

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA  
IZTAPALAPA**

TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS (QUÍMICA)

**Optimización de parámetros en fluorescencia para la obtención  
de valores de pka de la Eosina-Y**

PRESENTA

Lic. Q. Alan Joshep Chavez Vasquez

ASESOR

Dr. Alberto Rojas Hernández

Co-asesor

Dr. Federico Gonzales García

## **Agradecimientos**

A mis padres Felipe Chavez Salazar y Xochitl Vasquez Uribe, ya que ellos siempre me han apoyado en todo lo que tenga que ver con mi vida tanto moralmente como en mis proyectos. A ellos les debo este gran logro y se los dedico. Gracias por todo. Los amo.

A mi única hermana Amairani, quien con ella esta vida es divertida y espero que este logro también dedicado para ella la impulse a cumplir sus objetivos. Siempre hay solución para todo. Has de tu vida un arte.

A mis amigos de la preparatoria: Isaac, Juan, Fabiola y Nancy. Quienes a pesar de los años siguen estando conmigo en las buenas y las malas. Gracias amigos por sus palabras y por cada salida que sirve como distracción del mundo rutinario. Viva el bacho 10.

A toda la banda de la UAMI, en especial a Miguel, Jennifer, Carlos, Deysi, Marcos Red y Victor (Iras) quienes me han dado sus palabras de apoyo y me han permitido estar en sus vidas. Gracias amigos que viva la UAM.

A mis amigos fuera del ámbito escolar, Nancy (nanito), Rosa, Saúl (Koala), Camila, Michelle y más que un amigo mi primo Erick. Gracias a ustedes por su compañía y ratos de diversión. Pueden lograr lo que se propongan.

A mis sinadoles, Dra. María Teresa Ramírez Silva, Dra. Rosario Moya Hernández, Dr Carlos Andrés Galán Vidal, ya que con sus valiosas sugerencias y comentarios, desarrolle un mejor trabajo y entendí la importancia de éste.

A mi asesor Doctor Alberto Rojas Hernández, quien sin su apoyo moral, académico y económico, no hubiese terminado este proyecto y no me hubiese formado de ser un estudiante a ser un químico.

Al apoyo financiero del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT beca 237997, CVU/No. de Becario 652172/615275)

Resumen.....	6
Capítulo 1. Introducción y objetivos.....	8
1.1 Introducción.....	8
1.2 Antecedentes e hipótesis.....	10
1.3 Objetivos generales.....	16
1.4 Objetivos particulares.....	16
Capítulo 2. Procedimientos experimentales.....	17
2.1 Pruebas de estabilidad para las especies de Eosina-Y.....	17
2.2 Determinación de curva de calibración por espectroscopia de UV-visible.....	17
2.2.1 Preparación de soluciones.....	17
2.2.2 Procedimiento experimental.....	18
2.3 Determinación de curva de calibración por espectroscopia de fluorescencia.....	18
2.3.1 Preparación de soluciones.....	18
2.3.2 Procedimiento experimental.....	19
2.4 Valoraciones por espectroscopia de UV-visible ácido-base.....	20
2.4.1 Preparación de soluciones.....	20
2.4.2 Procedimiento experimental.....	20
2.5 Valoraciones por espectroscopia de fluorescencia ácido-base.....	21
2.5.1 Preparación de soluciones.....	21
2.5.2 Procedimiento experimental.....	21
Capítulo 3 Resultados y discusión.....	22
3.1 Pruebas de estabilidad para las especies de Eosina-Y.....	22
3.1.1 Prueba de estabilidad para H <sub>2</sub> EY.....	22
3.1.2 Prueba de estabilidad para HEY <sup>-</sup> .....	24

3.1.3 Prueba de estabilidad para $EY^{2-}$ .....	26
3.2 Determinación de curva de calibración por espectroscopia UV-visible.....	29
3.3 Determinación de curva de calibración por espectroscopia de fluorescencia.....	32
3.3.1 Longitud de excitación de 300 y 340 nm.....	32
3.3.2 Longitud de excitación de 490 y 515 nm.....	35
3.3.3 Longitud de excitación de 240 y 410 nm.....	39
3.3.4 Longitud de excitación de 250 y longitud de emisión 540 nm.....	43
3.4 Valoraciones por espectroscopia de UV-visible ácido-base concentración $1 \times 10^5 M$ .....	47
3.4.1 Valoraciones por espectroscopia de UV-visible ácido-base para $210 nm < \lambda < 605 nm$ .....	47
3.4.1.1 Determinación de valores de pka utilizando SQUAD.....	51
3.4.1.2 Bondad del cálculo.....	51
3.4.2.1 Valoraciones por espectroscopia de UV-visible ácido-base para $370 nm < \lambda < 605 nm$ . .....	52
3.4.2.2 Determinación de valores de pka utilizando SQUAD.....	54
3.4.2.3 Bondad del cálculo.....	55
3.5.1 Valoraciones por espectroscopia de UV-visible ácido-base concentración $2.5 \times 10^6 M$ .....	56
3.5.2 Determinación de valores de pka utilizando SQUAD.....	57
3.5.3. Bondad del cálculo.....	58
3.5.4. Discusión de valoraciones por espectroscopia de UV-visible ácido-base.....	59
3.6 Valoraciones por espectroscopia de fluorescencia ácido-base.....	62
3.6.1 Longitud de excitación 300, 340, 490, 515, 240 y 410 nm.....	62
3.6.2 Longitud de emisión 540 nm.....	66
3.6.3 Determinación de valores de pka utilizando SQUAD.....	67

3.6.4 Bondad del cálculo.....	69
3.6.5 Contraste de los valores de pKa obtenidos por UV-Visible y fluorescencia.....	71
Capítulo 4. Conclusiones generales.....	72
Conclusión general.....	72
Perspectiva.....	74
Referencias.....	74

## Resumen

En el presente trabajo de maestría se determinaron los valores de pKa de la Eosina-Y, mediante una valoración ácido-base de Brønsted continua seguida por espectroscopia UV-Visible y por fluorescencia, técnica propuesta para resolver la problemática del equilibrio de precipitación de la lactona quien provoca la discrepancia del valor del pKa1. Se utilizó el programa computacional SQUAD para el refinamiento de las constantes.

El cálculo de los valores de pKa se realizó a concentraciones de Eosina-Y que pertenecen al intervalo dinámico lineal, determinado por la curva de calibración a  $\text{pH}=4.0\pm 0.1$ . El intervalo dinámico lineal construido a partir de espectros de absorción a  $\lambda_{\text{max}}=515\text{ nm}$  es  $5.66\times 10^{-6}\text{ M}<[\text{Eosina-Y}]<3.0\times 10^{-5}\text{ M}$  y el perteneciente a partir de espectros de emisión y excitación a  $\lambda_{\text{ex}}=300\text{ nm}, 340\text{ nm}, 490\text{ nm}, 515\text{ nm}, 240\text{ nm}, 410\text{ nm}$  y  $250\text{ nm}$ , y para la única  $\lambda_{\text{em}}=540\text{ nm}$ , es  $5.8\times 10^{-8}\text{ M}<[\text{Eosina-Y}]<1.0\times 10^{-7}\text{ M}$ .

Las concentraciones de propuesta son  $1\times 10^{-5}\text{ M}$  y  $7.5\times 10^{-8}\text{ M}$ . Sin embargo, a concentraciones mayores a  $10^{-5}$  se presentó discrepancia del valor de pKa1 debido a la precipitación por parte de la especie lactona y el zwitterión en la técnica de UV-Vis, de tal modo que se recurrió a disminuir la concentración a  $2.5\times 10^{-6}\text{ M}$ . Lo que implica que los valores de pKa de la Eosina-Y dependen de la concentración. Los valores de pKa se muestran en la tabla siguiente.

Los valores de pKa construidos a partir de los espectros de absorción en el intervalo de longitud de onda de  $210\text{ nm}$  a  $605\text{ nm}$ , son reproducibles y presentan un buen ajuste de los espectros teóricos con los experimentales.

El valor del pKa1 utilizando los espectros de emisión y excitación, a diferentes longitudes de excitación y emisión ronda entre 2.4 y 2.5. Lo cual confirma el valor obtenido por la técnica de UV-Visible y por tanto es más confiable a comparación con los reportados en la literatura.

