

ESTUDIO FLUORESCENTE DEL COMPLEJO 8-HIDROXIQUINOLEINA-METAL PARA LA DETECCIÓN DE METALES PESADOS EN EL AMBIENTE

Luisina Schlapbach^A

^A*Tesinista/becaria del Laboratorio de Sensores y Biosensores (LSB) - Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas (FBCB) - UNL*

Área: Ciencias exactas

Sub-Área: Química

Grupo: X

Palabras clave: detección fluorescente, metales pesados, 8-Hidroxiquinoleina

INTRODUCCIÓN

Los metales pesados, por definición, son aquellos que tienen una densidad $>$ a 45 g cm^{-3} y no son biodegradables (Nordberg y col., 2007). Su detección es de gran interés debido a que la presencia de estos, en el ambiente tiene efectos negativos sobre la salud del hombre, de los animales y de los cultivos agrícolas, además de causar un desequilibrio en el ecosistema en general. Existe evidencia suficiente de que la contaminación del ambiente, con metales pesados, puede repercutir fácilmente en toda la cadena trófica (suelo, agua, aire, plantas, organismos, etc.), desde ahí pasar a los animales, acumularse en sus tejidos, órganos, y posteriormente, pasar a sus producciones (carne, huevos y leche), y que, evidentemente llegarán al hombre como consumidores finales de la cadena trófica (Gutiérrez-Chávez, 2009). Algunos efectos negativos sobre los animales y el hombre, pueden ser daños a nivel del sistema nervioso, en la función hepática y renal, en el sistema músculoesquelético, en la función reproductiva, alteraciones mutagénicas, efectos carcinogénicos e inmunológicos (OMS, 2005).

La contaminación del ambiente con metales pesados surge como resultado de actividades humanas, principalmente industriales, así como también agrícolas. Estos contaminantes son descargados en la atmósfera y en los ambientes acuáticos y terrestres, principalmente como solutos o partículas y pueden alcanzar concentraciones elevadas en los mismos (Cañizares-Villanueva, 2000).

Existen numerosos métodos de detección de metales pesados entre los que se pueden citar: Espectrometría de Absorción Atómica, Espectrometría de Masa Inductiva de Plasma Acoplado, Voltametría de Redisolución Anódica, Espectrometría de Fluorescencia de Rayos X, Espectrometría de Absorción Atómica con Horno de Grafito, Espectrometría de Fluorescencia Atómica, entre otros (Feng y col., 2013).

En el caso de los métodos fluorimétricos, estos muestran elevada potencialidad debido a su alta sensibilidad. Indicadores fluorescentes disponibles comercialmente combinados con sensores fluorimétricos se han desarrollado para la detección de metales (Wang y col., 2008). Dentro de los fluoróforos utilizados para la detección de metales pesados se encuentran la 8-hidroxiquinolona (8-HQ), los derivados de acridina, la 4,5-diamino-1,8-naftalimida/picolilamina, quinolina/picolamina y el boron-dipyrromethene. Está demostrado que la 8-HQ es capaz de reaccionar con plomo

Proyecto: CAI+D 2011 código 501 201101 00042 Res. 245/13 y Beca de Innovación tecnológica de la Fundación del Nuevo Banco Santa Fe (2016-2017). Director del proyecto: Silvia Fabiano.

Directora de la tesinista/becaria: Kergaravat, Silvina Vanesa.

Co-Directora de la tesinista/becaria: Hernández, Silvia Raquel.

(Pb), cobalto (Co), zinc (Zn), cobre (Cu), hierro (Fe), magnesio (Mn), níquel (Ni) y cadmio (Cd) (Willie y col., 1998).

OBJETIVOS

El objetivo de este trabajo fue evaluar la fluorescencia del complejo formado por la 8-HQ con diferentes metales pesados, y selecciona el metal modelo para desarrollar un método de screening que permita detectar metales pesados en el ambiente.

METODOLOGÍA

Instrumentación y reactivos

Las mediciones de absorción se realizaron con un espectrofotómetro UV-VIS Perkin-Elmer Lambda 20; mientras que las mediciones de fluorescencia se llevaron a cabo en un espectrómetro de luminiscencia Perkin-Elmer LS 55 (Llantrisan, United Kindom)

Las placas de microtitulación de 96 pocillos blancas se adquirieron en Nunc.

