumen en la Tabla 7.

Tabla 7. Diámetros promedios y desvíos estándares de las soluciones micelares.

VBT-b-VPS mg/mL	dp ^a (nm)	σ^b (nm)
2,7000	113,5	60,5
2,0250	113,3	60,0
0,6750	109,2	73,4
0,4050	161,5	88,7
0,1350	-	-
0,0135	-	-

^adp= diámetro promedio
^b σ = desvío estándar

Como puede observarse para las soluciones más concentradas (2,7000 mg/mL, 2,0250 mg/mL y 0,6750 mg/mL) los valores de los diámetros promedios y sus desvíos son muy similares entre sí. Para la solución micelar de concentración 0,4050 mg/mL el valor del diámetro promedio y su desvío estándar aumentan respecto de los valores anteriores. Lo mismo se observó en las soluciones más diluidas. Estos datos -no informados- presentaron una amplia variabilidad entre cada repetición de una misma muestra, oscilando entre 0 y 6000 nm, con valores de σ muy grandes. Estos resultados erróneos pueden explicarse ya que en estas soluciones la concentración está por debajo de la CMC y en consecuencia, no hay agregados micelares para que el equipo determine su tamaño.

Para determinar la CMC utilizando como sonda el colorante AM se monitoreó el cambio en los espectros de absorción del colorante como consecuencia de sus interacciones con las micelas y las cadenas de copolímero sin micelar. En la Figura 40 se observa el espectro de absorción de una solución acuosa de AM, el cual presenta una señal de mayor intensidad a 662 nm y otra de menor intensidad a 610 nm. El AM interacciona electrostáticamente con polielectrolitos de carga opuesta; por lo tanto, los posibles corrimientos espectrales en las señales del colorante sugieren cambios en la polaridad de la matriz, y en el grado de compartimentación del sistema microheterogéneo [61]. En la Figura 41, se muestran los espectros de absorción para diferentes soluciones micelares barriendo un rango de concentración de 0,0135 mg/mL hasta 2,7000 mg/mL, y manteniendo la misma concentración de AM (1×10^{-3} M) para todas las soluciones.

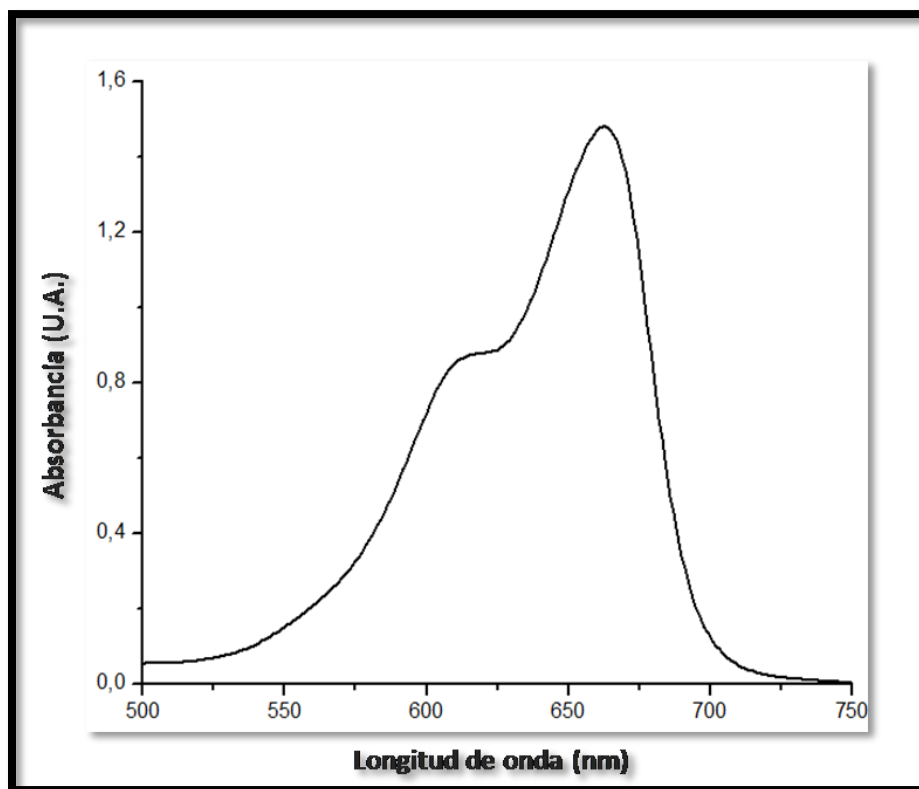


Figura 40. Espectro de absorción de una solución acuosa 1×10^{-3} M de AM.

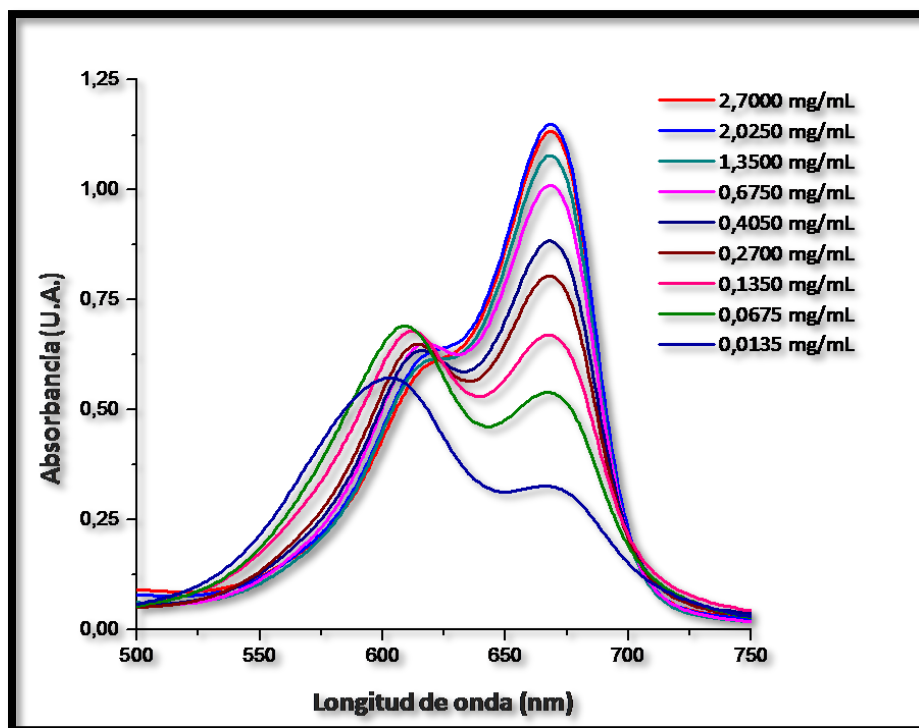


Figura 41. Espectros de absorción de soluciones formadas por AM 1×10^{-3} M y diferentes concentraciones de solución micelar (desde 2,7000 mg/mL a 0,0135 mg/mL).

Como se observa en la Figura 41, con la disminución progresiva de la concentración del copolímero en bloque la señal máxima de absorción del AM a 662 nm decrece, y empieza a crecer la señal de menor intensidad a 610 nm. A su vez, este pico (610 nm) sufre un corrimiento a longitudes de onda menores. A 625 nm se observa un punto isosbético que indica la existencia de dos tipos de asociación ente el colorante y el copolímero [61]. Este cambio espectral en el colorante es una evidencia del cambio en la polaridad de la matriz en la cual se encuentra. La Figura 42 representa la evolución de las señales de absorción, a 610 y 662 nm, en función de la Concentración Micelar (CM) del copolímero en bloque. Como se observa a medida que aumenta la concentración de copolímero aumenta la absorción a 662 nm mientras que disminuye a 610 nm. La CMC se estimó, siguiendo la técnica reportada en bibliografía [61], a partir del punto de intersección de ambas curvas (mostrado en la figura como CMC), el valor resultante fue 0,1517 mg/mL.

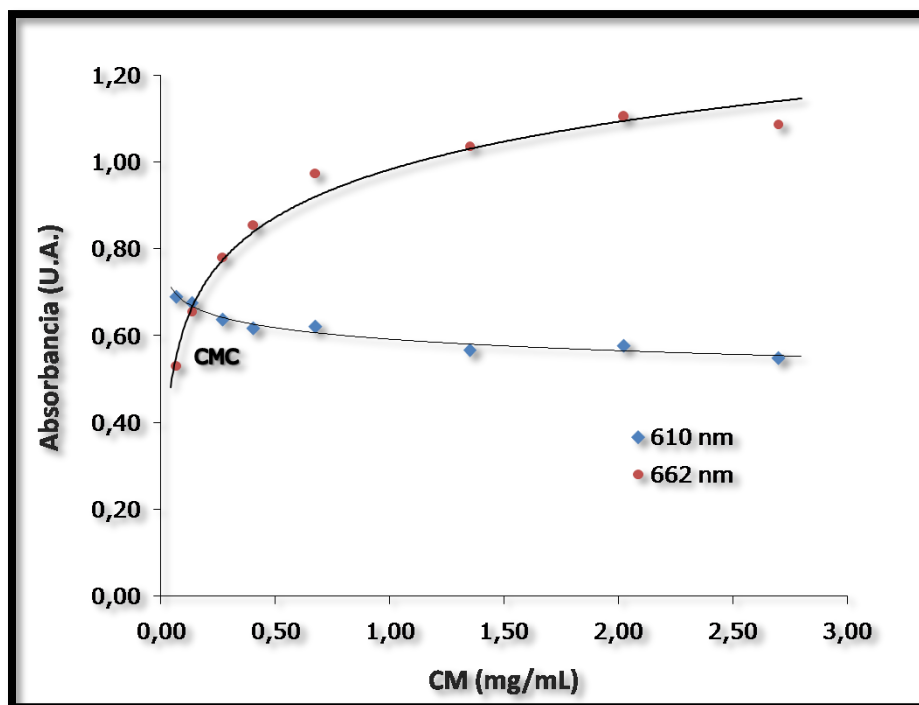


Figura 42. Evolución de la absorbancia del AM, a 610 y 662 nm, en función de la CM.

En el segundo método la CMC se estimó mediante espectroscopía de fluorescencia usando como sonda el Pireno. La concentración final de Pir en cada muestra fue de 0,12 mg/L y la concentración final de la solución micelar osciló entre 0,0068 mg/mL a 1,3500 mg/mL. En este método se decidió utilizar concentraciones menores ya que se contaba con una estimación de la CMC por el método antes presentado. A continuación, se presentan y analizan tanto los espectros de excitación como de emisión para cada solución.

En la Figura 43 se observan los espectros de excitación obtenidos para cada muestra. El perfil del espectro de excitación de fluorescencia del Pir (línea de trazo negro continua) cambia en presencia de la solución micelar del copolímero en bloque, y este cambio se acentúa al aumentar la concentración de la misma. El Pir en medio acuoso presenta una señal de fluorescencia intensa a 331 nm y, en medio micelar, esa señal sufre un corrimiento de 8 nm presentando un máximo de intensidad a 339 nm. Para las señales de fluorescencia que aparecen entre los 220 y 280 nm el cambio es más drástico, ya que en el medio micelar se apagan completamente. Como consecuencia, se midieron los espectros de emisión a dos longitudes de onda, a 331 y 339 nm.

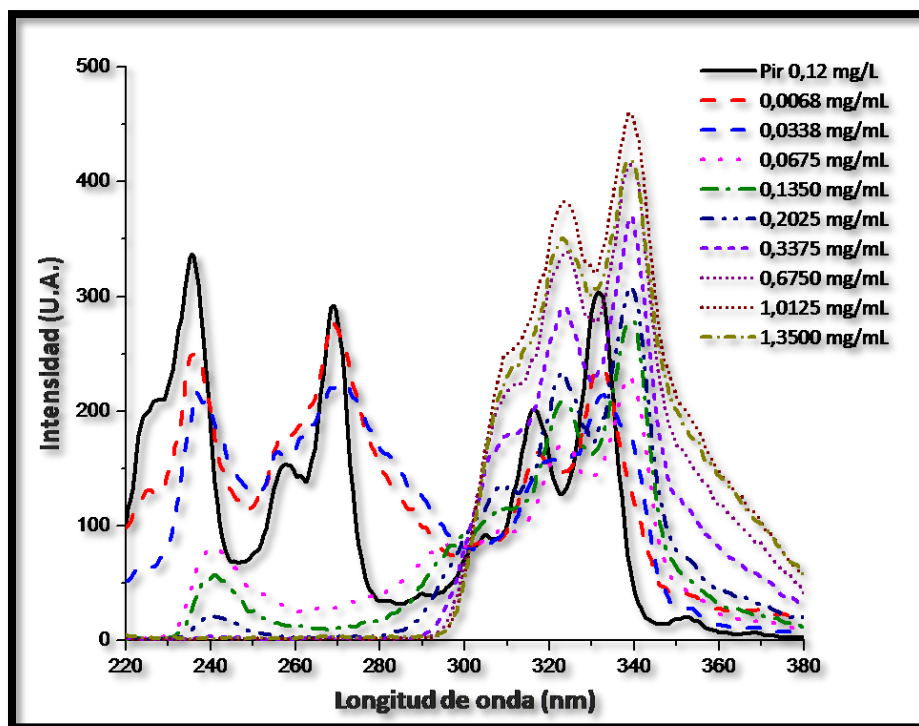


Figura 43. Espectros de excitación de fluorescencia de soluciones formadas por Pir 0,12 mg/L y diferentes concentraciones de solución micelar (desde 0,0068 mg/mL a 1,3500 mg/mL). El espectro de Pir es la línea de trazo negro continua.

La Figura 44 presenta los espectros de emisión de fluorescencia del Pir excitando a 331 nm. En concordancia con lo discutido recientemente, se observa que la intensidad de fluorescencia disminuye conforme disminuye la concentración micelar, exhibiendo este comportamiento hasta la muestra que presenta una CM igual a 0,1350 mg/mL; y luego, para las soluciones restantes (de menor CM) la intensidad comienza a incrementarse aunque la concentración del copolímero disminuya. En la Figura 45 se presentan los espectros de emisión del Pir excitando a 339 nm. La emisión de fluorescencia de la sonda va incrementando su intensidad conforme aumenta la concentración de la solución micelar. Estos perfiles de emisión presentan dos intensidades de fluorescencia máxima una a 370 nm, y otra, a 392 nm.

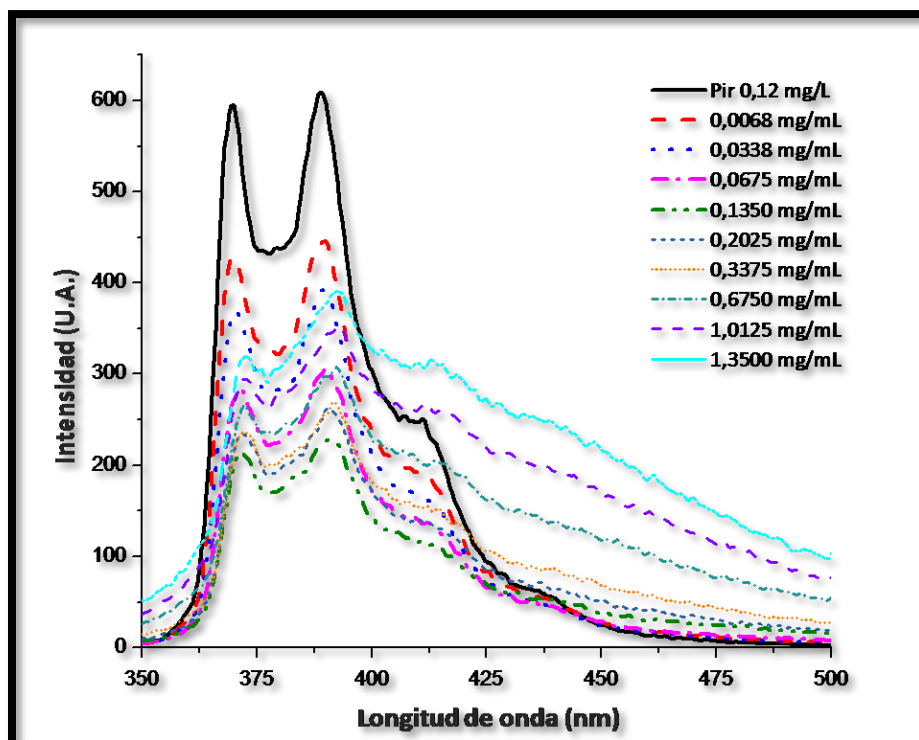


Figura 44. Espectros de emisión de fluorescencia (excitando a 331 nm) para soluciones micelares de diferentes concentración con Pir.