Se presenta equivalencia entre los valores de pKa obtenidos a partir de  $\lambda_{\text{ex}}=490$  y  $515\text{ nm}$  y excitación a  $\lambda_{\text{em}}=540\text{ nm}$  con los obtenidos con los espectros de absorción, considerando un 95% de nivel de significancia, los cuales presentan un mejor ajuste de los espectros teóricos con los experimentales. Por lo tanto, la espectroscopia de fluorescencia es confiable para el cálculo de los valores de pKa.

Espectro	$\lambda_{ex}/nm$	Equilibrio	$pK_{ai} \pm \sigma^*$	$\sigma_{reg}^{**}$
Emisión Fluorescente	300	$H_2EY \rightleftharpoons HEY^- + H^+$  $HEY^- \rightleftharpoons EY^{2-} + H^+$	$pK_{a1} = 2.496 \pm 0.026$ $pK_{a2} = 4.177 \pm 0.012$	0.0016 ***
	340		$pK_{a1} = 2.263 \pm 0.085$ $pK_{a2} = 4.267 \pm 0.038$	0.0027 ***
	490		$pK_{a1} = 2.541 \pm 0.016$ $pK_{a2} = 3.9386 \pm 0.008$	0.0004 ***
	515		$pK_{a1} = 2.594 \pm 0.050$ $pK_{a2} = 3.777 \pm 0.029$	0.0009 ***
	240		$pK_{a1} = 2.429 \pm 0.021$ $pK_{a2} = 4.1244 \pm 0.01$	0.0003 ***
	410		$pK_{a1} = 2.240 \pm 0.041$ $pK_{a2} = 4.0803 \pm 0.018$	0.001 ***
	250		$pK_{a1} = 2.41 \pm 0.030$ $pK_{a2} = 4.074 \pm 0.014$	0.0005 ***
Excitación Fluorescente	$\lambda_{em} = 540 \text{ nm}$		$pK_{a1} = 2.483 \pm 0.014$ $pK_{a2} = 4.011 \pm 0.081$	
Absorción	$\lambda = 210 \text{ nm a } 605 \text{ nm}$		$pK_{a1} = 2.401 \pm 0.065$ $pK_{a2} = 3.809 \pm 0.084$	

\*  $\sigma$  representa la desviación estándar de cada constante de equilibrio

\*\*  $\sigma_{reg}$  representa la desviación estándar de la regresión

\*\*\* Los espectros de emisión y excitación fueron divididos entre mil para simular una respuesta de absorción, debido la magnitud de respuesta en intensidad de fluorescencia.

# Capítulo 1

## Introducción y objetivos

### 1.1 Introducción

La Eosina amarillenta o Eosina-Y es un colorante que se obtiene de la halogenación con  $\text{Br}_2/\text{AlBr}_3$  a la fluoresceína [1], con coloración marrón- rojizo, soluble en agua y en etanol. Se utiliza como marcador de componentes y orgánulos citoplasmáticos, como antiséptico, desinfectante, colorante en la industria textil y cosmética, y ha mostrado eficacia en el tratamiento contra la dermatitis [2].

La Eosina-Y tiene dos grupos ácidos: un grupo tipo fenol (localizado en el anillo de xanteno) y un ácido carboxílico (localizado en la parte benzoica). En solución acuosa exhibe 3 estructuras diferentes: la molécula neutra  $\text{H}_2\text{EY}$  prácticamente incolora, la monoaniónica  $\text{HEY}^-$  y la forma dianiónica  $\text{EY}^{2-}$  [3,4] (véase figura 1.1.1).

Se reporta que las especies protolíticas de la Eosina-Y presentan varias estructuras tautoméricas: la forma espirocíclica o lactona que precipita lentamente, carece de color e insoluble en agua, y el zwitterión (véase figura 1.1.1). Éstas provienen de  $\text{H}_2\text{EY}$  siendo fracciones de la misma. El contenido de la lactona es despreciable a bajas concentraciones [4].

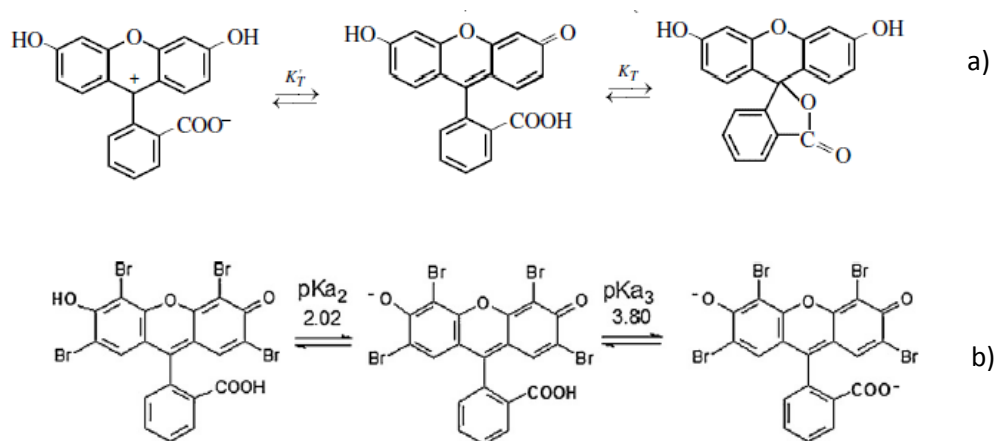


Figura 1.1.1. a) Tautómeros de la fluoresceína eléctricamente neutra, a la izquierda el zwitterión y a la derecha la lactona, aplicables para la Eosina-Y. b) Equilibrios protolíticos ilustrados con las estructuras tautoméricas más representativas de Eosina-Y



La Eosina-Y tiene dos protones ácidos correspondientes a los siguientes equilibrios y valores de pka [5]:



Con dicha información puede construirse el diagrama de distribución de las especies y el diagrama de zonas de predominio [6] (figura 1.1.2).

La primera desprotonación se debe al grupo fenólico ya que los átomos de Br conectados al anillo de xanteno, retiran densidad electrónica del anillo, incrementando la acidez del grupo tipo fenol, haciendo que su  $H^+$  sea más ácido que la de un grupo tipo fenol normal. Esto da lugar a la especie monocargada negativamente ( $HEY^-$ ) que es predominante, de acuerdo con la cantidad de su fracción comparada con el resto de las especies, en el intervalo de  $2.02 < pH < 3.8$  (figura 1.1.2).

La segunda desprotonación es entonces la del grupo carboxílico y su valor de pKa es similar al del ácido acético ( $pKa=4.7$ ) y otros ácidos carboxílicos, haciendo a la especie bicargada negativamente ( $EY^{2-}$ ), predominante a valores de  $pH > 3.8$ , quien es menos afectado a comparación del grupo tipo fenol en la presencia de bromo, ello explica un valor de pKa más alto.

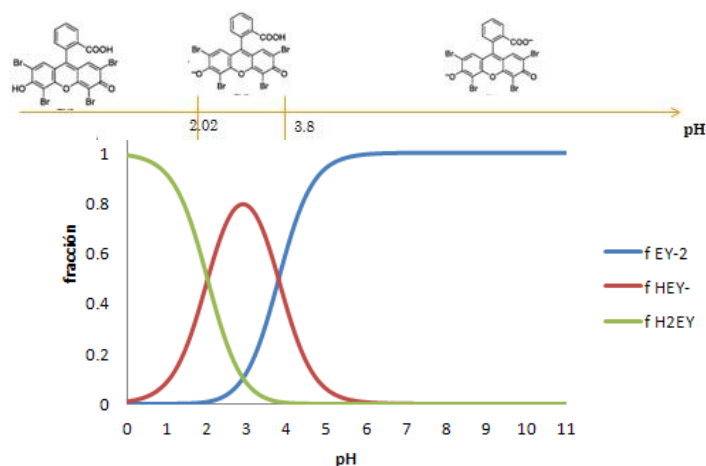


Figura 1.1.2. Diagrama de distribución de las especies de Eosina Y como función del pH. En la parte superior se presenta el diagrama de zonas de predominio (DZP).