Los reactivos utilizados fueron: 8-HQ (Merck), nitrato de plomo $[\text{Pb}(\text{NO}_3)_2]$ (Merck), cloruro de cobalto hexahidratado $[\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}]$ (Sigma), sulfato de cobre pentahidratado $[\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}]$ (Carlo Erba), sulfato ferroso heptahidratado $[\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}]$ (Cicarelli), acetato de cadmio $[\text{Cd}(\text{CH}_3\text{CO}_2)_2]$ (Cicarelli), sulfato de zinc heptahidratado $[\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}]$ (Mallinckrodt) y sulfato de níquel $[\text{NiSO}_4]$ (Merck).

Como solución reguladora de trabajo, se preparó la solución Britton-Robinson (B-R) constituida por sales de acetato, fosfato y borato, a pH 4, 7 y 10.

Como detergentes a evaluar se utilizaron: cocoaminopropil betaína, cloruro de benzalconio, dodecil sulfato de sodio (SDS), N-lauroylsuccidine (LSS), Tween-20, Triton X-100 y poly(diallyldimethylammonium choride) (Poly DMDAAC), adquiridos en Sigma.

Evaluación de la absorbancia de los complejos metálicos

En una primera instancia, se estudió la respuesta de la absorbancia de los complejos metálicos con la 8-HQ. Para esto se realizaron barridos, con el espectrofotómetro, desde 200 a 800 nm de longitud de onda. Los metales se analizaron a una concentración de 1 ppm, mientras que la 8-HQ se evaluó a $5 \cdot 10^{-5}$, según lo sugerido en la bibliografía (Talio y col., 2014).

Todos los ensayos se realizaron por triplicado y se evaluaron a distintos pH de la solución reguladora B-R (4, 7 y 10).

Evaluación fluorescente de los complejos metálicos

Se realizaron barridos con el espectrofluorímetro, en cubetas de 2 ml, donde cada metal fue excitado a la longitud de onda a la que presentaba el máximo de absorbancia en los ensayos realizados con el espectrofotómetro. De estos barridos se obtuvieron máximos de intensidad de fluorescencia a determinadas longitudes de onda de emisión, seleccionando de esta manera, los pares de longitud de onda de excitación y emisión para cada complejo metálico, a los diferentes pHs (4, 7, 10). En estos ensayos, los metales se evaluaron por triplicado a 0,1 ppm, y la 8-HQ a $5 \cdot 10^{-8}$ mol L^{-1} .

Posteriormente, se evaluaron las respuestas de intensidad de fluorescencia a los pares de longitud de onda de excitación y emisión seleccionados anteriormente, para los complejos metálicos en las microplacas de titulación. La utilización de estas placas permite realizar 96 ensayos simultáneamente, reduciendo el tiempo de análisis y el volumen de muestra (volumen final del pocillo = 300 μL). Luego, se seleccionaron las condiciones instrumentales óptimas (slits de excitación y emisión y filtros) para los complejos metálicos y se evaluó si la adición de distintos tipos detergentes de tipo

iónico, aniónico, anfótero o catiónico, contribuía a mejorar la respuesta fluorescente del complejo.

Por último, el complejo metálico con las mejores características, se seleccionó con la finalidad de elegir al metal pesado modelo para el desarrollo del método fluorescente.

RESULTADOS/CONCLUSIONES

En la tabla 1 se pueden visualizar las longitudes de onda de absorbancia obtenidas con el espectrofotómetro, para cada complejo metálico, y las longitudes de onda de excitación y emisión evaluadas con el espectrofluorímetro, en la cubeta de 2ml.

Tabla 1: Condiciones preliminares óptimas obtenidas con el espectrofotómetro y el espectrofluorímetro para cada complejo metálico a los diferentes pHs.

Metal	pH	λ (nm) de Absorbancia	λ (nm) de Excitación	λ (nm) de Emisión
PLOMO	4	250	250	398
	7	269	264	298
	10	240	240	414
CADMIO	4	251	251	416
	7	238	238	417
COBALTO	7	252	252	416
	10	327	326	411
COBRE	10	252	255	431
HIERRO	10	249	249	391
				419
NIQUEL	7	238	238	415
	10	252	252	417
ZINC	10	252	252	386

En la tabla 2 se pueden observar las condiciones óptimas de: longitud de onda de excitación, longitud de onda de emisión, Slit de excitación ($slit_{ex}$), slit de emisión ($slit_{em}$), filtro y pH, para cada complejo metálico, realizadas en la microplaca de titulación.