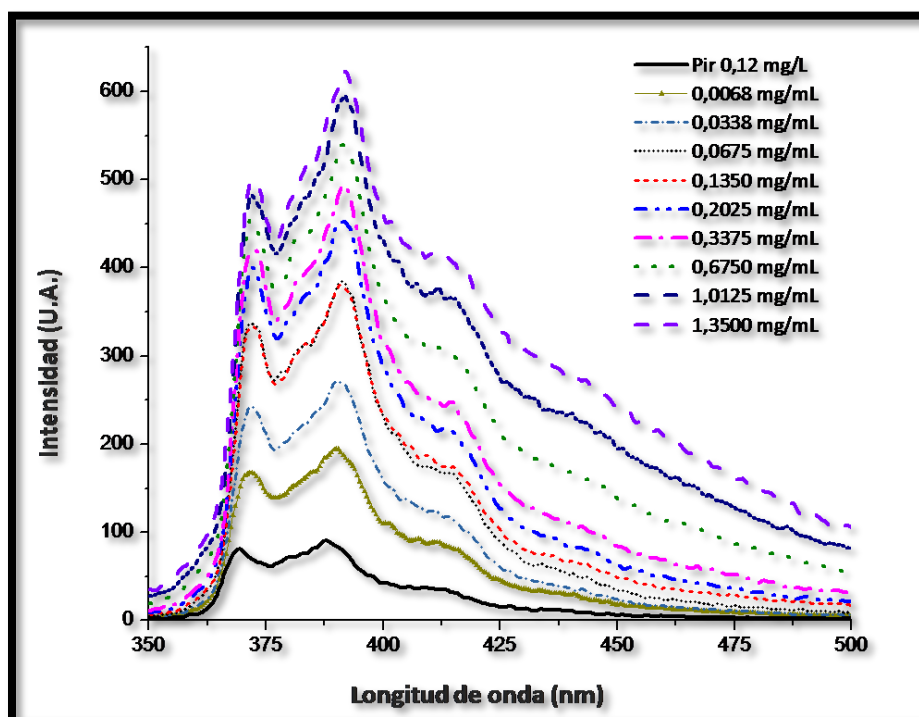


Figura 45. Espectros de emisión de fluorescencia (excitando a 339 nm) para soluciones micelares de diferentes concentración con Pir.



En la Figura 46 se graficó la intensidad de la emisión del Pir a 392 nm en función de la CM. Como puede observarse, los datos se ajustan a una curva logarítmica (curva trazada en negro) y la CMC estimada fue de 0,1687 mg/mL, siguiendo la técnica reportada en bibliografía [25]. Este valor concuerda con el estimado por el método (0,1517 mg/mL) que utiliza como sonda AM.

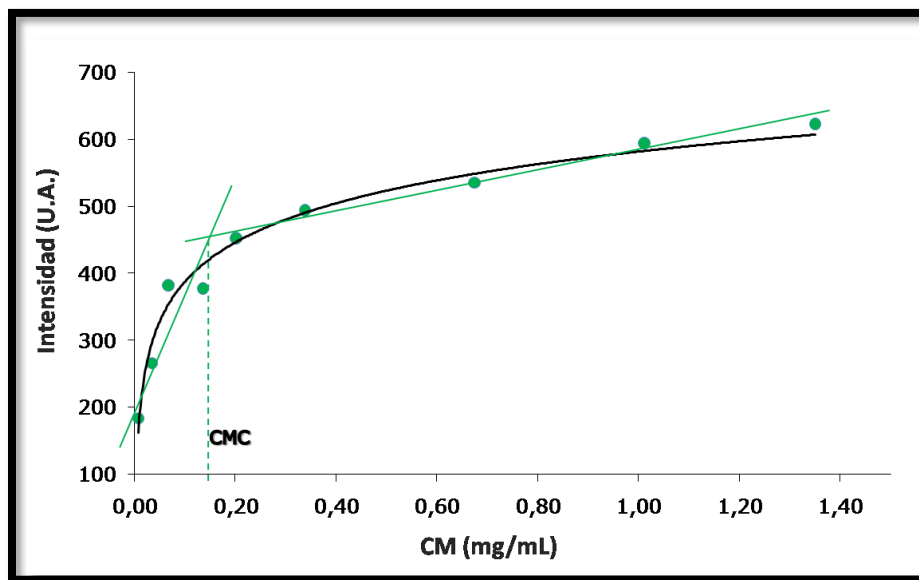


Figura 46. Intensidad de emisión de fluorescencia de la sonda en función de la CM.

9.3.3 Interacción entre las micelas de VBT-b-VPS y HPA

Para corroborar si la interacción no covalente (Hp- π) entre el copolímero y los contaminantes sucede aun cuando las cadenas de copolímero se auto-ensamblan formando micelas, y si efectivamente los contaminantes son retenidos en su interior, se realizó un experimento sencillo en el cual se evaluó la estabilidad de las soluciones de uno de los analitos (Pir).

Debido a la baja solubilidad de Pir en agua, aproximadamente $6 \times 10^{-7} \text{M}$ ($\sim 0,12 \text{ mg/L}$) [114], las sondas de Pir para determinar la CMC tenían una estabilidad muy corta en función del tiempo. Pasada varias horas de su preparación el Pir precipitaba. Al comparar los espectros de emisión de fluorescencia de una misma solución de Pir, medidos con 24 horas de diferencia, se observó que la intensidad disminuía considerablemente. Esto puede explicarse dado que las moléculas del analito en agua se encuentran en un ambiente hostil, se agregan entre ellas y precipitan. Estos resultados se observan en la Figura 47 y 48.

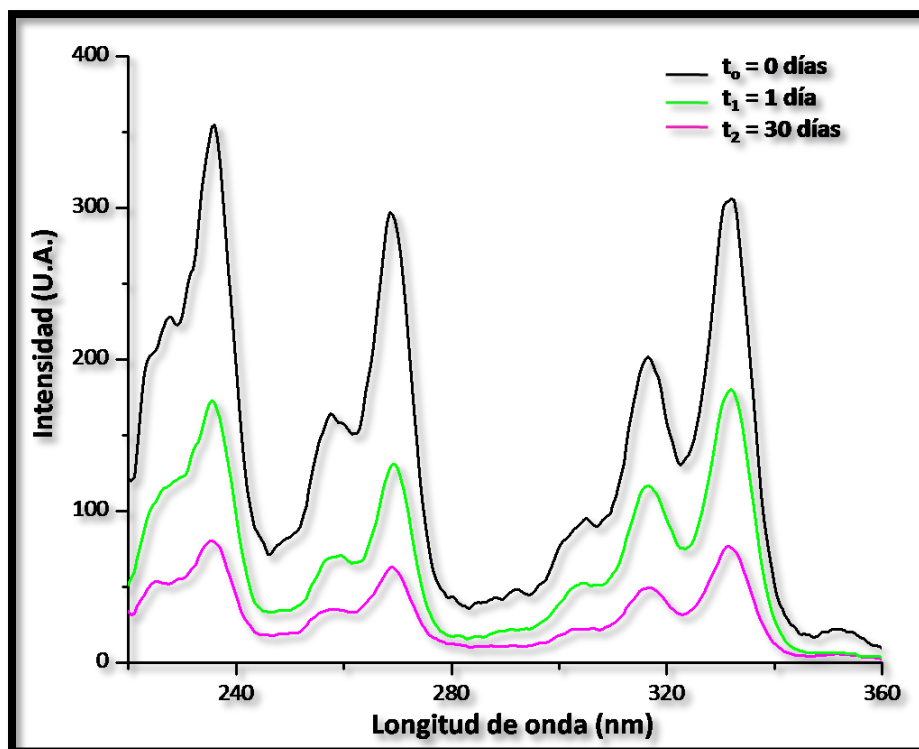


Figura 47. Espectros de excitación de fluorescencia de solución acuosa de Pir 0,12 mg/L medidos a diferentes tiempos.

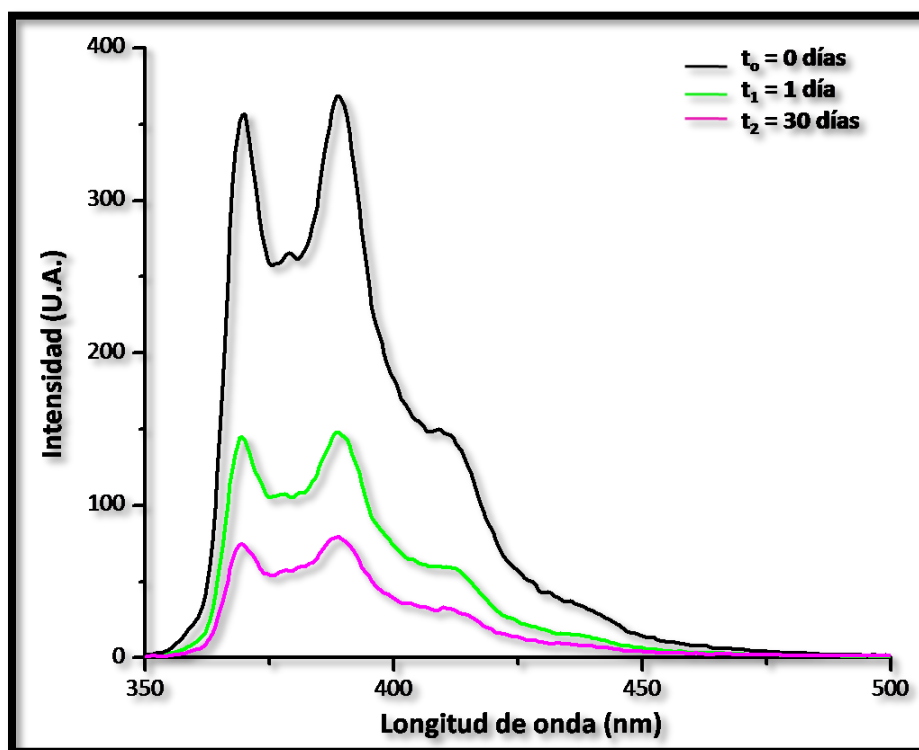


Figura 48. Espectros de emisión de fluorescencia de solución acuosa de Pir 0,12 mg/L medidos a diferentes tiempos.



Con el comportamiento observado en la solución acuosa de Pir se ensayó la siguiente hipótesis: “el Pir no precipita al encontrarse encapsulado por las micelas del copolímero”. Para probarla se analizó la estabilidad de soluciones acuosas de Pir (0,12 mg/L) con solución micelar (1,0125 mg/mL) mediante mediciones de espectros de fluorescencia en función del tiempo (Figura 49 y 50). Se observó que tanto el perfil como la intensidad de los espectros no cambian en función del tiempo. Estos resultados, no refutan la hipótesis planteada, y podrían explicarse asumiendo que el Pir se encuentra en un ambiente más favorable como el interior de las micelas, el cual está formado por monómeros de VBT con quien presenta una interacción no covalente. Esta interacción VBT-Pir evita que las moléculas de Pir se agreguen y precipiten.

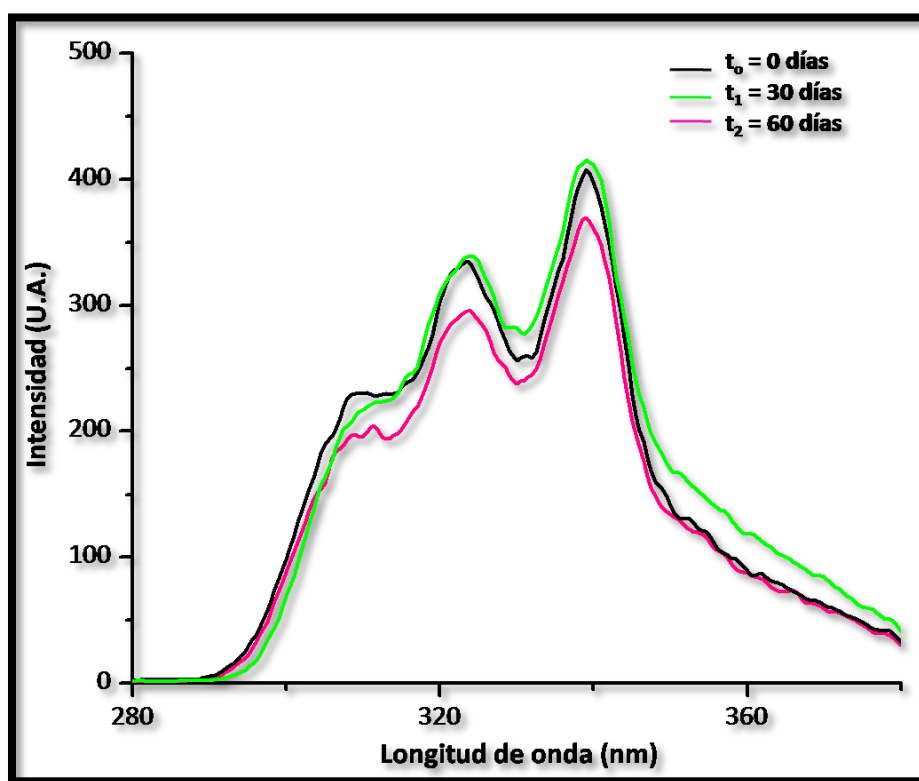


Figura 49. Espectros de excitación de fluorescencia de solución acuosa de Pir 0,12 mg/L con solución micelar (1,0125 mg/mL) medidos a diferentes tiempos.

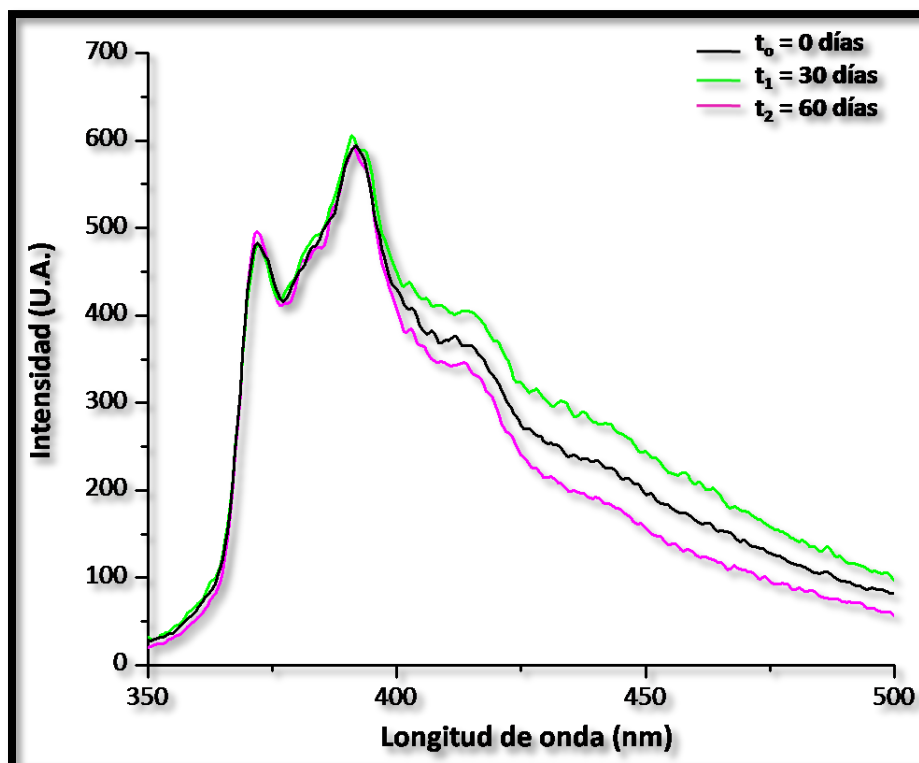


Figura 50. Espectros de emisión de fluorescencia de solución acuosa de Pir 0,12 mg/L con solución micelar (1,0125 mg/mL) medidos a diferentes tiempos.