## 1.2 Antecedentes

Los valores de pKa de la Eosina-Y no han sido solamente calculados por Batistela (2011) sino también por diversos investigadores, algunos valores de pKa se muestran en la tabla 1.2.1 [7].

Tabla 1.2.1 Valores de pKa de la Eosina-Y

<b>pka1</b>	<b>3.25</b>	<b>3.43*</b>	<b>3.8*</b>	<b>3.6**</b>	<b>6.8***</b>	<b>3.0</b>	<b>4.45</b>	<b>3.6</b>	<b>o</b>	<b>2.85</b>
								<b>5.3</b>		
<b>pka2</b>	3.80					5.0	6.02	6.2		4.5
<b>autor</b>	Pierre L. (1985)	Abdel Halim (1970)	Isaa, I. M. (1972)	I. Oster, G. (1961)	Tribalat, S. (1961)	Birkedal-Hansen (1973)	Shibata, M. (1972)	Neigi, A.S. (1975)		Dubost, J.P. (1978)

\*pKa1=pKa2, \*\* mezcla de agua-dioxano, \*\*\* pKa1+pka2

Se presentan una discrepancia en los valores de pKa de la Eosina-Y de acuerdo a la tabla 1.2.1. La principal causa es debida a la formación del zwitterión y la lactona (figura 1.1.1), quien es insoluble en agua y precipita a concentraciones elevadas. Por ello sólo es detectable un valor de pKa al determinarlo por métodos tradicionales debido a la cercanía de éstos de 1.78 unidades [5].

Batistela (2011) recalcula los valores de pKa a una concentración de  $4.18 \times 10^{-6}$  M para evitar el efecto de precipitación de la lactona. Utilizó un software basado en quimiometría, el cual fue alimentado con espectros de absorción obtenidos en el intervalo de pH de -2 a 15. Los valores de pKa obtenidos, especialmente el valor de pKa1 es poco confiable y por tanto se recalculan dichos valores en un trabajo preliminar.

Por estudios preliminares [8], se obtuvieron los espectros de absorción a concentración  $2.5 \times 10^{-6}$  M con el objetivo de disminuir la precipitación de la lactona, pero trayendo consigo valores de absorbancia bajos (véase figura 1.2.1).

El intervalo de pH para la obtención de los espectros de absorción fue de 1.219 a 4.357, el cual está algo acotado pero bien podría extenderse hasta pH=6.0 o 7.0. Sin embargo, el intervalo de pH se limitó para averiguar si presentaba algún efecto directo sobre los valores de pKa.

De acuerdo a la familia de espectros (figura 1.2.1), el comportamiento de éstos varía conforme el pH va cambiando. Cada espectro cuenta con 4 máximos de absorción (inserto en figura 1.2.1). A pH=1.295 los presenta en  $\lambda=240$  nm, 287 nm, 340nm y 490 nm. Conforme el pH se incrementa, los dos primeros máximos tienen efecto hipocrómico

hasta pH=2.938, y en el intervalo de pH=3.03-3.277, comienzan a crecer y a desplazarse hacia la longitud de onda de 250 nm y 300 nm hasta pH=4.357. El tercer máximo incrementa al aumentar el pH. El cuarto máximo presenta efecto hipercrómico hasta pH=1.586, este se deforma apareciendo un máximo en 520 nm a partir de pH=1.732 que después tienen un efecto hipsocrómico hasta 515 nm e hipercrómico conforme el pH incrementa. En los espectros de absorción, las líneas no pasan por un punto isobéptico.

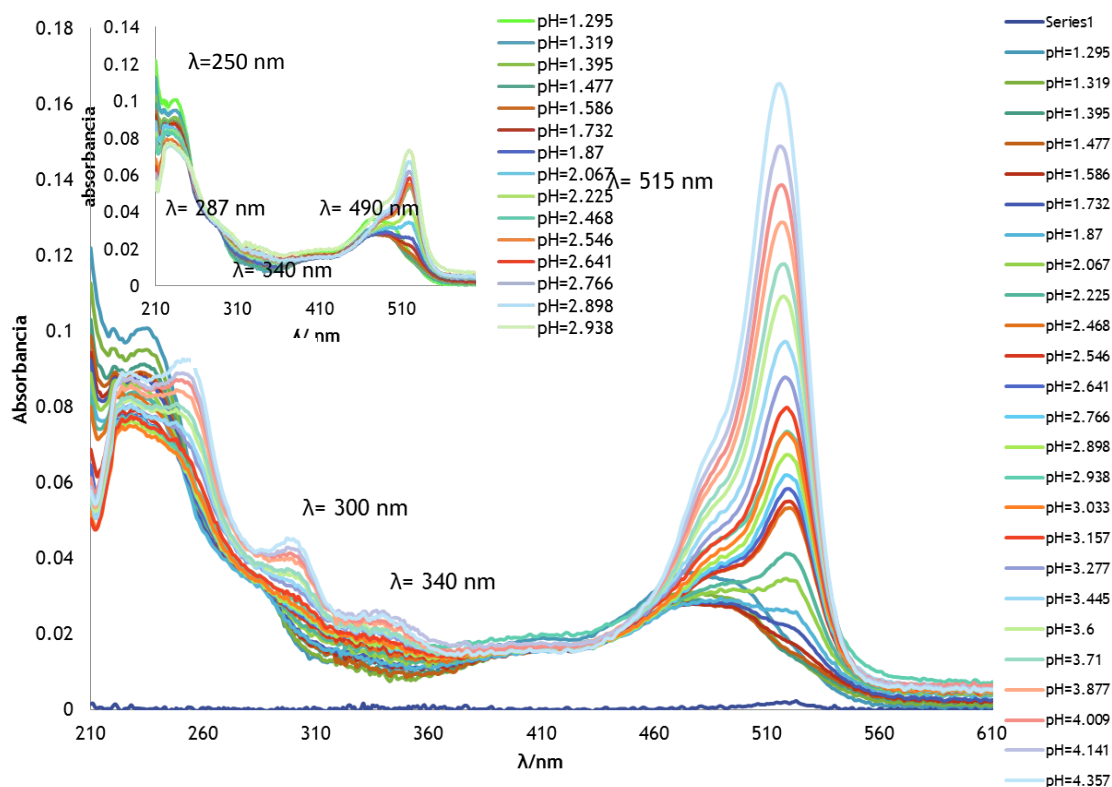


Figura 1.2.1. Espectros de absorción e inserto, a  $[Eosina-Y]=2.5 \times 10^{-6} M$  en el intervalo de intervalo de  $1.219 < pH < 4.357$ .

Para realizar el cálculo de los valores de pKa usando los espectros de absorción, se utilizó el programa computacional SQUAD. El cual refina las constantes de equilibrio a partir de un modelo químico propuesto, empleando la aproximación de mínimos cuadrados no lineales, de datos de absorbancia obtenidos al varía las longitudes de onda y el pH del sistema en solución acuosa [9]. El programa resuelve la ecuación de la Ley de Beer, la cual se establece cuando la concentración es directamente proporcional a la absorbancia y se hace la suposición que la concentración de  $2.5 \times 10^{-6} M$  cumple dicho comportamiento.

En vista de la problemática de la determinación de los valores de pKa por UV-Vis, se propuso otra una técnica alternativa aprovechando la estructura de la Eosina-Y que permite trabajar con concentraciones menores para evitar la precipitación de la lactona: la

fluorescencia. Dicha molécula posee estructura multicíclica, es rígida, plana y contiene grupos dadores de electrones como -OH. El par electrónico libre originado por la desprotonación del grupo tipo fenol, es el responsable del alto rendimiento en fluorescencia [10], por ende puede sondearse la emisión de luz emitida.