Metal	pH	λ_{ex} (nm)	λ_{em} (nm)	$Slit_{ex}$ (nm)	$Slit_{em}$ (nm)	Filtro
PLOMO	4	250	398	10	10	Open
	7	264	298	5	15	Open
	10	240	414	5	15	350 nm
CADMIO	7	238	417	5	15	350 nm
COBALTO	10	326	411	5	15	350 nm
COBRE	10	255	431	5	15	350 nm
HIERRO	10	249	341	5	15	350 nm
NIQUEL	7	238	415	5	15	350 nm
ZINC	10	252	386	5	15	350 nm

Tabla 2: Condiciones óptimas obtenidas en la placa de microtitulación con el espectrofluorímetro para cada complejo metálico.

El metal pesado escogido para utilizar como modelo en el desarrollo de este método

fluorescente, fue el plomo, ya que el mismo presentó respuestas, tanto en el espectrofotómetro como en el espectrofluorímetro, a los tres pHs analizados. Las condiciones seleccionadas para el plomo, a los 3 pHs, se aplicaron a los demás complejos metálicos.

A partir de los resultados obtenidos se logró seleccionar los máximos de excitación y emisión para cada metal, evidenciando la interacción entre estos y el reactivo (8-HQ). Por otro lado, se pudo observar que las mejores respuestas fueron obtenidas a pH 7 y 10, en los distintos complejos metálicos.

Debido que el metal que presentó las mejores características fluorescentes con la 8-HQ fue el plomo, este fue seleccionado como metal pesado modelo para el desarrollo del método de cribado o *scriming*.

Como perspectiva se evaluará la influencia de la adición de diferentes tipos de detergentes (catiónicos, iónico, no iónico y anfóteros), sobre la detección fluorescente. También se llevará a cabo la optimización de los parámetros experimentales involucrados en el método de *scriming* en desarrollo para metales pesados, mediante herramientas quimiométricas, con la finalidad de maximizar la respuesta y lograr detectar a los metales pesados en niveles traza, ya que son los niveles en los cuales se encuentran en el ambiente. Agradecimientos: Proyecto CAID 2011 501 201101 00042 (UNL) y a la Fundación del Nuevo Banco de Santa Fe., por la beca brindada al estudiante.

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

Cañizares-Villanueva, R. O., 2000. Biosorción de metales pesados mediante el uso de biomasa microbiana. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 42:131-143

Feng, L., Li, H., Niu, L., Guan, Y., Duan, C., Guan, Y., Tung, C., Yang, Q., 2013. A fluorometric paper-based sensor array for the discrimination of heavy-metal ions. *Talanta*, 108: 103–108

Gutiérrez-Chávez, A. J., 2009. Concentración de metales pesados en leche cruda de vaca en la provincia de León, España. Tesis Doctoral. Universidad de León. 372 p.

Nordberg, G. F., Fowler, B. A., Nordberg, M., Friberg, L., 2007. *Handbook on the Toxicology of Metals*. 3 ed. Burlington, USA. Academic Press. 1024 p.

OMS (Organización Mundial de la Salud), 2005. Reglamento Sanitario Internacional (RSI). Ginebra: Disponible en: <http://www.who.int/csr/ihr/es/index.html>. Acceso el 5 Julio 2016.

Talio, M. C., Alesso, M., Acosta, M. G., Mariano Acosta, M., Liliana P. Fernández, L. P. 2014. Sequential determination of lead and cobalt in tap water and foods samples by fluorescence. *Talanta*, 127: 244 – 249.

Wang, Z., Palacios, M. A., Anzenbacher. P., 2008. Fluorescence sensor array for metal ion detection based on various coordination chemistries: General performance and potential application. *Anal. Chem*, 80: 7451–7459.

Willie, S. N., Iida, Y., McLaren, J. W., 1998. Determination of Cu, Ni, Zn, Mn, Co, Pb, Cd, and V in Seawater Using Flow Injection ICP-M. *At. Spectrosc*, 3: 67-72.