9.4 COPOLÍMEROS SOBRE SOPORTE SÓLIDO

9.4.1 Análisis del sistema sobre soporte sólido

Como se introdujo anteriormente, contar con un dispositivo sencillo de portar y trasladar, simplifica las mediciones rutinarias en muchas industrias. Por lo tanto, una de las principales motivaciones de trasladar el sistema en estudio (polímero/contaminante) a un soporte sólido, fue conseguir este beneficio. Como todos los resultados analizados hasta el momento fueron con el sistema en solución, vale la pena recordar la forma de trabajo sobre un soporte sólido. Se prepararon las diversas soluciones, se sembraron unos mililitros sobre el soporte sólido (PET), y con una varilla de revestimiento se formó, de manera uniforme, una película delgada (*coating* o extendido) sobre el sustrato. Esta película, en algunos casos, fue irradiada con luz UV para inducir la foto-reacción entre timinas.

En la Figura 51 se muestra la emisión de fluorescencia de diferentes extendidos. Se observa nítidamente que, tanto la señal del PET solo como la del PET con extendido de copolímero VBT:VPS 1:1, son poco significativas para longitudes de onda mayores a 400 nm. Se observa, también, el espectro de emisión de fluorescencia típico del BaP para un extendido de este analito sobre PET. Cuando se examina el espectro correspondiente al *coating* del copolímero con el mismo agregado de BaP, se observa una exaltación notable en la fluorescencia nativa del contaminante, lo que indica que trasladar el sistema a un soporte sólido no interfiere en la interacción no covalente entre ambos compuestos.

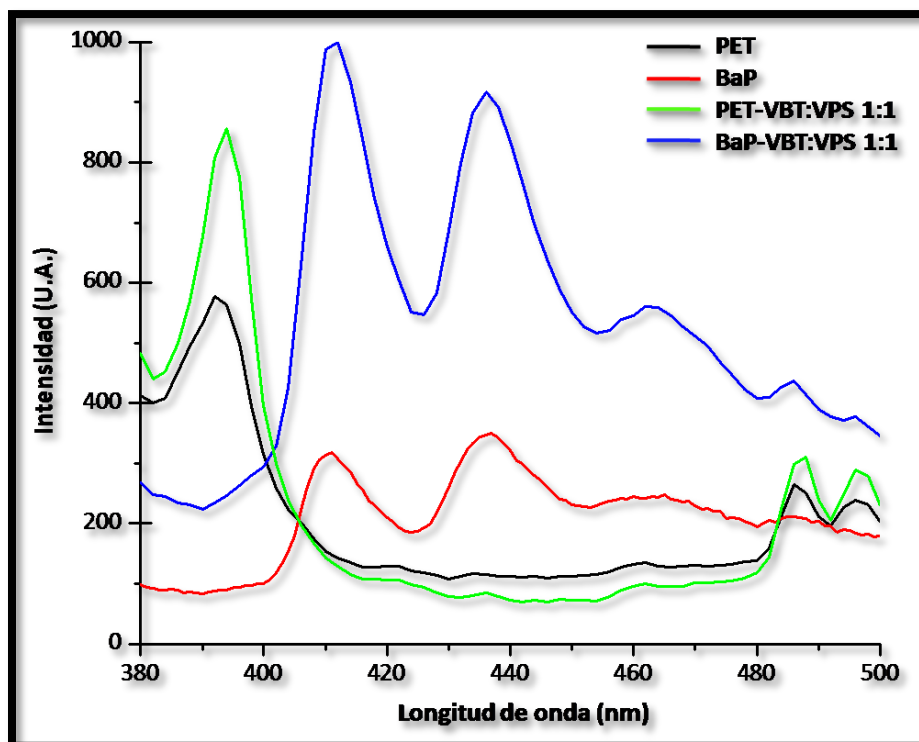


Figura 51. Espectros de emisión de fluorescencia de diversos extendidos: Línea negra PET solo; línea roja 0,05 mL de una solución de BaP 1 mg/L; línea verde VBT:VPS 100 mg/mL; línea azul BaP (0,05 mL de una solución 1 mg/L) y VBT:VPS (100 mg/mL).

Los resultados obtenidos mediante espectroscopia se correlacionan adecuadamente con la evidencia recogida por microscopía de barrido electrónica (SEM, por sus siglas en inglés). La Figura 52 presenta imágenes SEM, con distintas magnificaciones, de algunos de los extendidos cuyos espectros de fluorescencia fueron presentados previamente en la Figura 51. Se pueden observar cúmulos compactos amorfos en extendidos donde sólo hay VBT:VPS 1:1 (Fig. 52 A y B), que pueden correlacionarse con la pobre señal fluorescente del sistema. Sin embargo, para el caso donde se ha adicionado BaP al extendido de copolímero (Fig. 52 C y D), se ve nítidamente como la estructura amorfa previa se desenrolla, dando lugar a un nuevo arreglo que podría explicar la exaltación de fluorescencia observada.

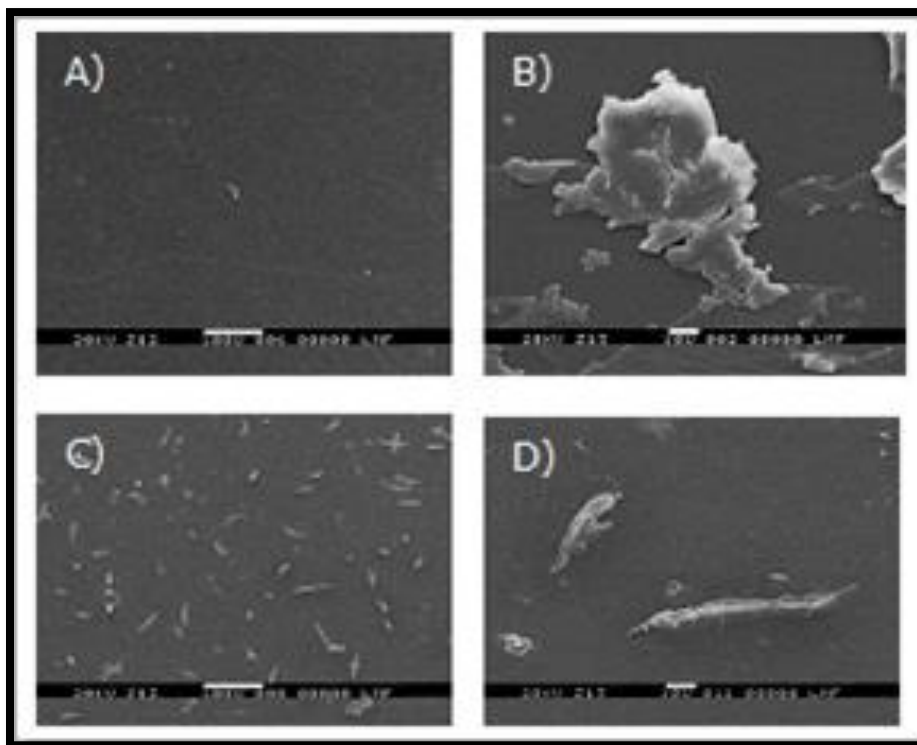


Figura 52. Imágenes SEM de diferentes sistemas: (A y B) Extendido VBT:VPS 1:1, magnificaciones x200 y x1000, respectivamente; (C y D) Extendido VBT:VPS 1:1 con BaP, magnificaciones x200 y x1000 respectivamente. En (A y C) la barra blanca indica 100 μm , mientras que en (B y D), 10 μm .

Para comprender mejor el comportamiento del sistema sobre PET se realizó este mismo análisis en copolímeros con proporciones de monómeros diferentes. Sabemos que la interacción con los HPAs se da mediante la timina del VBT, variar la cantidad de este monómero frente al VPS no solo implica un cambio en la composición del copolímero, también se modifican la interacción con el contaminante y la respuesta del sistema.

En las siguientes Figuras 53, 54 y 55 se muestran las emisiones de fluorescencia de diferentes *coatings*. En los tres gráficos se observa nítidamente que la señal del PET aislado es poco significativa para longitudes de onda entre 400 y 480 nm. La señal del PET con extendido de copolímero VBT:VPS 1:4, 1:8 y 1:16, presenta un pico alrededor de los 408 nm cuya intensidad va aumentando debido al incremento de VPS en el polímero. Se observa también, en las tres gráficas, la señal típica de emisión del BaP. Cuando se examinan los espectros correspondiente a los copolímeros con el agregado de BaP, no se observa tanta exaltación en la fluorescencia nativa del BaP como la registrada con el copolímero VBT:VPS de relación 1:1.

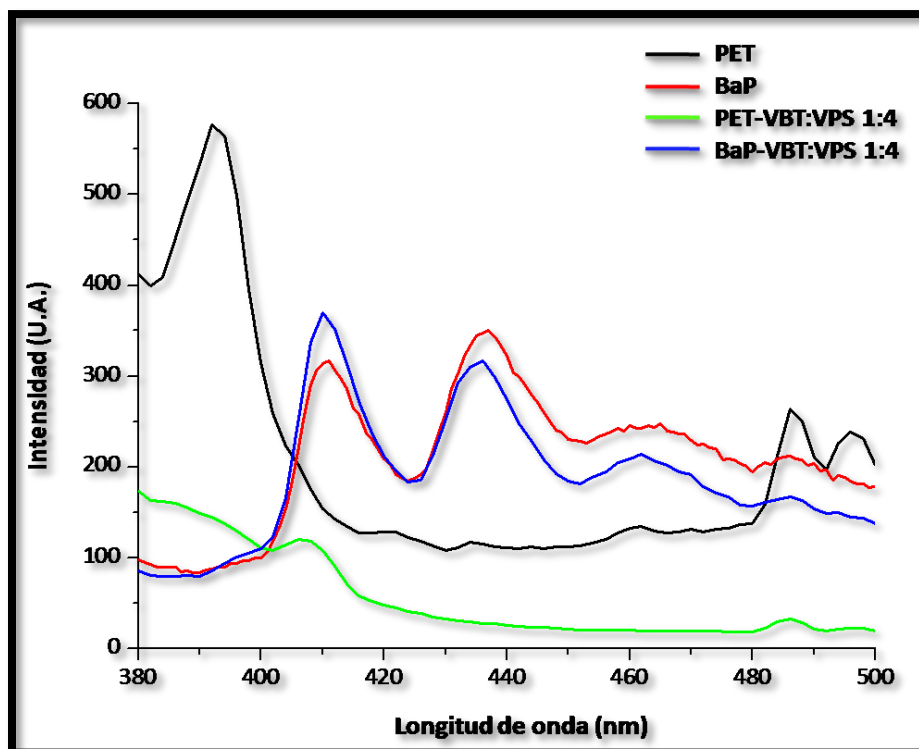


Figura 53. Espectros de emisión de fluorescencia para diversos extendidos: Línea negra PET solo; línea roja 0,05 mL de una solución de BaP 1 mg/L; línea verde VBT:VPS 1:4 100 mg/mL; línea azul BaP (0,05 mL de una solución 1 mg/L) y VBT:VPS 1:4 (100 mg/mL).

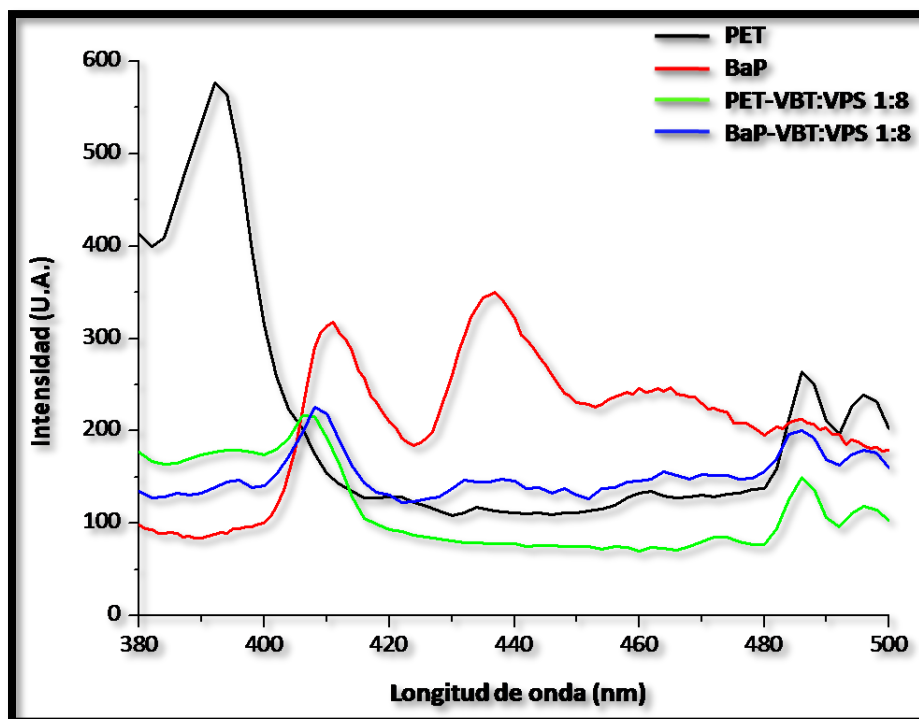


Figura 54. Espectros de emisión de fluorescencia para diversos extendidos: Línea negra PET solo; línea roja 0,05 mL de una solución de BaP 1 mg/L; línea verde VBT:VPS 1:8 100 mg/mL; línea azul BaP (0,05 mL de una solución 1 mg/L) y VBT:VPS 1:8 (100 mg/mL).

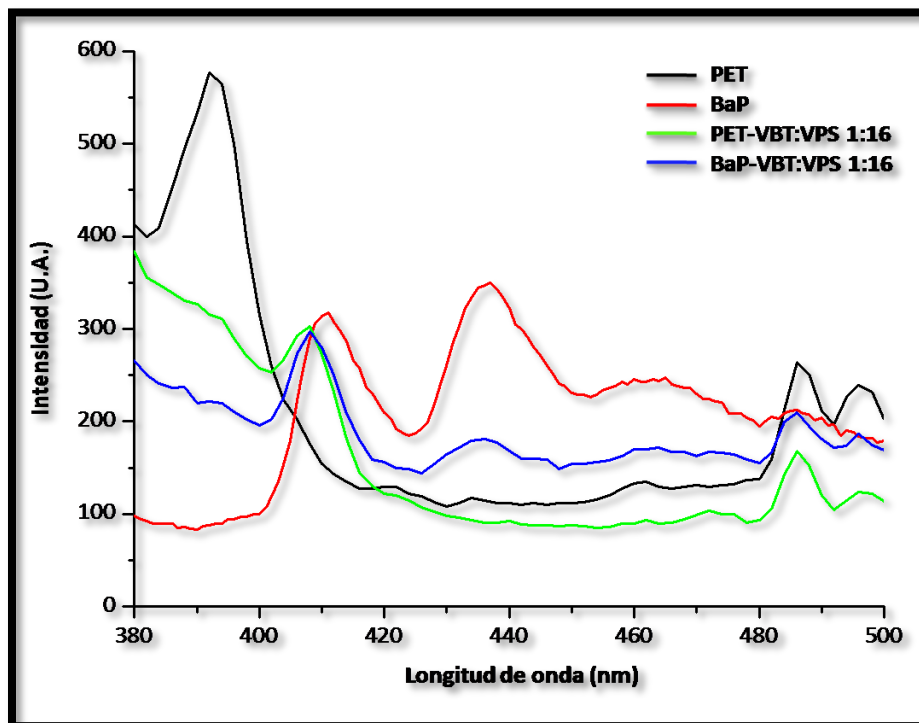


Figura 55. Espectros de emisión de fluorescencia para diversos extendidos: Línea negra PET solo; línea roja 0,05 mL de una solución de BaP 1 mg/L; línea verde VBT:VPS 1:16 100 mg/mL; línea azul BaP (0,05 mL de una solución 1 mg/L) y VBT:VPS 1:16 (100 mg/mL).