El programa computacional SQUAD supone una relación directamente proporcional de la concentración contra la respuesta, por ello se alimenta con espectros de absorción. Sin embargo, la propiedad de fluorescencia también cumple la misma relación a concentraciones muy diluidas, de acuerdo a la siguiente ecuación [11].

$$\text{la cantidad de luz absorbida es: } I_0 - I = I_0(1 - e^{-abc})$$

$$I_f = k \phi_f (I_0 - I)$$

$$1 - e^{-abc} = 2.3abc - \frac{(2.3abc)^2}{2!} + \frac{(2.3abc)^3}{3!} - \dots$$

$$I_f = k \phi_f I_0(2.3abc) \quad (1.2.1)$$

Dónde:  $I_0$ = intensidad incidente,  $I$ =intensidad transmitida,  $a$ = absortividad,  $b$ = longitud de paso óptico,  $c$ = concentración de la especie absorbente,  $I_f$ = intensidad de radiación fluorescente medida,  $K$ = cte de proporcionalidad dependiente de la eficacia del detector y geometría,  $\phi_f$ = rendimiento cuántico (cuantos emitidos y absorbidos en tiempo.)

A concentraciones muy diluidas la serie de términos de la expresión encerrada en paréntesis es despreciable, pero a concentraciones superiores dichos términos empiezan ser importantes y aparecen desviaciones. De modo que para utilizar SQUAD con datos de espectroscopia de fluorescencia, la concentración al igual que la Ley de Beer tiene que cumplir la ecuación 1.2.1.

Ofreciendo la técnica de fluorescencia como una opción alternativa para el cálculo de los valores de pKa, se obtienen en el mismo intervalo de pH los espectros de emisión (figura 1.2.2) a una longitud de excitación  $\lambda_{ex}$ = 250 nm y los espectros de excitación (figura 1.2.3) a longitud de emisión  $\lambda_{em}$ = 540 nm.

De acuerdo a las figura 1.2.2 y 1.2.3, la intensidad de fluorescencia (IF) aumenta conforme el pH se incrementa, comportamiento similar a los espectros de absorción, debido a la presencia de las especies  $HEY^-$  y  $EY^{2-}$  que por mucho la más fluorescente. Es posible que el par electrónico libre de la parte benzoica (donadora de electrones) contribuya a la resonancia del anillo de xanteno (grupo aceptor de electrones) [12] incrementando la intensidad de fluorescencia. Al normalizar al menos 3 espectros de pH diferente, resultan

tener el mismo perfil del espectro de emisión de  $EY^{2-}$  lo que demuestra que es la especie que fluoresce más [13].

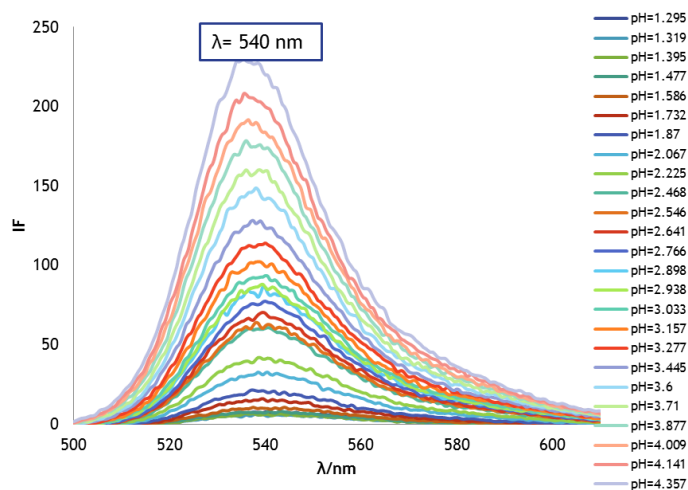


Figura 1.2.2. Espectros de emisión de  $[Eosina-Y]=2.5 \times 10^{-6} M$ , obtenidos a  $\lambda_{ex} = 250 nm$ , en el intervalo de  $1.219 < pH < 4.357$ . El máximo de IF se encuentra en 540 nm.

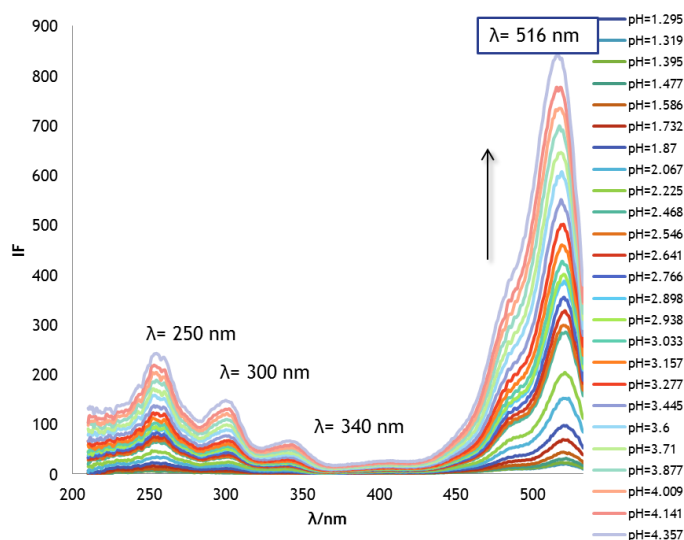


Figura 1.2.3. Espectros de excitación de  $[Eosina-Y]=2.5 \times 10^{-6} M$ , obtenidos a  $\lambda_{em} = 540 nm$ , en el intervalo de  $1.219 < pH < 4.357$ . El principal máximo de IF se encuentra en 516 nm.

Los espectros de absorción y excitación deberían tener exactamente el mismo perfil, cuando en el sistema esté presente una sola especie [13]. Sin embargo, en este caso, se

tiene una mezcla de las especies protonadas y la desprotonadas a lo largo de todo el intervalo de pH de trabajo (1.295-4.357), a pesar de que predominen en el intervalo de pH que le corresponde (figura 1.1.2). En la figura 1.2.4 se muestran algunos espectros de absorción y excitación normalizados para realizar la comparación.

Los máximos característicos en los espectros excitación están posicionados en las longitudes de onda de 250 nm, 300 nm, 340 nm y 516 nm a pesar del diferente valor de pH, no así los espectros de absorción. Éstos tiene sus máximos idénticos a los espectros excitación a partir de  $\text{pH} \geq 3.877$ , por ejemplo a  $\text{pH}=4.357$ , pero por debajo de este valor, se encuentran en otra longitud de onda como se describió anteriormente, lo que podría indicar que para medir los espectros de excitación se está utilizando una longitud de emisión ( $\lambda_{\text{em}}=540 \text{ nm}$ ) que corresponde a la especie  $\text{EY}^{2-}$ .

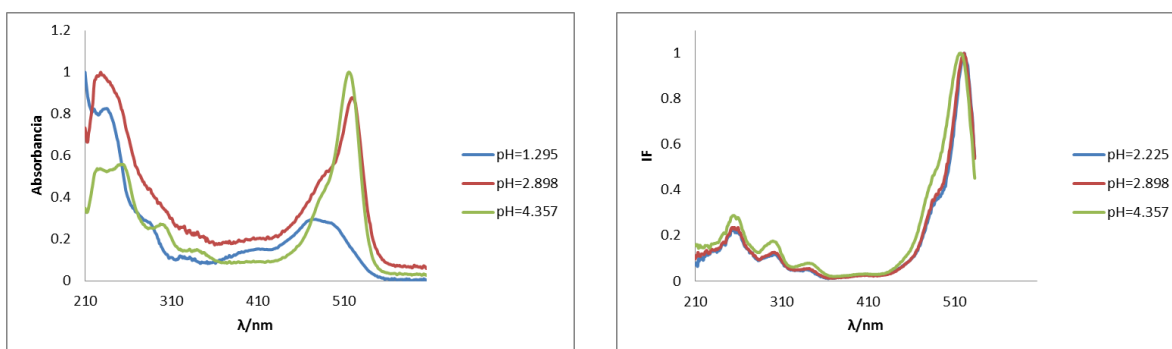


Figura 1.2.4. Espectros normalizados de: a) Absorción, b) Excitación. A concentración de  $[\text{Eosina-Y}] = 2.5 \times 10^{-6} \text{ M}$  a diferentes valores de pH

Con la información de la familia de espectros absorción se utilizaba el programa computacional SQUAD para el refinamiento de las constantes de equilibrio. De igual manera se utilizan los espectros de emisión y excitación fluorescente, pero para utilizarlos en SQUAD se necesita dividir cada espectros entre mil para simular una respuesta de absorción. Se hace la suposición que la concentración de  $2.5 \times 10^{-6} \text{ M}$  sigue la ecuación 1.2.1, para aprobarlo o desmentirlo es necesario realizar una curva de calibración.

Los valores de  $\text{pK}_a$  de la Eosina-Y por espectroscopia UV-Vis y de fluorescencia se muestran en la tabla 1.2.2.

Tabla 1.2.2 Valores de  $\text{pK}_a$  obtenidos con SQUAD

Espectros de	Equilibrio	$\text{pK}_{\text{ai}} \pm \sigma^*$	$\sigma_{\text{reg}}^{**}$
Absorción	$\text{H}_2\text{EY} \rightleftharpoons \text{HEY}^- + \text{H}^+$	$\text{pK}_{\text{a1}} = 2.104 \pm 0.029$	0.0015
	$\text{HEY}^- \rightleftharpoons \text{EY}^{2-} + \text{H}^+$	$\text{pK}_{\text{a2}} = 3.816 \pm 0.013$	

<b>Excitación a</b> $\lambda_{em} = 540nm$	$H_2EY \rightleftharpoons HEY^- + H^+$	$pK_{a1} = 2.420 \pm 0.016$	0.0034***
	$HEY^- \rightleftharpoons EY^{2-} + H^+$	$pK_{a2} = 3.974 \pm 0.009$	
<b>Emisión a</b> $\lambda_{ex} = 250nm$	$H_2EY \rightleftharpoons HEY^- + H^+$	$pK_{a1} = 2.203 \pm 0.042$	0.0025***
	$HEY^- \rightleftharpoons EY^{2-} + H^+$	$pK_{a2} = 3.717 \pm 0.019$	

\*  $\sigma$  representa la desviación estándar de cada constante de equilibrio

\*\*  $\sigma_{reg}$  representa la desviación estándar de la regresión

\*\*\* Valor dividido entre mil para compararlo con el de los espectros de absorción

Una vez obtenidos los valores de pKa utilizando espectros de absorción, emisión y excitación se contrastan con los valores reportados por Bastistela (2011), mediante la construcción del intervalo de confianza al 95% de nivel de significancia (NS) como se muestra en la tabla 1.2.3.

Como se puede apreciar en la tabla 1.2.3, los valores obtenidos por medio de los espectros de absorción y emisión son comparables con los reportados por Bastistela (2011). Lo que parece indicar que la técnica de fluorescencia es apta para el cálculo de los valores de pKa. Sin embargo, no son comparables entre ellos mismos.

En el caso de los valores obtenidos a través de los espectros de excitación no son comparables con los reportados por Bastistela. Los resultados anteriores, parecen indicar que hay algún tipo de error mayor para el caso de los espectros de excitación con respecto a los de absorción. Es posible que la concentración no obedezca la ecuación 1.2.1.

Tabla 1.2.3. Comparación de los intervalos de confianza (al 95% de NS) de los valores de pKa obtenidos al ajustar diferentes conjuntos de espectros.

Espectros de	Intervalo de confianza para pKa1	Intervalo de confianza para pKa2
<b>Absorción</b>	$2.045 \leq pKa1 \leq 2.163$	$3.790 \leq pKa2 \leq 3.842$
<b>Emisión</b> $\lambda_{ex} = 250nm$	$2.119 \leq pKa1 \leq 2.287$	$3.679 \leq pKa2 \leq 3.755$
<b>Excitación</b> $\lambda_{em} = 540nm$	$2.388 \leq pKa1 \leq 2.452$	$3.956 \leq pKa2 \leq 3.992$

La alternativa de utilizar la técnica de fluorescencia tiene la ventaja de trabajar con concentraciones bajas para reducir el proceso de precipitación de lactona a comparación de UV-vis ya que al disminuir la concentración se obtienen respuestas bajas de absorbancia. Sin embargo, por los resultados obtenidos por el uso de los diferentes espectros, se buscarán las condiciones para obtener una mayor comparación de los

valores pKa con el uso de los 3 tipos de espectros e identificar los fenómenos que no permitan que sean comparables

### **Hipótesis**

Dentro del intervalo dinámico lineal de concentración, los valores de pKa obtenidos por los espectros de emisión y excitación fluorescente deben ser estadísticamente iguales con los obtenidos con los espectros de absorción.

### **1.3 Objetivo general**

Determinar las condiciones para las cuales los valores de las constantes de acidez (pKa) de la Eosina-Y calculadas a partir de espectroscopia de UV-visible y de fluorescencia son estadísticamente iguales, y estudiar las diferencias, ventajas y desventajas de uno de otro.

### **1.4 Objetivos particulares**

- Determinar el intervalo de linealidad de concentración de la Eosina-Y para espectroscopia de UV-visible y de fluorescencia.
- Determinar el intervalo de linealidad de concentración de la Eosina-Y por espectroscopia de fluorescencia a diferentes longitudes de onda de excitación y emisión.
- Determinar los valores de las constantes de acidez (pKa) de la Eosina Y, utilizando diferentes longitudes de onda (de excitación o emisión, según sea el caso).
- Determinar los valores de las constantes de acidez (pKa) de la Eosina Y, utilizando el programa computacional SQUAD.
- Realizar un contraste entre los valores de pKa calculados a partir de espectros de absorción, emisión y excitación.



## Capítulo 2

### Procedimientos experimentales

#### 2.1 Pruebas de estabilidad para las especies de Eosina-Y

Se realizó la prueba de estabilidad para cada una de las tres especies de Eosina-Y para determinar el tiempo donde se mantiene la integridad de la molécula con el que se puede realizar la determinación de los valores de pka.

A continuación se describe el procedimiento que se llevó a cabo:

1. Se realiza la calibración del espectrofotómetro marca Perkin Elmer, modelo lambda 950, utilizando agua desionizada como blanco, en el intervalo de 210 nm a 605 nm.
2. Se prepararon tres soluciones de concentración de Eosina-Y de  $5 \times 10^{-6}$  M con diferente pH en un volumen de 25 mL, adicionando cantidades adecuadas de HCl 1 M para obtener pH=1.5, 2.5 y 4.6. Se mide el pH inicial para cada una de las tres soluciones y el espectro de absorción UV-vis.

Para cada solución se monitoreo el valor del pH y el espectro de absorción para ver si hay un cambio en estos dos parámetros, con el fin de encontrar el tiempo en que se mantiene la integridad de la molécula.

#### 2.2 Determinación de curva de calibración (CC) por espectroscopia UV-visible

##### 2.2.1 Preparación de soluciones

###### *Solución Stock de Eosina-Y*

Se pesan aproximadamente 0.1729 g de Eosina-Y, se disuelven en un matraz aforado de 25 mL con agua desionizada para una concentración 0.01 M.

###### *Solución madre 1 (SM1)*

De la solución stock se toma 1 mL con una micropipeta de capacidad 100-1000  $\mu$ L y se transfiere a una matraz aforado de 10 mL, llevando al aforo con agua desionizada dando una concentración de  $1 \times 10^{-3}$  M.

###### *Solución madre 2 (SM2)*

De la SM1 se toman 1000  $\mu$ L con una micropipeta de capacidad 100-1000  $\mu$ L y se transfiere a una matraz aforado de 10 mL, llevando al aforo con agua desionizada dando una concentración de  $1 \times 10^{-4}$  M.

A continuación se muestra la preparación del intervalo de concentraciones de Eosina-Y a  $\text{pH} \approx 4.0$ , aforando con agua destilada y desionizada, a partir de SM1 y SM2:

Tabla 2.2.1.1 Preparación de las soluciones de Eosina-Y para la CC por UV-Vis

Solución	1	2	3	4	5	6	7	8	9
$V_{SM1} / \mu\text{L}$	300	100	0	0	0	0	0	0	0
$V_{SM2} / \mu\text{L}$	0	0	750	500	300	100	75	50	30
$V_{\text{aforo}} / \text{mL}$	10	10	10	10	10	10	10	10	10
$V_{\text{HCl}} / \mu\text{L}$ (0.01 M)	150	150	150	150	150	150	150	150	150
[Eosina-Y] / M $10^{-6}$	30.0	10.0	7.50	5.00	3.00	1.00	7.50	0.5	0.3

## 2.2.2 Procedimiento experimental

1. Se repite paso 1 de la sección 2.1.
2. Se usa el potenciómetro pH sensION PH 31 equipado con un electrodo combinado con electrodo  $\text{Ag}^+|\text{AgCl}$  [KCl, 3 mol/L] como referencia para medir el pH de las soluciones de la tabla 2.2.1.1 empezando con la concentración más baja de Eosina-Y, manteniendo la agitación constante y se mide el pH inicial una vez que se ha mantenido estable.
3. Se mide el espectro de absorción al menos tres veces para cada solución de la tabla 2.2.1.1, usando una celda de cuarzo de paso óptico 1 cm, en el intervalo de 210 nm a 605 nm.
4. Se lava la celda de cuarzo con agua desionizada y se repite para cada solución los pasos 1-3.