El análisis de los espectros de fluorescencia de todos los extendidos de copolímeros con BaP revela que a medida que aumenta la cantidad de VPS disminuye la señal de emisión del BaP. Lo que evidencia que la interacción entre los copolímeros y el BaP es VBT dependiente. Reforzando de esta manera la interacción Hp- π encontrada entre el BaP y la timina.

La Figura 56 presenta imágenes de SEM, todas con igual magnificación, de algunos de los extendidos cuyos espectros de fluorescencia se presentaron previamente (Figuras 53, 54 y 55). Para todos los extendidos donde sólo hay copolímero, independientemente de la relación de monómeros, se pueden observar cúmulos compactos amorfos (A, C, E y G). Para el caso donde se ha adicionado BaP al extendido de copolímero (B, D, F y H), se ve nítidamente como la estructura amorfa previa se desenrolla, dando lugar a un nuevo arreglo. Además, se observa que a medida que disminuye la cantidad de VBT en la red polimérica, la densidad de polímero desenrollado es menor. Esta tendencia aplica para los copolímeros de relación 1:1, 1:4 y 1:8 (B, D y F). El copolímero 1:16 (H) presenta un comportamiento diferente que podría atribuirse al aumento de VPS en el polímero y la posible existencia de otras interacciones.

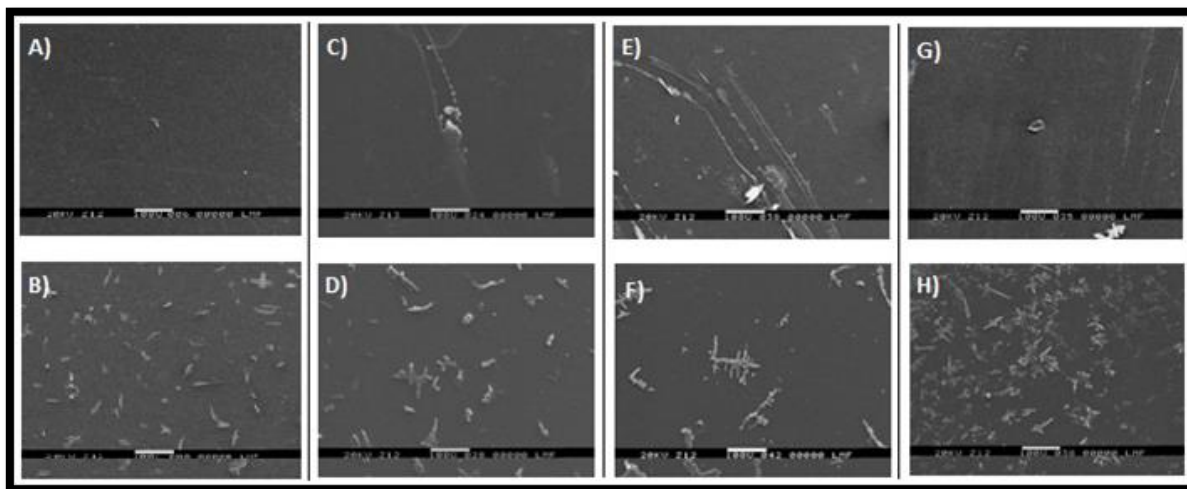


Figura 56. Imágenes SEM de diferentes sistemas extendidos sobre PET: A) VBT:VPS 1:1. B) VBT:VPS 1:1 más BaP. C) VBT:VPS 1:4. D) VBT:VPS 1:4 más BaP. E) VBT:VPS 1:8. F) VBT:VPS 1:8 más BaP. G) VBT:VPS 1:16. H) VBT:VPS 1:16 más BaP. Todas las imágenes son magnificaciones x200 y la barra blanca indica 100 μm .

9.4.2 Cinética de foto-entrecruzamiento

La Figura 57 muestra dos MEEF *front-face* correspondientes a un extendido de copolímero de VBT:VPS 1:1 sin irradiar (A) y después de 180 min de irradiación (B). A simple vista se observan pocas diferencias en la señal. La timina tiene un máximo de emisión de fluorescencia en 410 nm



cuando se la excita entre 290 y 340 nm [72], por lo tanto, es probable que la señal observada corresponda a las timinas de los copolímeros. A medida que el tiempo de irradiación aumenta los restos de timina se entrecruzan generando anillos de ciclobutano [6, 70]. Este efecto no se observa fácilmente en las matrices de la Figura 57, solo se ve una leve reducción en la intensidad de la señal sin cambios sustanciales en los espectros. Además, como ya mencionamos, una de las desventajas del PET es que tiene una fuerte fluorescencia en las regiones evaluadas, lo que indica que parte de la señal observada pertenece a la contribución de este soporte [73, 74]. En resumen, de acuerdo con estos resultados experimentales fue apropiado el uso de estrategias quimiométricas que ayudaron a resolver los sistemas y a determinar la cinética de reacción.

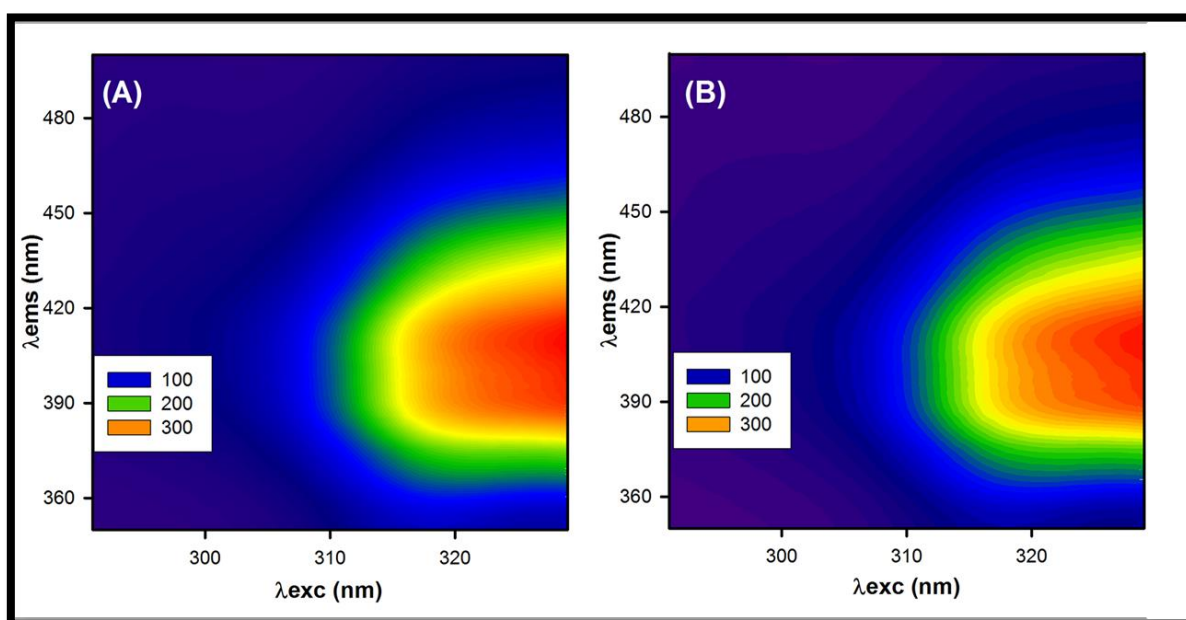


Figura 57. MEEFs *front-face* en extendidos de copolímero VBT:VPS 1:1 para diferentes tiempos de irradiación: (A) 0 min y (B) 180 min.

Primero se llevó a cabo un análisis quimiométrico de segundo orden con el fin de establecer la cinética que rige el proceso de curado. Para cada muestra, se generó una matriz aumentada **D** de tamaño 1480 (37 tiempos de irradiación, 40 longitudes de onda de excitación) × 180 (longitudes de onda de emisión). Se aplicó la restricción de no negatividad para todas las vías instrumentales, durante la optimización, para encontrar soluciones con significado físico. Se estimó la cantidad de componentes (cinco para todas las muestras) mediante la descomposición en valores singulares y se utilizó este dato para construir las estimaciones iniciales [69].

Considerando resultados preliminares, se postularon tres especies presentes en la reacción de curado (el VBT, un intermediario y el producto final), además de dos especies que



interfieren en la señal medida, pero que no son influenciadas por el tiempo de irradiación (el soporte sólido PET y el monómero VPS). Hay dos hechos que resaltan la identificación de los interferentes propuestos (PET y VPS): el primero, los perfiles de los espectros de excitación y emisión de fluorescencia del PET reportados en literatura coinciden con los arrojados por el modelo, y, el segundo, la cantidad de VPS presente en cada muestra es proporcional a la señal restante no generada por las otras especies (PET, VBT, intermediario y foto-producto). Además, la identificación del PET también está respaldada por el coeficiente de similitud calculado, según la referencia [69], entre los espectros experimentales y los espectros recuperados por el modelo siendo 0,93 y 0,92 para el espectro de excitación y emisión, respectivamente. La Figura 58 muestra las salidas del algoritmo para dos copolímeros uno con el mayor porcentaje de VBT y el otro con el porcentaje más pequeño.

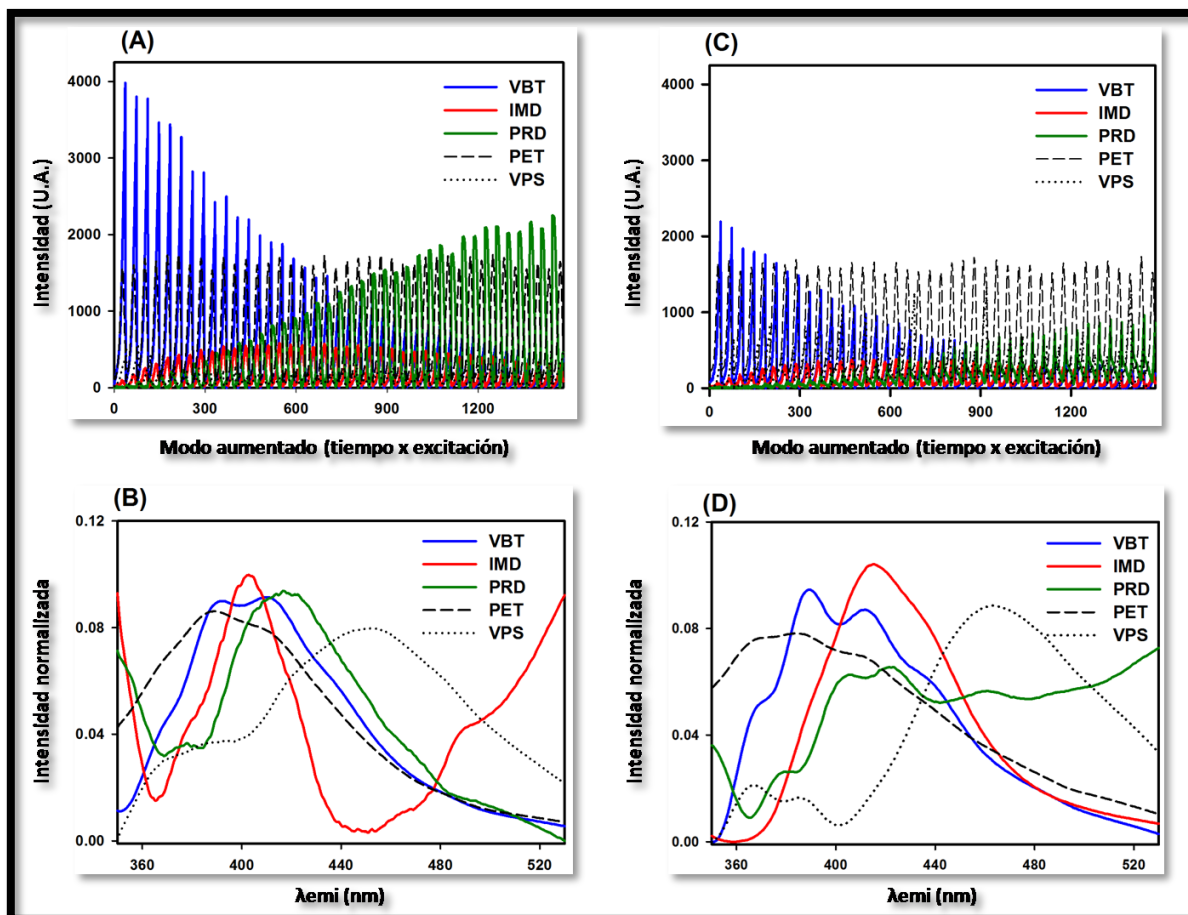


Figura 58. Salidas del modelo MCR-ALS de segundo orden. En la parte superior de la figura, están los modos aumentados (tiempo x excitación) de la cinética de reacción de curado para (A) VBT:VPS 1:1 y (C) VBT:VPS 1:32; y, en la parte inferior, los espectros de emisión de todos los componentes de la muestra para (B) VBT:VPS 1:1 y (D) VBT:VPS 1:32 .



Los perfiles cinéticos correspondientes a las especies implicadas en la reacción de entrecruzamiento se caracterizaron a partir de los perfiles aumentados de tiempo x excitación (Fig. 58). Se observa cómo el espectro de excitación del VBT disminuye al aumentar el tiempo de irradiación, mientras que el espectro de excitación del intermediario (IMD) aumenta. Para tiempos de irradiación más largos, se consume la especie intermedia y se observa un crecimiento en la señal del producto final (PRD). Con estos resultados y la Ecuación 7.3 (presentada en la sección 7.2.2 de Teoría) fue posible identificar los perfiles cinéticos de las especies implicadas en la reacción de curado (Figura 59), los cuales concuerdan con los resultados reportados para copolímeros de VBT-VBA [6, 70]; esto sugiere que el proceso de entrecruzamiento es sólo VBT-dependiente. Por otra parte, para cada composición de copolímero, la especie VPS permanece constante durante toda la reacción de entrecruzamiento y a medida que aumenta su concentración la resolución quimiométrica empeora (Fig. 59 (E)). Un factor importante que influyó en el bajo rendimiento del algoritmo, fue la superposición del espectro de PET con las señales más relevantes, esto hizo que la resolución cuantitativa se deteriore.