## 2.3 Determinación de curva de calibración (CC) por espectroscopia de fluorescencia

### 2.3.1 Preparación de soluciones

#### *Solución madre 3 (SM3)*

De la solución SM1 se toman 50  $\mu\text{L}$  con una micropipeta de capacidad 10-100  $\mu\text{L}$  y se transfiere a una matraz aforado de 10 mL, llevando al aforo con agua desionizada dando una concentración de  $5 \times 10^{-6}$  M.

Se preparó el siguiente intervalo de concentraciones de Eosina-Y a pH≈4.0 aforando con agua destilada y desionizada, a partir de una solución madre 3 (SM3):

Tabla 2.3.1.1 Preparación de las soluciones de Eosina-Y para la CC por fluorescencia

Solución	1	2	3	4	5	6	7	8	9
V <sub>SM3</sub> /μL	2000	1500	1000	600	200	150	100	60	20
V <sub>aforo</sub> / mL	10	10	10	10	10	10	10	10	10
V <sub>HCl</sub> /μL (0.01 M)	100	100	100	100	100	100	100	100	100
[Eosina-Y]/M 10 <sup>-7</sup>	10	7.50	5.00	3.00	1.00	7.50	0.5	0.3	0.1

### 2.3.2 Procedimiento experimental

1. Se calibra el espectrofotómetro de luminiscencia marca Perkin Elmer, modelo LS55, utilizando agua desionizada como blanco, celdas de cuarzo de longitud de paso óptico igual a 1 cm y seleccionando una longitud de excitación ( $\lambda_{EX}$ ), siendo fija mientras la longitud de emisión ( $\lambda_{EM}$ ) varía, condiciones dadas en la tabla 2.3.2.1.

Tabla 2.3.2.1 Condiciones experimentales para la obtención de los espectros de emisión y excitación fluorescente

$\lambda_{EX}$ /nm	$\lambda_{EM}$ /nm	Slit Excitación	Slit Emisión	Filtro/nm	Corrección del equipo.
300	500-620	5.0	20.0	350	No
340	500-620	5.0	20.0	350	No
490	500-620	5.0	7.5	515	No
515	530-620	5.0	5.5	515	No
240	500-620	5.0	14.0	290	No
410	500-620	5.0	20.0	430	No
250	500-620	5.0	15.0	290	No
210-525	540	5.0	10.0	390	No

2. Se repiten los pasos 2-4 de la sección 2.2.2 para la obtención de los espectros de emisión. Las soluciones a utilizar se encuentran en la tabla 2.3.1.1.
3. El caso donde únicamente  $\lambda_{Em}$  se mantiene fija mientras varía  $\lambda_{EX}$ , se repiten los pasos 1-3.

## 2.4 Valoraciones por espectroscopia de UV-visible ácido-base

### 2.4.1 Preparación de soluciones

#### *Solución de HCl 0.1 M*

Se toman 2.5 mL de HCl 1 M con una pipeta de 5 mL, se vierte en una matraz de 25 mL y se lleva al aforo con agua desionizada.

#### *Solución de NaOH 0.2 M*

Se toman 5 mL de NaOH 1 M con una pipeta de 5 mL, se vierte en una matraz de 25 mL y se lleva al aforo con agua desionizada.

#### *Solución de Eosina-Y de concentración X M.*

A partir de la solución stock, se toma un volumen adecuado para preparar una concentración dentro del intervalo dinámico lineal que arrojará la CC por espectroscopia UV-visible.

### 2.4.2 Procedimiento experimental

1. Se repite el paso 1 de la sección 2.1.
2. Se monta un sistema conectado a la celda termostatada con el baño, se agrega a la celda una mezcla compuesta de 10 mL de HCl 0.1M y 10 mL de Eosina-Y X M utilizando una pipeta volumétrica de 10 mL.
3. Se repite el paso 2-3 de la sección 2.2.2. Se registra el aumento del pH para cada adición de NaOH 0.2 M, así como también la obtención del espectro de absorción. Se repite el mismo procedimiento hasta el pH de 4.5.
4. Se corrigen los valores de pH de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$pH_{\text{corregido}} = pH_{\text{experimental}} + ef * \left( \frac{pH_{\text{experimental}} - pH_{\text{calibracion}}}{pH_{\text{calibracion}}} \right) \quad (2.4.2.1)$$

Donde ef= eficiencia electromotriz del electrodo de vidrio.

## 2.5 Valoraciones por espectroscopia de fluorescencia acido-base

### 2.5.1 Preparación de soluciones

*Solución de Eosina-Y de concentración Z M.*

A partir de la SM3, se toma un volumen adecuado para preparar una concentración dentro del intervalo dinámico lineal que arrojará la curva de calibración por espectroscopia de fluorescencia.

### 2.5.2 Procedimiento experimental

1. Se repite el paso 1 de la sección 2.3.2, bajo las condiciones de la tabla 2.5.2.1

Tabla 2.3.2.1 Condiciones experimentales para la obtención de los espectros de emisión y excitación fluorescente

$\lambda_{Ex}$ /nm	$\lambda_{Em}$ /nm	Slit Excitación	Slit Emisión	Filtro/nm	Corrección del equipo.
300	500-580	5.0	15.0	350	Si
340	500-580	5.0	20.0	350	Si
490	500-620	5.0	20.0	515	No
515	530-620	5.0	15.0	515	No
240	500-620	5.0	20.0	290	No
410	500-620	5.0	20.0	430	No
250	500-620	5.0	20.0	290	No
210-525	540	5.0	15.0	390	No

2. Se repiten los pasos 2-4 de la sección 2.4.2
3. Para la  $\lambda_{Em}$  fija, se obtienen los espectros de excitación fluorescente de acuerdo al procedimiento de los pasos 1-3.

## Capítulo 3

### Resultados y discusión

#### 3.1 Pruebas de estabilidad para las especies de Eosina-Y

##### 3.1.1 Prueba de estabilidad para H<sub>2</sub>EY

Se realizó la prueba de estabilidad para la especie neutra H<sub>2</sub>EY a pH=1.5±0.1 (76% de la especie presente en el sistema de acuerdo a Batistela) para determinar el tiempo con el que se puede trabajar con ésta al realizar la determinación de los valores de pka.

En la figura 3.1.1.1 se muestran los espectros de absorción medidos a diferentes tiempos después de su preparación. Puede observarse que a  $\lambda=490$  nm se presentan ligeros cambios en la absorbancia lo que puede ser atribuido a una posible degradación, a que el valor del pH no está amortiguado o a la precipitación de la lactona. Se presentan cambios más notorios en la banda localizada a 240 nm.

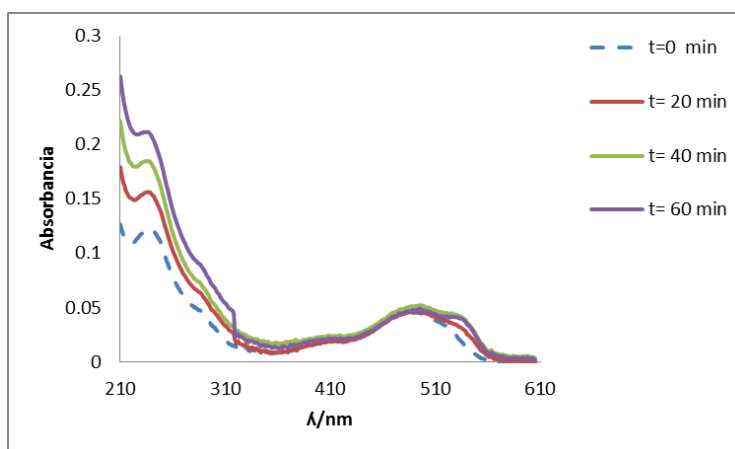


Figura 3.1.1.1. Espectros de absorción de la especie H<sub>2</sub>EY, [Eosina-Y]=5x10<sup>-6</sup> M a pH≈1.5

Un mejor análisis lo presenta la figura 3.1.1.2, en la cual se muestra el comportamiento de la absorbancia y el pH contra el tiempo a  $\lambda=490$  nm. El cambio de la absorbancia durante el tiempo de 60 minutos es de 5.46% excede en menor cantidad del 5% en absorbancia y para el pH de 0.8% debajo del 1% [14].