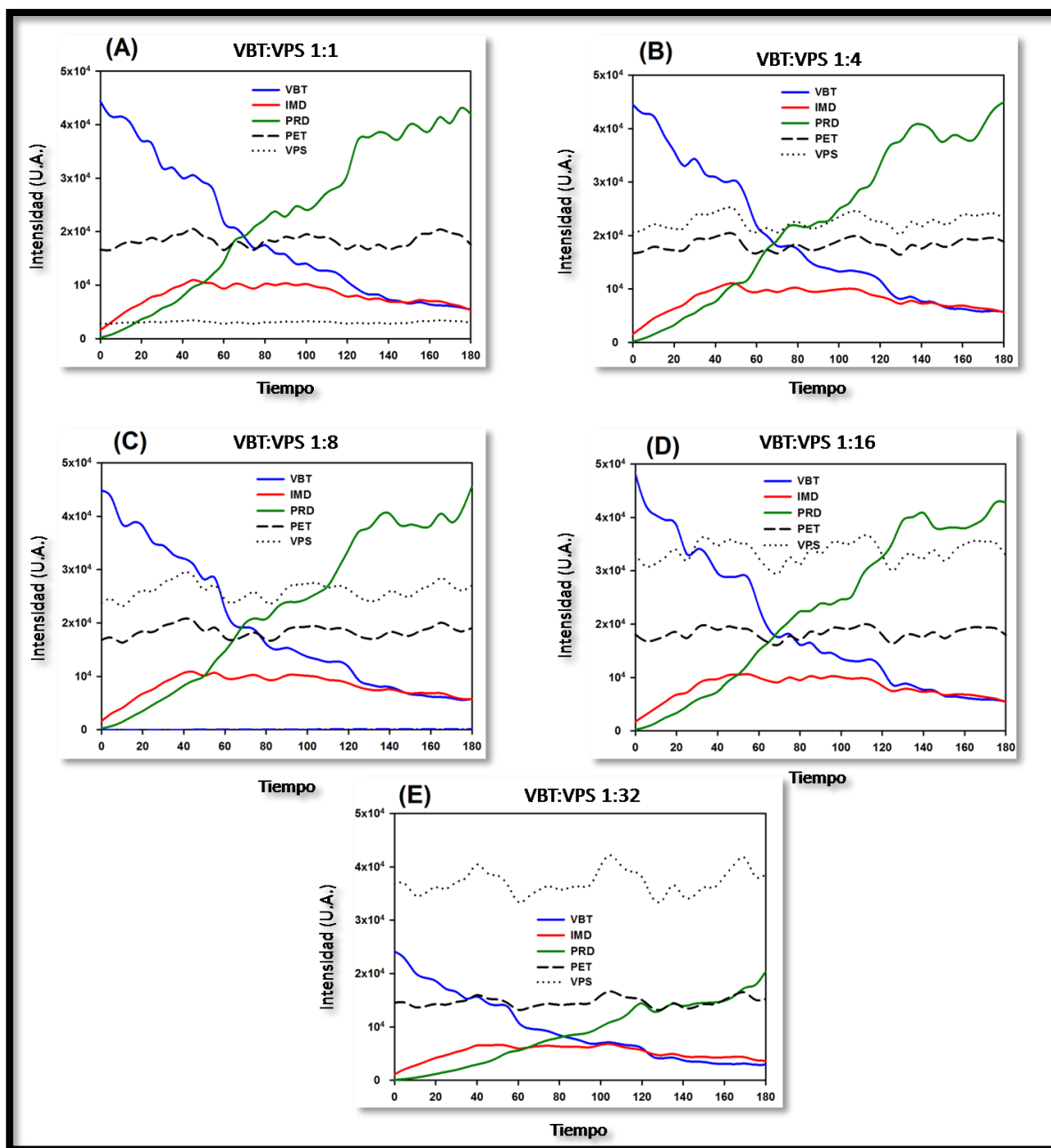


Figura 59. Perfiles cinéticos resueltos por el modelo MCR-ALS de segundo orden.

Otro factor negativo del modelo fue que no pudo identificarse, sin lugar a duda, la concentración inicial de los reactivos. Este hecho representó una pérdida importante en la estrategia utilizada ya que los resultados no sirven para caracterizar muestras similares pero de origen incierto. Por consiguiente, no se calcularon las constantes cinéticas del proceso ya que no se pudo establecer con precisión qué especies de las propuestas estaban realmente involucradas en la reacción.



Si bien los espectros de emisión resueltos para las diferentes composiciones copoliméricas analizadas fueron similares, también se observó que existen diferencias que establecieron incertidumbres con las conclusiones alcanzadas (ver Figura 58 B y D). Los principales causantes de estas desventajas, que resultaron en una calibración de segundo orden deficiente para proporcionar respuestas adecuadas, fueron: la fuerte señal de PET, que representa alrededor del 20% de la señal medida para VBT:VPS 1:1 mientras que para el VBT:VPS 1:32 alcanza el 50% (ver Figura 58 A y C); y la gran superposición de los espectros de excitación y emisión de fluorescencia de las especies. En la Tabla 8 se presentan las selectividades encontradas por el modelo MCR-ALS de segundo orden, en contraste con el de tercer orden (discutido a continuación). Todos los valores fueron calculados mediante la Ecuación 7.4 (presentada en la sección 7.2.2 de Teoría) y, claramente, son más pobres para el modelo de segundo orden que para el modelo de tercer orden.

Tabla 8. Selectividad calculada acorde a la Ecuación 7.4 para ambos modelos.

	VBT	Intermediario	Producto	PET	VPS
Segundo orden					
VBT:VPS 1:1	0,21	0,22	0,30	0,63	0,54
VBT:VPS 1:4	0,17	0,24	0,24	0,67	0,41
VBT:VPS 1:8	0,17	0,21	0,25	0,57	0,38
VBT:VPS 1:16	0,15	0,23	0,23	0,53	0,63
VBT:VPS 1:32	0,12	0,23	0,25	0,48	0,38
Tercer orden	0,40	0,50	0,36	0,66	0,61

El paso siguiente, a fin de mejorar los resultados obtenidos, fue implementar un modelo quimiométrico de orden superior. Para esto, se construyó una matriz **D** súper-aumentada que incluyó a todas las muestras; es decir, se anexaron todas las matrices de datos de tercer orden (MEEFs vectorizadas en tiempo de irradiación). Se tuvieron en cuenta las mismas restricciones de no negatividad durante la optimización para obtener constantes con sentido físico. El número de componentes (cinco) y los espectros iniciales se calcularon de manera similar al análisis de segundo orden. Después de la descomposición de la matriz **D**, de acuerdo a la Ecuación 7.2 (de la sección 7.2.2 de Teoría), se utilizó la información contenida en la matriz **C** para realizar la gráfica



pseudo-univariada; esto se logró graficando los *scores* de la concentración de los analitos en función de las concentraciones nominales de los analitos (Ecuación 7.3).

La Figura 60 muestra los perfiles resueltos por el modelo MCR-ALS de tercer orden para el conjunto de muestras. La Figura 60 (A) presenta los perfiles cinéticos de tiempo de irradiación aumentados y la Figura 60 (B) los perfiles de las MEEFs vectorizadas para cada especie, mientras que la Figura 60 (C) muestra los perfiles de emisión y de excitación de todos los componentes en todas las muestras obtenidos a través de la reconfiguración de la matriz S^T (Ecuación 7.2). Este rearmado se logró creando una matriz de datos adecuada, sometida a una descomposición de los valores singulares, y tomando los primeros autovectores izquierdo y derecho como las estimaciones de los perfiles de los componentes verdaderos en ambos casos (excitación y emisión). Este proceso fue esencial para determinar si la información obtenida por el algoritmo concuerda con los datos experimentales. Comparando los espectros obtenidos experimentalmente para PET y VPS (Fig. 60 D) con los reportados en bibliografía [73-75] se observó una buena concordancia. La correlación, entre los espectros modelados y los experimentales, se evaluó en términos del coeficiente de similitud calculado según la referencia [69], obteniendo valores de 0,953 y 0,949 para espectros de excitación y emisión de PET, y 0,998 y 0,979 para espectros emisión y excitación de VPS. En cuanto a las características espectrales de los perfiles de excitación y de emisión asignados al VBT (línea azul en la Figura 60 C) se encontró un máximo de emisión a 400 nm (λ_{exc} = 295 nm) comparable con la fluorescencia de la timina reportada en bibliografía [72].

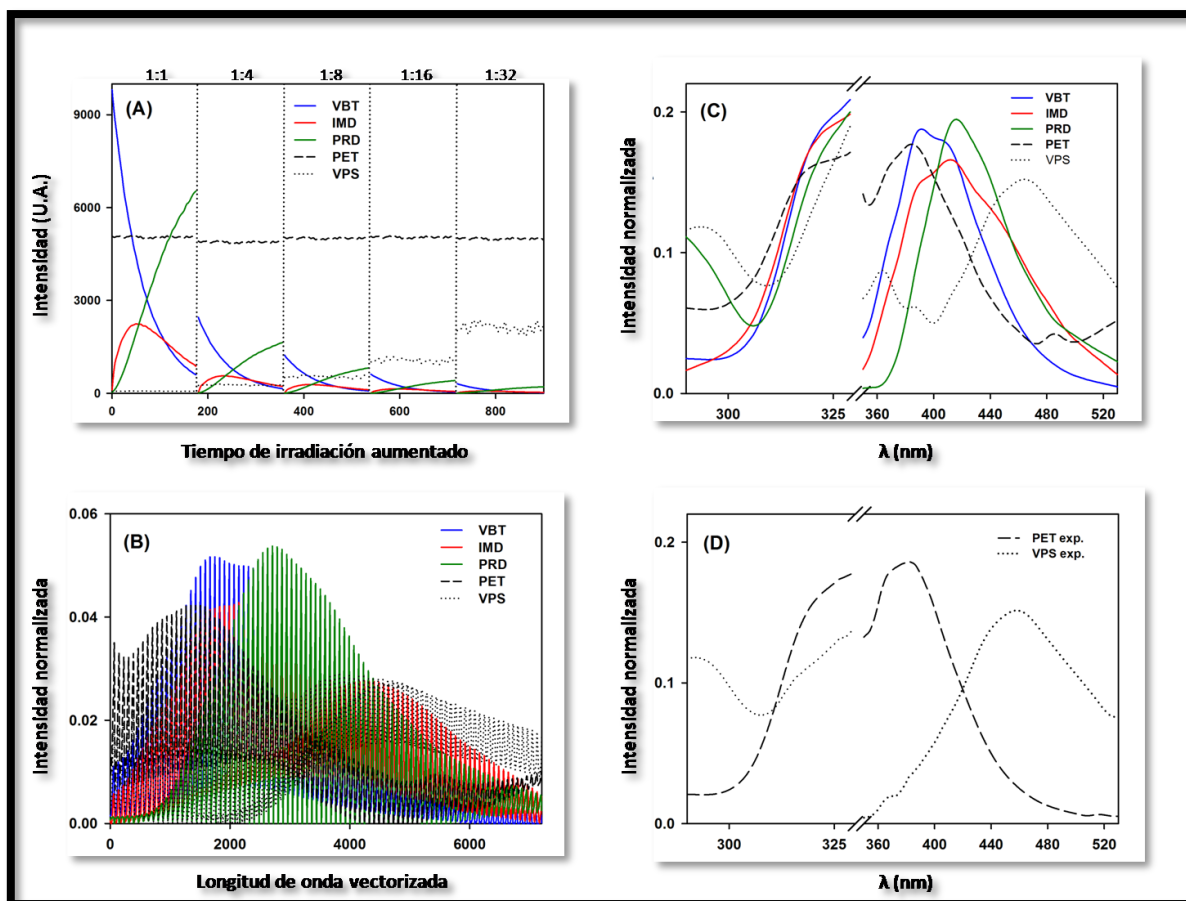


Figura 60. Perfiles obtenidos por MCR-ALS de tercer orden. (A) Perfil del tiempo de irradiación aumentado para cada especie, las líneas punteadas verticales indican el final de cada sub-perfil. (B) Perfiles vectorizados de las MEEFs para cada especie. (C) Perfiles de excitación y emisión de fluorescencia para cada especie. (D) Espectros experimentales de excitación y emisión del PET ($\lambda_{exc}= 320 \text{ nm}$, $\lambda_{ems}= 380 \text{ nm}$) y de una solución de VPS 10% m/m ($\lambda_{exc}= 295 \text{ nm}$, $\lambda_{ems}= 450 \text{ nm}$).

Los perfiles espectrales reconfigurados obtenidos para las cinco especies involucradas en el proceso resultaron similares a los espectros resueltos en el análisis de segundo orden. Sin embargo, en la calibración de tercer orden los espectros vectorizados son significativamente menos ambiguos que los del enfoque previo, dado que cada especie tiene un solo par de espectros de excitación-emisión independientemente de la composición del copolímero. Además, los perfiles reconfigurados para las especies involucradas en la reacción concuerdan con los informados anteriormente en literatura para polímeros similares [6, 70], permitiéndonos inferir, sin lugar a duda, sobre las especies implicadas en el proceso de curado, Figura 61.

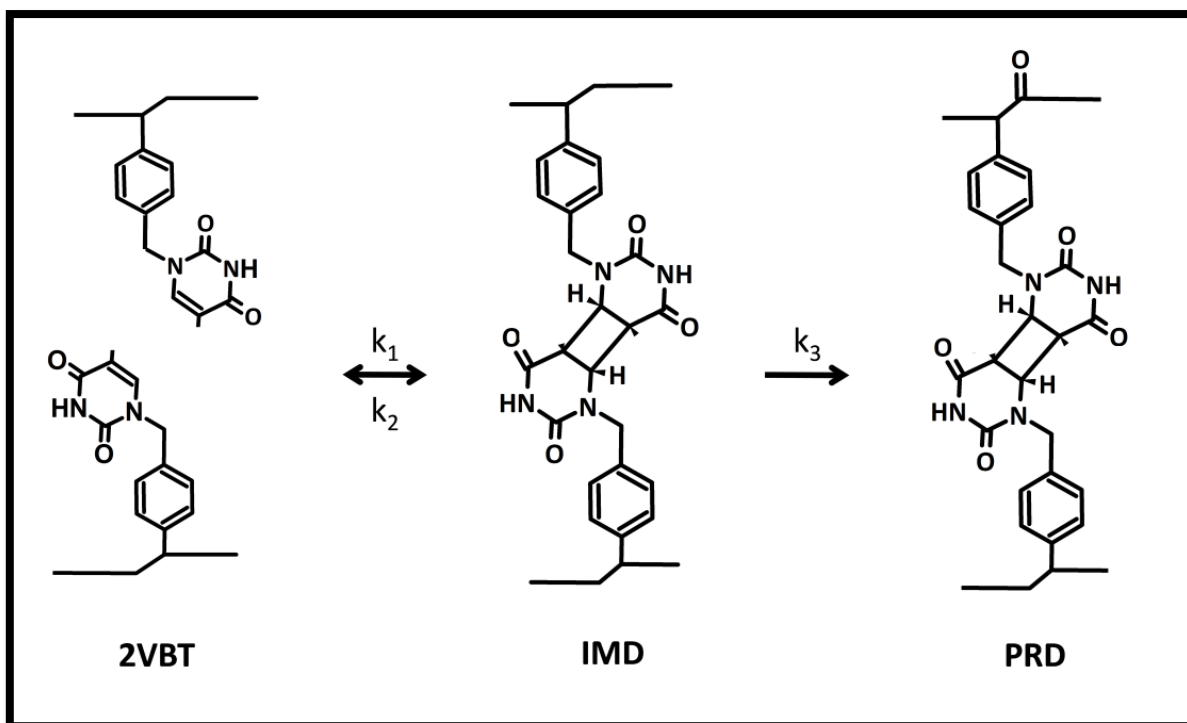
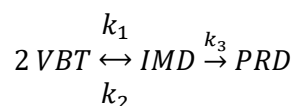


Figura 61. Estructuras propuestas para las especies involucradas en el proceso de curado de polímeros con VBT.

La Figura 60 (A) muestra la cinética de la reacción de curado en función del tiempo de irradiación y de la relación de VBT en cada copolímero. En su mayoría las curvas cinéticas coinciden con los reportados en literatura para copolímeros similares [6, 70]. Además, muestran una mejora sustancial en comparación con las curvas obtenidas con el análisis de segundo orden (Figura 59).

Bortolato y sus compañeros [6, 70], realizaron una caracterización de la evolución del proceso de foto-entrecruzamiento mediante el uso herramientas quimiométricas y propusieron el siguiente mecanismo de cinética para la reacción en copolímeros VBT-dependientes:



Donde las velocidades de reacción son:

$$\frac{dy_{\text{VBT}}}{dt} = -k_1 y_{\text{VBT}}^2 + k_2 y_{\text{IMD}}$$

$$\frac{dy_{\text{IMD}}}{dt} = k_1 y_{\text{VBT}}^2 - k_2 y_{\text{IMD}} - k_3 y_{\text{PRD}}$$

$$\frac{dy_{\text{PRD}}}{dt} = k_3 y_{\text{IMD}}$$



El término $-k_1 y_{VBT}^2$ de la primer ecuación corresponde a la velocidad de desaparición del copolímero VBT-dependiente sin entrecruzar y $k_2 y_{IMD}$ es la velocidad de aparición de la especie intermediaria. En la segunda ecuación el término $k_1 y_{VBT}^2$ es la velocidad de aparición del copolímero VBT-dependiente sin entrecruzar, $-k_2 y_{IMD}$ es la velocidad de desaparición del intermediario y $-k_3 y_{PRD}$ es la velocidad de desaparición del fotoproducto. Finalmente, en la última ecuación el término $k_3 y_{IMD}$ es la velocidad de aparición del producto. k_1 , k_2 y k_3 son las constantes de velocidad de la reacción. y_{VBT} , y_{IMD} y y_{PRD} son las concentraciones de cada especie que interviene en la reacción en función de tiempo.

Resolviendo numéricamente las ecuaciones diferenciales ordinarias de las velocidades de reacción y usando los valores de concentraciones experimentales, junto con un grupo de constantes de velocidad de prueba como entradas (*inputs*), se obtuvieron las evoluciones cinéticas [115]. Utilizando el mismo esquema cinético y comparando las evoluciones cinéticas con los datos experimentales para todos los copolímeros de VBT-VPS, se encontraron las siguientes constantes de velocidad: $k_1 = 1250 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $k_2 = 2 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ y $k_3 = 4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Las relaciones entre las constantes concuerdan con los valores cinéticos reportados anteriormente para copolímeros de VBT-VBA, lo que refuerza la hipótesis de que el mecanismo cinético es VBT-dependiente [6]. Finalmente, con los espectros predichos por el algoritmo y las cinéticas de los cinco copolímeros (presentadas en la Figura 60), se construyó un modelo de regresión teniendo en cuenta el contenido de VBT en el sistema de reacción: VBT:VPS 1:1 (50% m/m VBT), VBT:VPS 1:4 (20% m/m VBT), VBT:VPS 1:8 (11% m/m VBT), VBT:VPS 1:16 (6% m/m VBT), y VBT:VPS 1:32 (3% m/m VBT). En la Figura 62 se muestran los resultados de estas regresiones. Se observa una buena correlación entre los *scores* de MCR-ALS y la concentración nominal de VBT para las tres especies significativas (VBT, IMD y PRD), lo que indica una muy buena resolución quimiométrica, independientemente de las dos especies interferentes (VPS y PET). Los resultados permiten sostener que la reacción de curado es VBT-dependiente y de segundo orden con respecto a la timina.

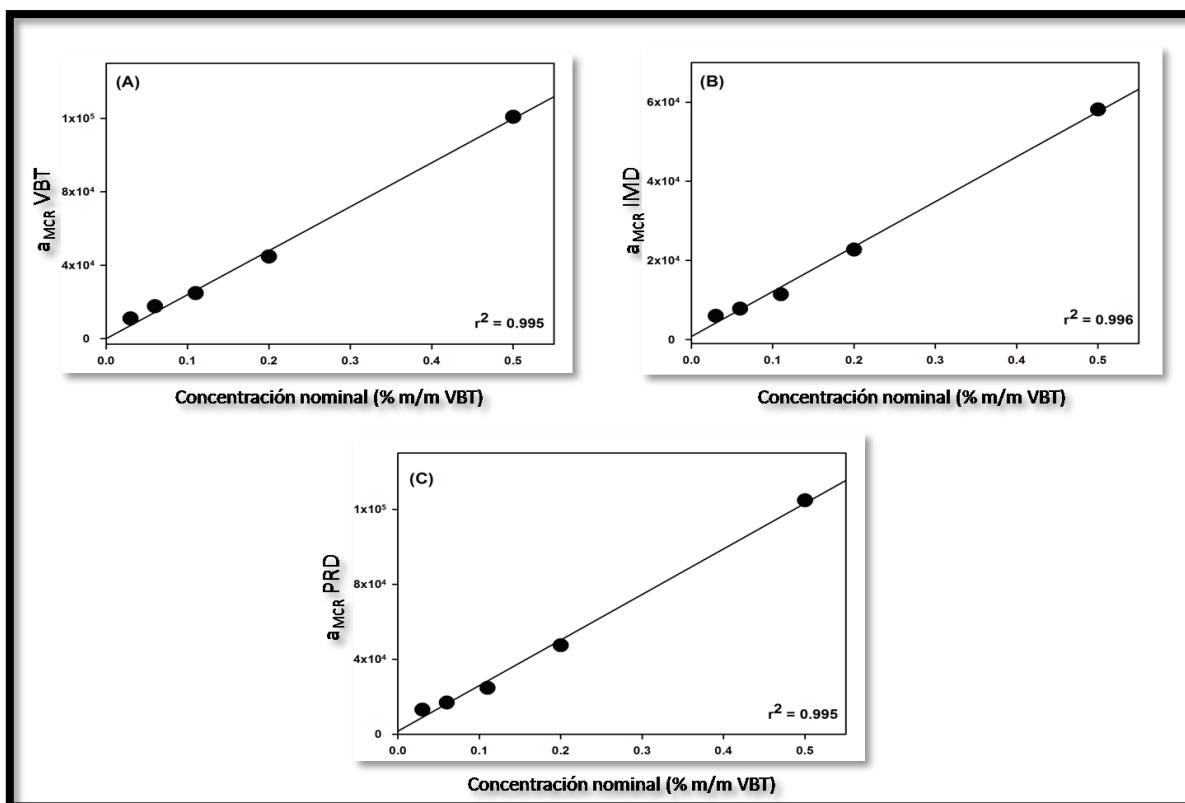


Figura 62. Curvas de regresión para las tres especies principales según el enfoque quimiométrico de tercer orden. En todos los casos, se correlacionan los scores de MCR con las concentraciones nominales de VBT en las diferentes muestras, además se exponen los coeficientes r^2 para cada caso. A) VBT, B) IMD, y C) PRD.



CONCLUSIONES



10- CONCLUSIONES

Como conclusión principal, respondiendo al objetivo general de la tesis, podemos afirmar que se contribuyó con creces al desarrollo de tecnologías alternativas, para la detección de contaminantes orgánicos en agua, mediante metodologías de trabajo que se ajustan adecuadamente al paradigma de la Química Verde.

Al analizar la interacción entre diferentes tipos de copolímeros de VBT-VPS y el BaP, se observó que el copolímero influye en la fluorescencia nativa del contaminante, disminuyendo la exaltación de fluorescencia a medida que disminuye el porcentaje VBT en el copolímero. La causa de la reducción observada se debe a la menor proporción de residuos de timina en la red de polímero. A partir de dos métodos analíticos (espectroscopia de fluorescencia y microscopía electrónica de barrido) se corroboró la existencia de una interacción no covalente entre copolímeros de VBT-VPS y el BaP. El estudio teórico realizado permitió racionalizar la interacción no covalente existente entre ambos compuestos, encontrando una interacción del tipo $H\pi-\pi$ entre un átomo de hidrógeno de un resto de timina (que forma parte del copolímero) y el anillo aromático menos impedido estéricamente del BaP. Adicionalmente, el estudio de la interacción no covalente se realizó en una serie de disolventes apróticos, siendo DMSO el solvente que produjo el mayor aumento de fluorescencia. Se dio una explicación plausible del fenómeno. Y los resultados teóricos obtenidos para la interacción en los diversos solventes se correlacionaron satisfactoriamente con la evidencia experimental hallada.

Se desarrolló un nuevo método analítico que combina espectroscopia de fluorescencia sensibilizada y análisis multivariado. En el cual, el copolímero VBT:VPS 1:1 mejoró la señal de fluorescencia de BaP y Pir haciendo posible cuantificarlos de manera confiable a niveles menores que los requeridos. La selectividad analítica se logró utilizando un algoritmo para procesar datos de segundo orden de espectros de excitación y emisión de fluorescencia. El rendimiento del método desarrollado se probó contra el de referencia y al compararlos resultó que el método desarrollado en la tesis se enmarca mejor en los lineamientos de la Química Verde.

Se logró sintetizar el copolímero en bloque VBT-b-VPS y caracterizarlo. A partir de este tipo de copolímero, se formaron soluciones micelares a las cuales se les determinó el diámetro promedio y se estimó la concentración micelar crítica mediante dos métodos diferentes. Las pruebas realizadas (analizando la estabilidad de soluciones acuosas de Pir) indicarían una posible encapsulación de este contaminante en las micelas. Estos estudios preliminares avizoran el



potencial desarrollo de micelas basadas en VBT-VPS para su uso como agentes encapsulantes de contaminantes en aguas de consumo.

Finalmente, al trasladar el sistema en estudio a un soporte sólido, se obtuvieron resultados similares a los obtenidos en solución, con una notable exaltación de la fluorescencia de BaP debido a la interacción no covalente con la timina del VBT, exaltación que disminuye al aumentar la proporción de monómero de VPS en el copolímero. Además, se utilizaron dos enfoques analíticos que combinan espectroscopía de fluorescencia en fase sólida con herramientas quimiométricas, para proporcionar información precisa sobre la inmovilización foto-inducida de copolímeros de VBT-VPS, junto con la cinética de todas las especies involucradas. Se encontró que este proceso involucra tres especies timina dependientes, junto con otras dos especies (VPS y soporte sólido) que forman parte de la señal medida pero que no están influenciadas por el tiempo de irradiación. Al calcular la contribución de cada especie a la señal total en cada tiempo de irradiación, se pudieron estimar las constantes cinéticas del proceso en función del contenido de VBT. Caracterizar adecuadamente el comportamiento cinético del copolímero en soporte sólido es un paso importante para el desarrollo racional de sensores portables de HPAs en aguas de consumo. Nuevamente, estos enfoques utilizados cumplen con los requisitos del paradigma de la Química Verde.

En resumen, los resultados obtenidos muestran que es factible el uso de copolímeros bioinspirados de VBT-VPS para el desarrollo de nuevas tecnologías sustentables (como sensores químicos) capaces de determinar con alta selectividad y sensibilidad contaminantes orgánicos en muestras de agua.



INFORMACIÓN ADICIONAL



11- INFORMACIÓN ADICIONAL

11.1 CARACTERIZACIÓN DE LOS POLÍMEROS SINTETIZADOS

RMN ¹H

Los espectros de RMN ¹H de los monómeros de partida, VBT y VPS se muestran en las Figuras 63 y 64 respectivamente.

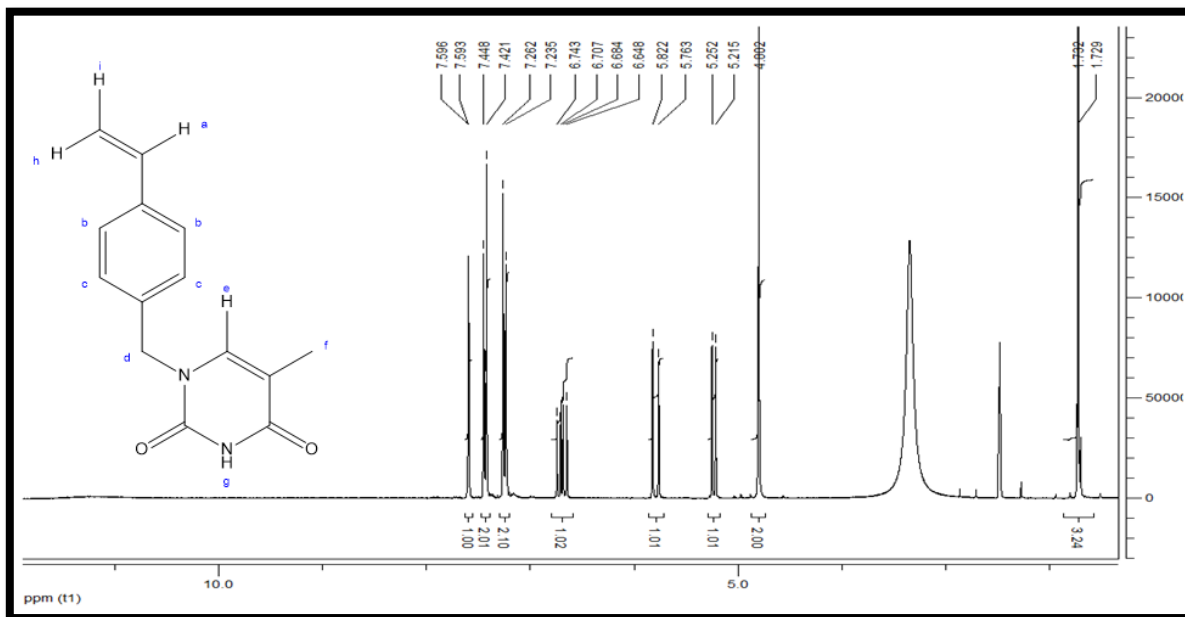


Figura 63. Espectro de RMN ¹H de VBT en DMSO.

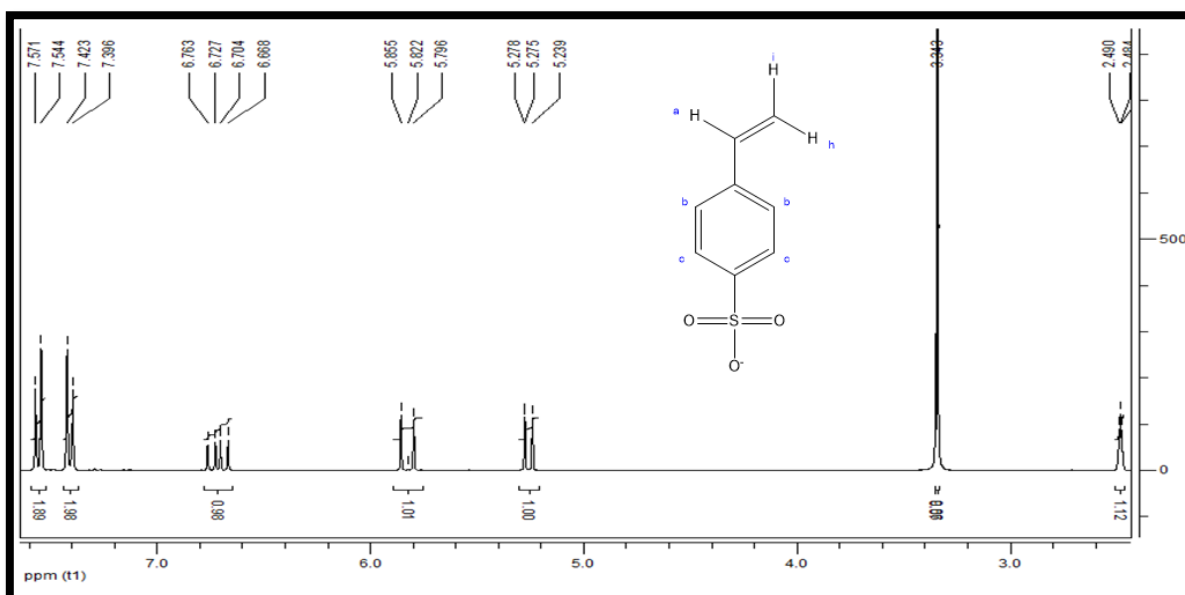


Figura 64. Espectro de RMN ¹H de VPS en DMSO.



En la Figura 65 se presenta el espectro del copolímero VBT:VPS de relación 1:1. Como se observa es un espectro típico de un polímero donde no hay señales limpias correspondientes a cada protón diferente de cada molécula, como el obtenido para los monómeros VBT y VPS, sino que presenta bandas anchas resultantes de todas las señales de protones semejantes agrupadas en una misma región. La ausencia de señal entre 5 y 6 ppm correspondiente a los protones del vinilo perteneciente a los monómeros confirmó que la polimerización fue completa.