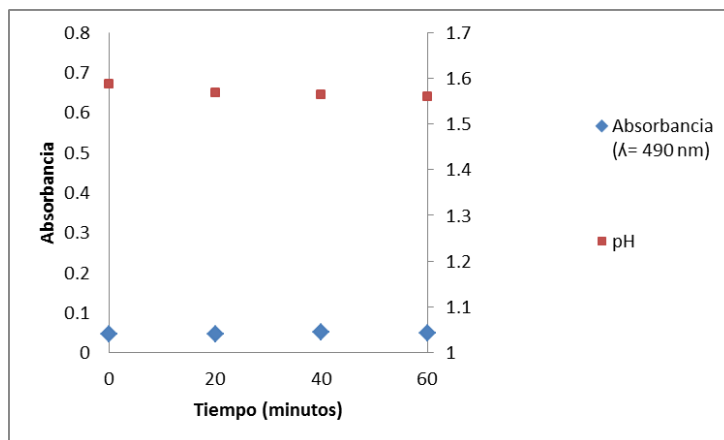


Figura 3.1.1.2. Absorbancia contra tiempo, pH contra tiempo de la especie  $H_2EY$ , [Eosina-Y] $=5 \times 10^{-6}$  M  $\lambda=490$  nm

En la figura 3.1.1.3 se observa el comportamiento de la absorbancia y el pH contra el tiempo a  $\lambda=240$  nm. El valor del pH no excede el 1% de error permitido pero la absorbancia excede el 5% de error permitido, las fluctuaciones son del 24.10% el cual es de esperarse al visualizar la figura 3.1.1.1. Esto se puede atribuir a una posible descomposición de la especie o al equilibrio de tautomerización de la lactona y el zwitterión (figura 1.1.1), causando la precipitación de la especie neutra y quizás como evidencia de las fluctuaciones de la determinación del  $pK_{a1}$ .

La solución en el tiempo transcurrido de 1 h no presentó a simple vista algún precipitado, pero a partir de un día y en adelante (7 días) ya lo contenía. De acuerdo a la figura 3.1.1.4 y su inserto, la señal en la longitud de onda de 490 nm decae en el transcurso de los días, cometiendo un error mayor al 5% permitido en absorbancia, caso similar a la longitud de onda de 240 nm la cual desaparece. El valor del pH excede en 0.35% del 1% permitido.

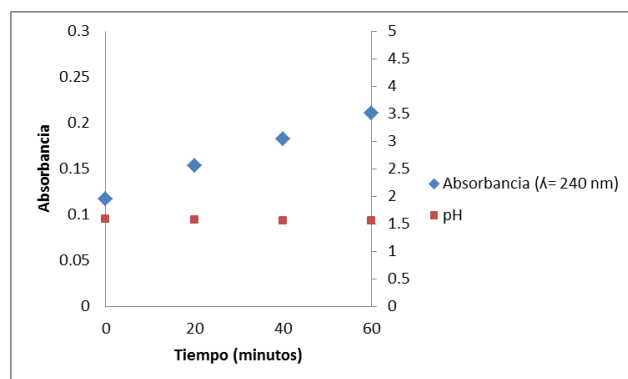


Figura 3.1.1.3. Absorbancia contra tiempo, pH contra tiempo de la especie  $H_2EY$  [Eosina-Y] $=5 \times 10^{-6}$  M  $\lambda=240$  nm

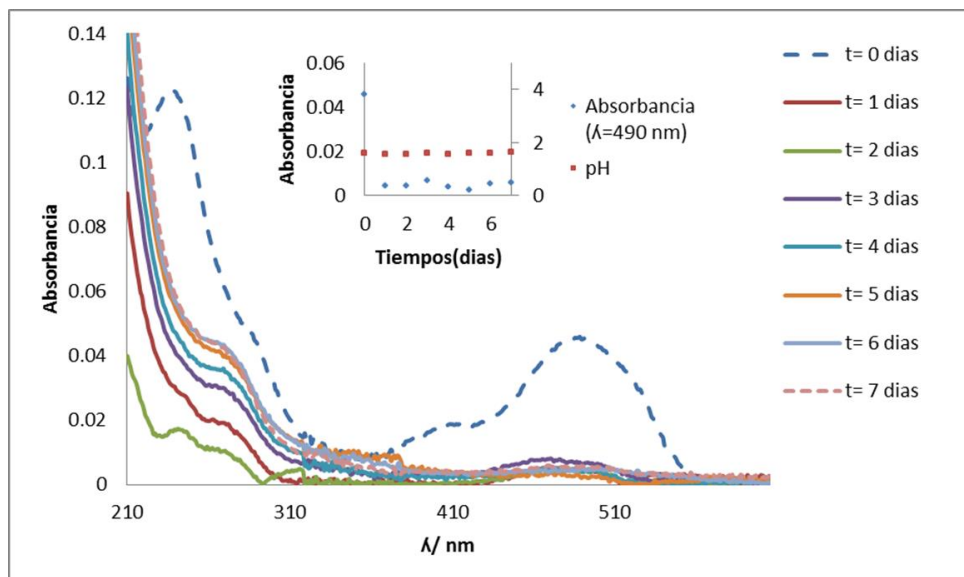


Figura 3.1.1.4. Espectros de absorción de la especie  $H_2EY$  e inserto de absorbancia contra tiempo y pH contra tiempo, en días.  $[Eosina-Y]=5 \times 10^{-6} M$  a  $pH \approx 1.5$

La especie  $H_2EY$  dentro del tiempo de 1 h o menos, es estable. La longitud de onda de 240 nm es más afectada posiblemente por la degradación de  $H_2EY$ , el equilibrio de tautomerización del zwitterión y la lactona que precipita en el sistema. En su momento llega al equilibrio pero no es conveniente tenerla en el sistema debido que provoca dispersión de la luz dentro del espectrofómeto afectando a la respuesta de absorbancia. De modo que se sugiere minimizar el tiempo en el que está presente la especie  $H_2EY$  en el sistema para el cálculo de los valores de pka, así como realizar las mediciones lo más rápido posible, acortar el intervalo de longitud de onda en el cual se obtiene los espectros de absorción de 370nm a 605 nm o disminuir la concentración.

### 3.1.2 Prueba de estabilidad para $HEY^-$

Se realizó la prueba de estabilidad para el monoanión  $HEY^-$  a  $pH=2.5 \pm 0.1$  (72% de la especie presente en el sistema de acuerdo a Batistela) para determinar el tiempo con el que se puede trabajar con éste al realizar la determinación de los valores de pka.

En la figura 3.1.2.1 se muestran los espectros de absorción medidos a diferentes tiempos después de su preparación. Puede observarse que a  $\lambda=520$  nm se presentan ligeros cambios en la absorbancia, por causas posiblemente iguales que para  $H_2EY$ . Si esos cambios son debidos a que el pH no está amortiguado, bien se podría amortiguar y estudiar si tiene o no efectos sobre la Eosina-Y. La solución buffer tiene que ser adecuada para que no interfiera en la respuesta de absorbancia.