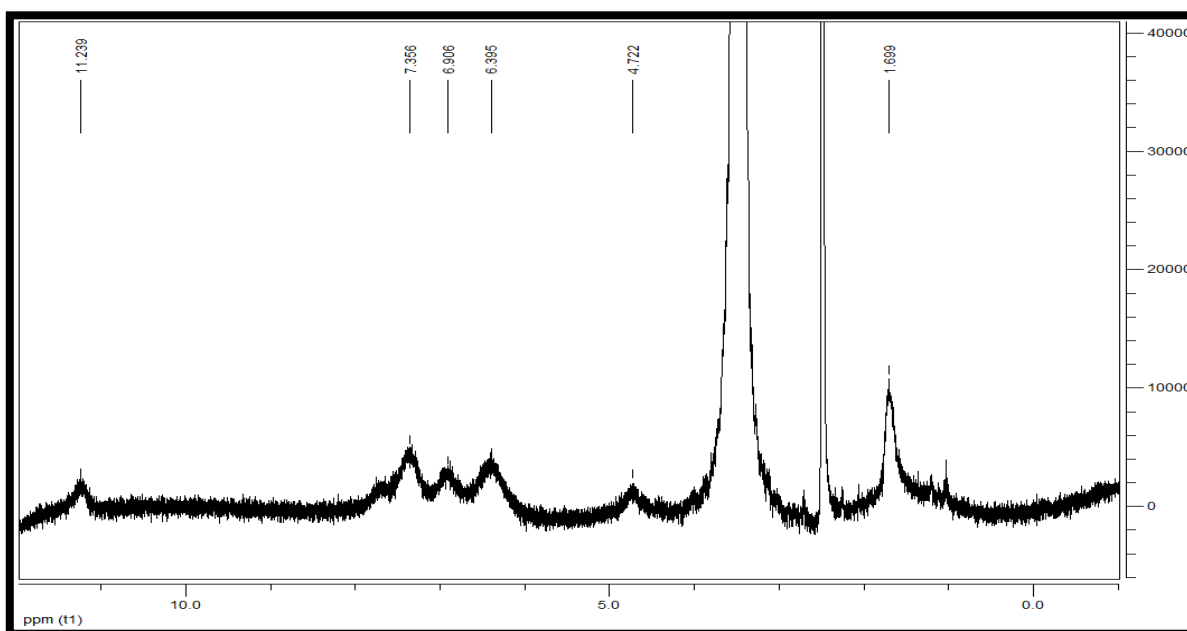


Figura 65. Espectro de RMN ^1H de VBT:VPS 1:1 en DMSO.

Se hicieron espectros RMN ^1H de copolímeros en las otras proporciones 1:4, 1:8 y 1:16. En la Figura 66, se comparan los espectros de los copolímeros VBT:VPS 1:1 en la parte superior (de color rojo), y VBT:VPS 1:4 en la parte inferior (de color azul). Como se observa las señales se mantienen en los mismos valores de desplazamientos y las diferencias radican en la intensidad de las mismas (señalado con rectángulos verdes). En la Figura 67, se presentan los espectros de los copolímeros VBT:VPS 1:8 y 1:16.

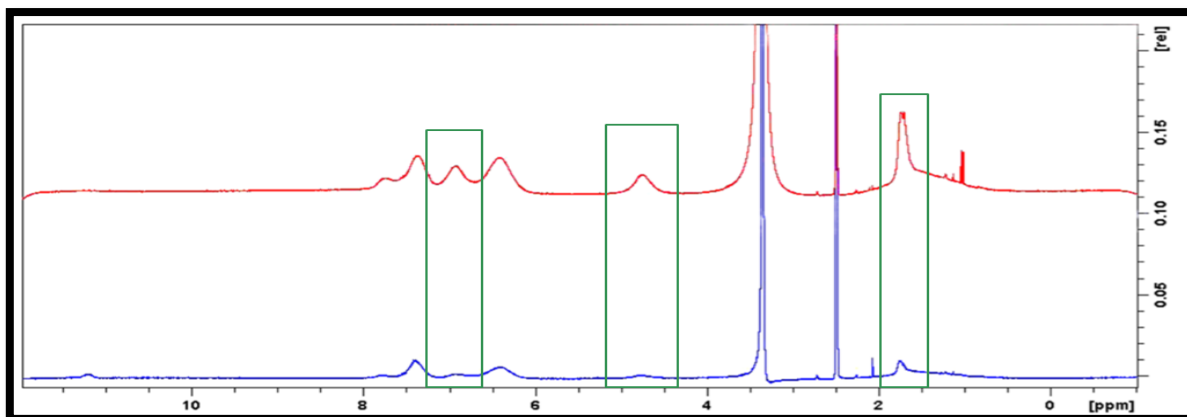


Figura 66. Espectros de RMN ^1H de VBT:VPS 1:1 (en rojo) y VBT:VPS 1:4 (en azul) en DMSO.

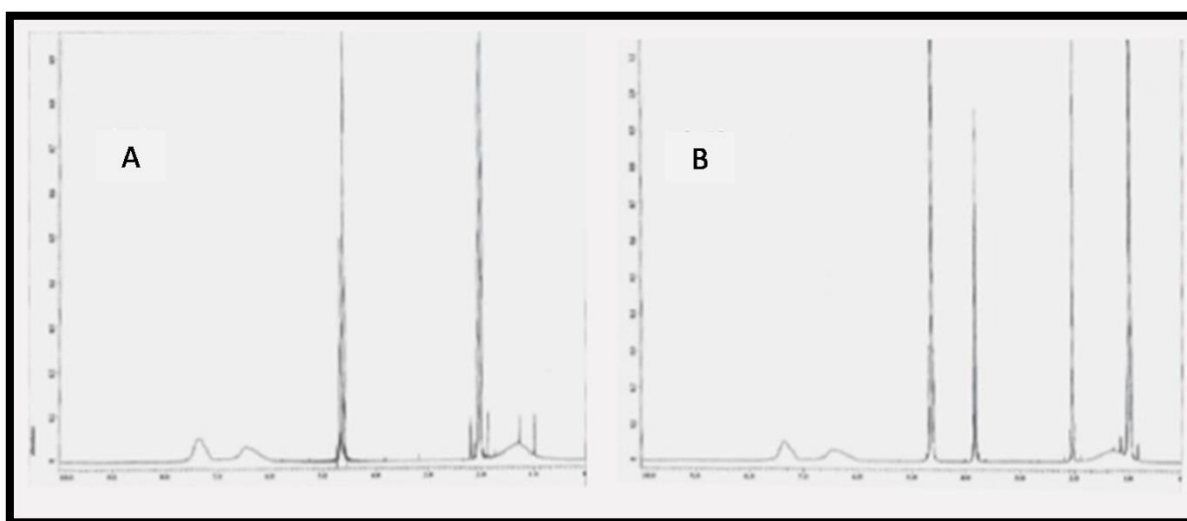


Figura 67. Espectros RMN ^1H de (A) VBT:VPS 1:8 y (B) VBT:VPS 1:16 en DMSO.



SEC

En la Tabla 9 se reportan los PM (Mn y Mw) y el índice de polidispersidad ($D = Mw/Mn$) determinados por SEC de los copolímeros sintetizados.

Tabla 9. PM determinados por SEC.

Copolímero	Mn (kDa)	Mw (kDa)	Da
VBT:VPS 1:1	14,9	84,0	5,64
VBT:VPS 1:4	17,5	107,1	6,12
VBT:VPS 1:8	34,8	139,8	4,02
VBT:VPS 1:16	38,6	181,0	4,69

LECO

La composición de los copolímeros fue verificada determinando la cantidad total de nitrógeno y carbono mediante un analizador elemental por combustión, los resultados se presentan en la Tabla 10.

Tabla 10. Análisis elemental por LECO.

Copolímero	Relación de % C/N teórica	Relación de % C/N experimental
VBT:VPS 1:1	9,42	9,32
VBT:VPS 1:4	19,69	15,97
VBT:VPS 1:8	33,46	33,40
VBT:VPS 1:16	60,96	59,43



12- BIBLIOGRAFÍA

- [1] Urquidi, V.L. *Desarrollo Sustentable y Cambio Global*. (2007). México, D.F.: Alejandro Nadal Editor, 49-51.
- [2] Gafo, J. *10 Palabras Claves en Bioética*. (1993). Estella: Verbo Divino, 339-373.
- [3] Anastas, P.T.; Warner, J.C. *Green Chemistry: Theory and Practice*. (1998). London: Oxford University Press.
- [4] Gałuszka, A.; Migaszewski, Z.; Konieczka, P.; Namieśnik, J. (2012). Analytical Eco-Scale for assessing the greenness of analytical procedures. *Trends in Analytical Chemistry*, 37, 61-72.
- [5] Callister, W.D. *Materials Science and Engineering: An Introduction*. (2007). 7ª edición. New York: John Wiley & Sons, Inc., 490.
- [6] Bortolato, S.A.; Thomas, K.E.; McDonough, K.; Gurney, R.W.; Martino, D.M. (2012). Evaluation of photo-induced crosslinking of thymine polymers using FT-IR Spectroscopy and chemometric analysis. *Polymer*, 53, 5285-5294.
- [7] U.S., Congress the Office of Technology Assessment (1993). *Biopolymers: Making Materials Nature's Way-Background Paper (OTA-BP-E-102)*. U.S. Government Printing Office. *Washington*, 1-18.
- [8] Martino, D.M.; Reyna, D.; Estenoz, D.; Trakhtenberg, S.; Warner, J. (2008). Photosensitization of Bioinspired Thymine Containing Polymers. *J. of Phys. Chem. A*. 112, 4786.
- [9] Stevens, M.P. *Polymer Chemistry: an introduction*. (1990). 2ª edición. Publicado por Oxford University Press. New York. 7-11.
- [10] Braun, D.; Cherdrón, H.; Rehahn, M.; Ritter, H.; Voit, B. *Polymer Synthesis: Theory and Practice. Fundamentals, Methods, Experiments*. (2005). Cuarta edición. Berlin: Springer.
- [11] Hollaender, A.; Greenstein, J.; Jenrette, W. (1941). Effects of Ultraviolet Radiation on Sodium Thymonucleate. *Journal of the National Cancer Institute*, 2, 23-28.
- [12] Greenstein, J.; Jenrette, W. (1941). Physical Changes in Thymonucleic Acid Induced by Proteins, Salts, Tissue Extracts, and Ultra-violet Irradiation. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 9, 236-252.
- [13] Blackburn, G.; Davies, R. (1966). The Structure of Thymine Photo-Dimer. *Journal of the American Chemical Society*, 23, 2239-2244.



- [14] Lamola, A.; Mittal, J.P. (1966). Solution Photochemistry of Thymine and Uracil. *Science*, 154(3796), 1560-1561.
- [15] Voet, D.; Voet, J.G.; Pratt, C.W. (2008). *Fundamentos de Bioquímica. La vida a nivel molecular*. (Segunda ed.). Buenos Aires: Médica panamericana, 891-896.
- [16] Pathak, M.A.; Fitzpatrick, T.B.; Parrish, J.A. in: Psoriasis: Proceedings of the Second International Symposium. (1977). E. Farber, A. J. Cox, P. H. Jacobs, M. L. Nall, Eds., York Medical Books, New York, 262–271.
- [17] Iñaki, Y.; Hiratsuka, H. (2000). Reversible Photo-Cross-linking of Polyvinyl Alcohol Containing Thymine. *Journal Photopolymer Science and Technology*, 13(5), 739-744.
- [18] Cheng, C.; Ecbe, M.I.; Grasshoff, J.M.; Guarrera, D.J.; Pai, R.P.; Warner, J.C.; Taylor, L.D. (1995). The Synthesis of 1-[Vinylbenzyl]thymine, a very Versatile Monomer. *Journal Polym. Sci. Polym. Chem.*, 33, 2515.
- [19] Grasshoff, J.; Taylor, L.; Warner, J. (1995). Vinylbenzyl thymine monomers. *Patente n° 5.455.349*. U.S.
- [20] Grasshoff, J.; Taylor, L.; Warner, J. (1995). Copolymeric mordants and photographic products and processes containing same. *Patente n° 5.395.731* U.S.
- [21] Grasshoff, J.; Taylor, L.; Warner, J. (1997). Method of imaging using a polymeric photoresist having pendant vinylbenzyl thymine groups. *Patente n° 5.616.451*. U.S.
- [22] Grasshoff, J.; Taylor, L.; Warner, J. (1998). Copolymers having pendant functional thymine groups. *Patente n° 5.708.106*. U.S.
- [23] Lloyd-Kindstrand, L.; Warner, J. (2003). *Thymine Containing Styrene Polymers as Environmentally Benign Photoresists*. (A. Steinbuechel, & S. Matsumura, Edits.) Weinheim: Wiley. 165-174.
- [24] Barbarini, A.R.; Estenoz, D.A.; Martino, D.M. (2010). Synthesis, Characterization and Curing of Bioinspired polymers Based on Vinyl Benzyl Thymine and Triethyl Ammonium Chloride. *Macromolecular Reaction Engineering*, 4, 453-459.
- [25] Saito, K.; Ingalls, L.R.; Lee, J.; Warner, J.C. (2007). Core-bound polymeric micellar system based on photocrosslinking of Thymine, *ChemComm*, 24, 2503-2505.



- [26] Cannon, A.; Raudys, J.; Undurti, A.; Warner, J. (2004). Photoreactive Polymers and Devices for Use in Hair Treatments. *Patente nº WO 2004058187*. PCT Int. Appl.
- [27] Trakhtenberg, S.; Hangan-Balkir, Y.; Warner, J.; Bruno, F.; Kumar, J.; Nagarajan, R., y otros. (2005). Photocrosslinked Immobilization of Polyelectrolytes for Enzymatic Construction of Conductive Nanocomposite. *Journal of the American Chemical Society*, 127, 9100-9104.
- [28] El-Hayek, R.; Dye, K.; Warner, J. (2006). Bacteriostatic Polymeric Film Immobilization. *Journal of Biomedical Materials Research: Part A*, 79A, 874-881.
- [29] Kaur, G.; Chang, S.L.; Bell, T.D.; Hearn, M.T.; Saito, K. (2011). Bioinspired Core-Crosslinked Micelles from Thymine-Functionalized Amphiphilic Block Copolymers: Hydrogen Bonding and Photo-Crosslinking Study. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 49, 4121.
- [30] Sperling L.H. INTRODUCTION TO PHYSICAL POLYMER SCIENCE. Cuarta edición. (2006). Bethlehem, Pennsylvania. Cap. 2, 6-8.
- [31] Davis F.J. Polymer Chemistry a Practical Approach. (2004). Primera edición. Oxford University Press. Oxford, New York. Cap 1, 4-7.
- [32] Stetter J.R.; Penrose W.R.; Yao S. (2003). Sensors, Chemical Sensors, Electrochemical Sensors, and ECS. *J. Electrochem. Soc.* 150:S11-S16.
- [33] Ibañez, G.A.; Escandar, G.M. (2011). Luminescence Sensors Applied to Water Analysis of Organic Pollutants—An Update, *Sensors*, 11, 11081-11102.
- [34] Achten, C.; Andersson, J.T. (2015). Overview of Polycyclic Aromatic Compounds (PAC), *Polycyclic Aromatic Compounds*, 35, 177-186.
- [35] Fernández-Sánchez, J.F.; Segura Carretero, A.; Cruces-Blanco, C.; Alberto Fernández-Gutiérrez, A. (2003). The development of solid-surface fluorescence characterization of polycyclic aromatic hydrocarbons for potential screening tests in environmental samples. *Talanta*. 60, 287-293.
- [36] Shen, H. (2016). Polycyclic aromatic hydrocarbons. Their Global Atmospheric Emissions, Transport, and Lung Cancer Risk. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- [37] Santodonato, J. (1997). Review of the estrogenic and antiestrogenic activity of polycyclic aromatic hydrocarbons: relationship to carcinogenicity. *Chemosphere*, 34, 835-848.



- [38] Yan, J.; Wang, L.; Fu, P.; Yu, H. (2004). Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis. *Mutation Research*, 557, 256-253.
- [39] Environmental Protection Agency (EPA) of the United States of America (1999). Compendium Method TO-13A. Cincinnati, OH, USA.
- [40] Council of the European Communities (1998). Directive 98/83/EC. *Official Journal of European Communities*, L330, 32.
- [41] US EPA, Methods for Organic Chemical Analysis of Municipal and Industrial Waste water, Method 610, Polynuclear Aromatic Hydrocarbons, U.S. Environmental Protection Agency, Washington, D.C., (1984). EPA, Method 550.1 Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Drinking Water by Liquid-solid Extraction and HPLC with Coupled Ultraviolet and Fluorescence Detection.
- [42] ISO 13877, Soil quality - Determination of polynuclear aromatic hydrocarbons (PAH) - Method using high-performance liquid chromatography, ISO 17993, Water quality - Determination of 15 polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in water by HPLC with fluorescence detection after liquid-liquid extraction, ISO, 17993:2002. Water quality. Determination of 15 polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in water by HPLC with fluorescence detection after liquid-liquid extraction.
- [43] Vo-Dinh, T. (1989). *Chemical Analysis of Polycyclic Aromatic Compounds*. New York: Wiley.
- [44] Molina-Díaz A.; García-Reyes, J.F.; Gilbert-López, B. (2010). Solid-phase spectroscopy from the point of view of green analytical chemistry. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 29, 654-666.
- [45] Pérez, R.L.; Escandar, G.M. (2016). Experimental and chemometric strategies for the development of Green Analytical Chemistry (GAC) spectroscopic methods for the determination of organic pollutants in natural waters. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, 4, 1-12.
- [46] Guardia, M.d.I.; Garrigues, S. Handbook of green analytical chemistry. (2012). John Wiley & Sons, Chichester, West Sussex, UK; Hoboken.
- [47] Powe, A.M.; Das, S.; Lowry, M.; El-Zahab, B.; Fakayode, S.O.; Geng, M.L.; Baker, G.A.; Wang, L.; McCarroll, M.E.; Patonay, G.; Li, M.; Aljarrah, M.; Neal, S.; Warner, I.M. (2010). Molecular



- Fluorescence, Phosphorescence, and Chemiluminescence Spectrometry, *Analytical Chemistry*, 82, 4865-4894.
- [48] Wolfbeis, O.S. (2006). Fiber-Optic Chemical Sensors and Biosensors, *Analytical Chemistry*, 78, 3859-3874.
- [49] Capitán-Vallvey, L.F.; Palma, A.J.; Olmos, A.M.; Erenas, M.M. *Luminescence [Solid Phase]* ☆ (2019). Encyclopedia of Analytical Science. 3ª edición. Editores: P. Worsfold, C. Poole, A. Townshend, M. Miró. Academic Press, Oxford. 281-292.
- [50] Lakowicz, J.R.; Geddes, C.D. Topics in fluorescence spectroscopy (1991). Plenum Press, New York.
- [51] Lakowicz, J.R. Principles of Fluorescence Spectroscopy. (2006). Springer US.
- [52] Qi-Shi Du, Qing-Yan Wang, Li-Qin Du, Dong Chen y Ri-Bo Huang. (2013). Theoretical study on the polar hydrogen- π (Hp- π) interactions between protein side chains. *Chemistry Central Journal*, 7:92.
- [53] Panasik N.; Fleming P.J.; Rose G.D. (2005). Hydrogen-bonded turns in proteins: the case for a recount. *Protein Science*, 14, 2910-2914.
- [54] Booksh, K.S.; Kowalski, B.R. (1994). Theory of analytical chemistry. *Analytical Chemistry*. 66, 782A-791A.
- [55] IUPAC. Autores: Hibbert, D.; Korte E.H.; Örnemark, U. (2020). Metrological and quality concepts in analytical chemistry. *Pure and Applied Chemistry*. ID: PAC-REC-2019-0819.R2
- [56] Olivieri, A.C. *Introduction to Multivariate Calibration. A Practical Approach*. (2018). Springer Nature Switzerland AG. 2-6.
- [57] Bro, R. (1997). PARAFAC. *Tutorial and applications, Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*. 38, 149-171.
- [58] Olivieri, A.C.; Escandar, G.M. (2014). *Practical Three-Way Calibration*. Editores: A.C. Olivieri, G.M. Escandar (Eds.), Elsevier, Boston. Capítulos 1, 2, 3 y 5.
- [59] Alvarez Lorenzo, C.; Concheiro, A.; Sosnik, A. Polymeric micelles for drug encapsulation, targeting and release. (2015). Imprensa da Universidade de Coimbra. Capítulo 5. ISBN: 978-989-26-0880-8.



- [60] Saito, K.; Ingalls, L.R.; Lee, J.; Warner, J.C. (2007). Core-bound polymeric micellar system based on photocrosslinking of Thymine, *ChemComm*, 24, 2503-2505.
- [61] Barbarini, A.L.; Estenoz, D.A.; Martino, D.M. (2015). Crosslinkable micelles from diblock amphiphilic copolymers based on vinylbenzyl thymine and vinylbenzyl triethylammonium chloride. *Journal of Applied Polymer Science*, 41947.
- [62] Bowden, M. (1984). A perspective on resist materials for fine-line lithography. *Materials for Microlithography. Radiation-Sensitive Polymers*. L. Thompson, C. Willson, & J. Frechet (ed.), Washington: ACS.
- [63] Levinson, H. (2001). *Principles of Lithography*. SPIE - The International Society for Optical Engineering.
- [64] Ledesma, J. *Caracterización, modelado y aplicaciones de polímeros bioinspirados*. (2014). Tesis de grado. Facultad de Farmacia y Bioquímica, UNR. Rosario.
- [65] Kiarie, C.; Bianchini, J.; Trakhtenberg, S.; Warner, J. (2005). Methylene blue adsorption on thymine based polyvinylphenylsulfonate films. *Journal of Macromolecular Science, Part A*, 42, 1489-1496.
- [66] Miller, N.; Miller, N. (2005). *Statistics and chemometrics for analytical chemistry*. 5° edición. Essex: Prentice Hall. 189-208.
- [67] Olivieri, A. (2008). Analytical Advantages of Multivariate Data Processing. One, Two, Three, Infinity?. *Analytical Chemistry*, 80, 5713-5720.
- [68] Armenta, S.; Garrigues, S.; de la Guardia, M. (2008). Green Analytical Chemistry. *Trends Analytical Chemistry*, 27, 497-511.
- [69] Jaumot, J.; Gargallo, R.; de Juan, A.; Tauler, R. (2005). A graphical user-friendly interface for MCR-ALS: a new tool for multivariate curve resolution in MATLAB. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 76, 101-110.
- [70] Bortolato, S.A.; McDonough, K.; Gurney, R.W.; Martino, D.M. (2014). Second order multivariate curve resolution of Fourier transform infrared spectroscopic data of the photo-induced crosslinking of thymine functionalized polymers. *Talanta*, 127, 204-210.



- [71] Galuszka, A.; Migaszewski, Z.; Namiesnik, J. (2013). The 12 principles of green analytical chemistry and the SIGNIFICANCE mnemonic of green analytical practices. *Trends Analytical Chemistry*, 50, 78-84.
- [72] Morsy, M.A.; Al-Somali, A.M.; Suwaiyan, A. (1999). Fluorescence of Thymine Tautomers at Room Temperature in Aqueous Solutions. *Journal Physical Chemistry B* 103, 11205-11210.
- [73] Sonnenschein, M. F.; Roland, C.M. (1990). Absorption and fluorescence spectra of poly(ethylene terephthalate) dimers. *Polymer*, 31, 2023-2026.
- [74] Ouchi, I.; Miyamura, R.; Sakaguchi, M.; Hosaka, S.; Kitagawa, M. (1999). Excitation and emission spectra of polyethylene terephthalate and polyethylene 2,6-naphthalate films. *Polymers for Advanced Technologies*, 10, 195-198.
- [75] Itagaki, H.; Arakawa, S. (2009). Dynamic process of cold crystallization of poly(butylene terephthalate) solids revealed by fluorescence spectroscopy. *Polymer*, 50, 1491-1496.
- [76] Jaumot, J.; Vives, M.; Gargallo, R.; Tauler, R. (2003). Multivariate resolution of NMR labile signals by means of hard- and soft-modelling methods. *Analytica Chimica Acta*, 490, 253-264.
- [77] De Juan, A.; Casassas, E.; Tauler, R. *In Encyclopedia of Analytical Chemistry*. (2000). Editado por R. A Meyers. Chichester: John Wiley & Sons, Ltd.
- [78] Foresman, J.B.; Frisch, Æ. *Exploring Chemistry with Electronic Structure Methods*. (1996). Segunda edición. Gaussain Inc. Pittsburgh. 46-54.
- [79] Hyperchem Professional Release 7.52, Hypercube, (2005).
- [80] Zhao, Y.; Truhlar, D.G. (2008). Density Functionals with Broad Applicability in Chemistry. *Acc. Chem. Res.*, 41, 157-167.
- [81] Vreven, T.; Mennucci, B.; Silva, C.O.D.; Morokuma, K.; Tomasi, J. (2001) The ONIOM-PCM method: Combining the hybrid molecular orbital method and the polarizable continuum model for solvation. Application to the geometry and properties of a merocyanine in solution *J. Chem. Phys.* 115, 62.
- [82] Ledesma, J; Boschetti, C.; Martino, D; Bortolato, S.A. (2020). Application of thymine-based copolymers in the quantification of organic pollutants in water by sensitized fluorescence. *Microchemical Journal*. ISSN 0026-265X.



- [83] Parastar, H.; Radović, J.R.; Jalali-Heravi, M.; Diez, S.; Bayona, J.M.; Tauler, R. (2011). Resolution and Quantification of Complex Mixtures of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Heavy Fuel Oil Sample by Means of GC x GC-TOFMS Combined to Multivariate Curve Resolution. *Analytical Chemistry*, 83, 9289–9297.
- [84] Bauza, M.C.; Ibañez, G.A.; Tauler, R.; Olivieri, A.C. (2012). Sensitivity Equation for Quantitative Analysis with Multivariate Curve Resolution-Alternating Least-Squares: Theoretical and Experimental Approach. *Analytical Chemistry*, 84, 8697-8706.
- [85] Van Aken, K.; Strekowski, L.; Patiny, L. (2006). EcoScale, a semi-quantitative tool to select an organic preparation based on economical and ecological parameters. *Beilstein Journal of Organic Chemistry*. 2. Nº 3. <https://doi.org/10.1186/1860-5397-2-3>.
- [86] United Nations, Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS, Rev. 4). (2011). Naciones Unidas, Nueva York, EE.UU.
- [87] Raynie, D.; Driver, J.L. (2009). Green assessment of chemical methods. 13th Green Chem. Eng. Conf., Washington, DC, EE.UU.
- [88] <http://www.models.kvl.dk/source/>.
- [89] HORIBA Scientific A GUIDEBOOK TO PARTICLE SIZE ANALYSIS. (2016). HORIBA INSTRUMENTS, INC. Irvine, EE.UU.
- [90] MacLeod, D.M. "Wire-wound rod coating" in *Coatings Technology Handbook*. Segunda edición. (2001). Editado: D. Satas y A.A. Tracton. New York: Marcel Dekker, Inc., 129-138.
- [91] Frisch, M.J. y otros autores. (2009). *Gaussian 09, Revision A.02*. Gaussian, Inc., Wallingford, Connecticut, EE.UU.
- [92] MATLAB. (2000). The Mathworks, Natick, Massachusetts, EE.UU.
- [93] <http://www.iquir-conicet.gov.ar/descarga/mvc2.zip>.
- [94] Valuer, B. *Molecular Fluorescence principles and applications*. (2002). Willey, Weinheim, Germany.
- [95] Niko, Y.; Cho, Y.; Kawauchi, S.; Konishi, G. (2014). Pyrene-based D- π -A dyes that exhibit solvatochromism and high fluorescence brightness in apolar solvents and water. *RSC Adv.*, 4, 36480–36484.



- [96] Ya Freidzon, A.; Valiev, R.R.; Berezhnoy, A.A. (2014). *Ab initio* simulation of pyrene spectra in water matrices. *RSC Adv.*, 4, 42054–42065.
- [97] Teraoka, I. *Polymer Solutions: An Introduction to Physical Properties*. (2002). Wiley, New York.
- [98] Pace, C.J.; Gao, J. (2013). Exploring and Exploiting Polar- π Interactions with Fluorinated Aromatic Amino Acids. *Accounts of Chemical Research*, 46, 907–915.
- [99] Ríos-Reina, R.; Ocaña, J.A.; Azcarate, S.M.; Pérez-Bernal, J.L.; Villar-Navarro, M.; Callejón, R.M. (2019). Excitation-emission fluorescence as a tool to assess the presence of grape-must caramel in PDO wine vinegars, *Food Chemistry*, 287, 115-125.
- [100] Bortolato, S.A.; Arancibia, J.A.; Escandar, G.M. (2008). Chemometrics-Assisted Excitation–Emission Fluorescence Spectroscopy on Nylon Membranes. Simultaneous Determination of Benzo[a]pyrene and Dibenz[a,h]anthracene at Parts-Per-Trillion Levels in the Presence of the Remaining EPA PAH Priority Pollutants As Interferences, *Analytical Chemistry*, 80, 8276-8286.
- [101] Olivieri, A.C.; Escandar, G.M. (2019). Analytical chemistry assisted by multi-way calibration: A contribution to green chemistry, *Talanta*, 204, 700-712.
- [102] Martí, R.B.; Baldrich, J.F.; Chapter 1 - Fundamentals of PARAFAC, in: A.M. de la Peña, H.C. Goicoechea, G.M. Escandar, A.C. Olivieri (Eds.) *Data Handling in Science and Technology*, Elsevier, (2015), pp. 7-35.
- [103] Brasca, R.; Goicoechea, H.C.; Culzoni, M.J. Chapter 6 - Multiway Calibration Approaches for Quality Control of Food Samples, in: A.M. Grumezescu, A.M. Holban (Eds.) *Food Safety and Preservation*, Academic Press, (2018), pp. 143-165.
- [104] Olivieri, A.C. (2014). Analytical Figures of Merit: From Univariate to Multiway Calibration, *Chemical Reviews*, 114, 5358-5378.
- [105] Gardiner, W.P. (1997). Simple chemical experiments: Parametric inferential data analysis, in: W.P. Gardiner (Ed.) *Statistical Analysis Methods for Chemists: A Software Based Approach*, The Royal Society of Chemistry, pp. 19-79.
- [106] H. van der Voet. (1994). Comparing the predictive accuracy of models using a simple randomization test, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 25, 313-323.



- [107] Olivieri, A.C. (2015). Practical guidelines for reporting results in single- and multicomponent analytical calibration: A tutorial, *Analytica Chimica Acta*, 868, 10-22.
- [108] González, A.G.; Herrador, M.A.; Asuero, A.n.G. (1999). Intra-laboratory testing of method accuracy from recovery assays, *Talanta*, 48, 729-736.
- [109] Forsgren, A.J. Wastewater Treatment: Occurrence and Fate of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs). (2015). *CRC Press*, Tylor and Francis group.
- [110] Brum, D.M.; Cassella, R.J.; Pereira Netto, A.D. (2008). Multivariate optimization of a liquid-liquid extraction of the EPA-PAHs from natural contaminated waters prior to determination by liquid chromatography with fluorescence detection, *Talanta*, 74, 1392-1399.
- [111] Sarria-Villa, R.; Ocampo-Duque, W.; Páez, M.; Schuhmacher, M. (2016). Presence of PAHs in water and sediments of the Colombian Cauca River during heavy rain episodes, and implications for risk assessment, *Science of The Total Environment*, 540, 455- 465.
- [112] <https://www.atsdr.cdc.gov/csem/csem.asp?Csem=13&po=8>, (accessed March 2019).
- [113] Casis, N.; Luciani, C.V.; Vich Berlanga, J.; Estenoz, D.A.; Martino, D.M.; Meira, G.R. (2007). Synthesis of “bioinspired” copolymers: experimental and theoretical investigation on poly(vinyl benzyl thymine-co-triethyl ammonium chloride), *Green Chemistry Letters and Reviews*, 1, 65-72.
- [114] Zhao, C.L; Winni, M.A. (1990). Fluorescence Probe Techniques Used To Study Micelle Formation in Water-Soluble Block Copolymers. *Langmuir*, 6, 514-516
- [115] MATHEMATICA 7.0, Wolfram Research: Champaign, IL, 2009.