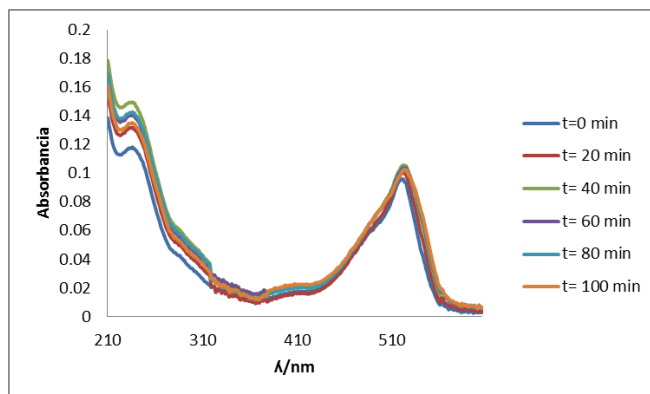


Figura 3.1.2.1 Espectros de absorción de la especie HEY,  $[Eosina-Y]=5 \times 10^{-6} M$  a  $pH \approx 2.5$ .

Un mejor análisis lo presenta la figura 3.1.2.2, en la cual se muestra el comportamiento de la absorbancia y el pH contra el tiempo a  $\lambda=520 \text{ nm}$ . El comportamiento de la absorbancia se mantiene estable con un error de 2.95% del 5% del error permitido, al igual que el pH con error de 0.28% del 1% permitido.

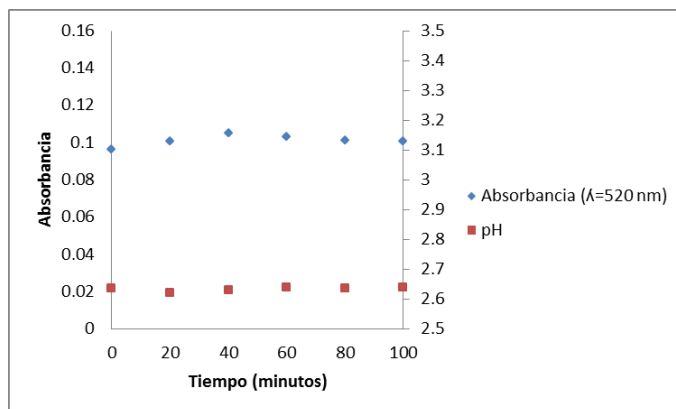


Figura 3.1.2.2. Absorbancia contra tiempo, pH contra tiempo de la especie HEY,  $[Eosina-Y]=5 \times 10^{-6} M$   $\lambda=520 \text{ nm}$

En la figura 3.1.2.3 se observa comportamiento de la absorbancia y el pH contra el tiempo a  $\lambda=240 \text{ nm}$ . El valor del pH no excede el 1% de error permitido con variaciones de 0.28%, pero la absorbancia excede el 5% de error permitido con fluctuaciones del 7.40%. Al valor de pH de trabajo, la abundancia relativa del monoanión es del 72% mezclado con un 24% de  $H_2EY$  que sigue con su equilibrio de tautomerización de la lactona y el zwitterión, provocando las fluctuaciones en la absorbancia.

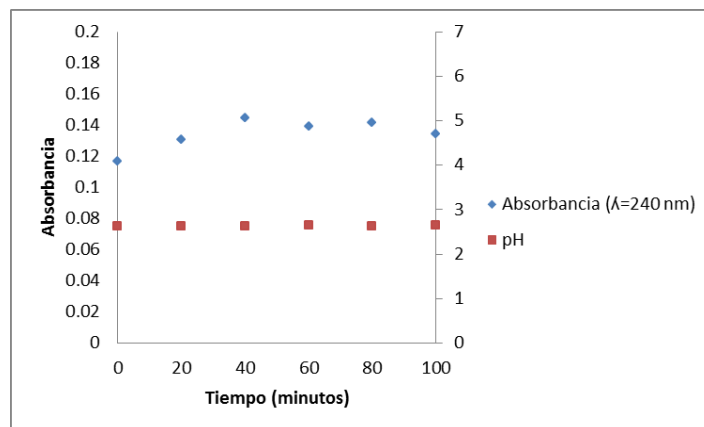


Figura 3.1.2.3. Absorbancia contra tiempo, pH contra tiempo de la especie  $HEY^-$ ,  $[Eosina-Y]=5 \times 10^{-6} M$   $\lambda=240 nm$

La especie  $HEY^-$  dentro del tiempo de 1.4 hora, es estable. La longitud de onda de 240 nm, sigue siendo afectada por el equilibrio de tautomerización. Lo que sugiere acotar el intervalo de 370-605 nm.

### 3.1.3 Prueba de estabilidad para $EY^{2-}$

Se realizó la prueba de estabilidad para la especie dianiónica  $EY^{2-}$  a  $pH=4.6 \pm 0.1$  (86% de la especie presente en el sistema de acuerdo a Batistela) para determinar el tiempo con el que se puede trabajar con ésta al realizar la determinación de los valores de  $pK_a$ .

En la figura 3.1.3.1 se muestran los espectros de absorción medidos a diferentes tiempos después de su preparación. Puede observarse que a  $\lambda=515 nm$  se presentan ligeros cambios en la absorbancia debido que el valor del pH de trabajo (alejado en 0.8 unidades del  $pK_{a2}$ ) no está amortiguado. Sin embargo, el grupo cromóforo (anillo de xanteno) no cambia a pesar del pH de trabajo.

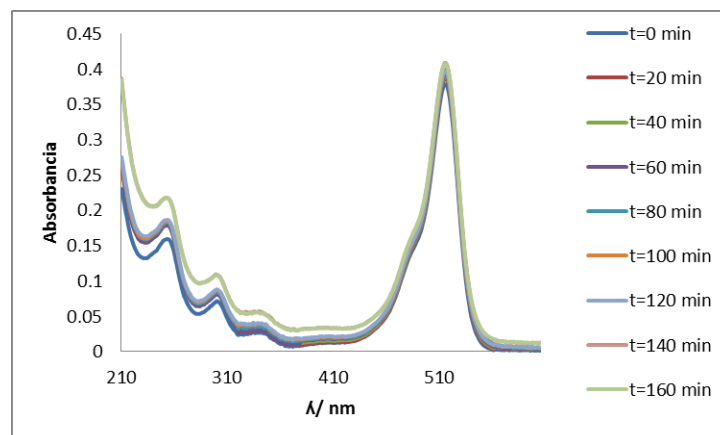


Figura 3.1.3.1 Espectros de absorción de la especie  $EY^{2-}$ ,  $[Eosina-Y]=5 \times 10^{-6} M$  a  $pH \approx 4.6$ .

Un mejor análisis lo presenta la figura 3.1.3.2, en la cual se muestra el comportamiento de la absorbancia y el pH contra el tiempo a  $\lambda=515$  nm. El comportamiento de la absorbancia se mantiene estable con un error de 1.85% del 5% del error permitido, al igual que el pH con error de 0.70% del 1% permitido. El incremento del error del pH de trabajo comparado con  $H_2EY$  y  $HEY^-$ , se debe a la lejanía que tiene con el  $pK_{a2}$  dificultando una medida estable de pH por parte del par  $HEY^-/EY^{2-}$ .

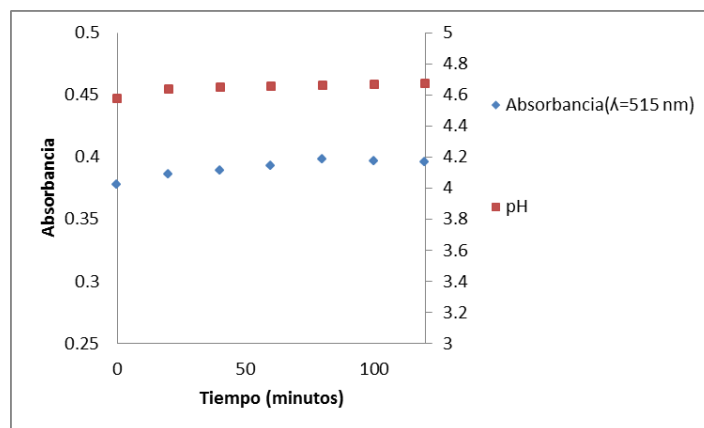


Figura 3.1.3.2. Absorbancia contra tiempo, pH contra tiempo de la especie  $EY^{2-}$ ,  $[Eosina-Y]=5 \times 10^{-6} M$   $\lambda=515$  nm

En la figura 3.1.3.3 se observa el comportamiento de la absorbancia y el pH contra el tiempo (días) a la misma  $\lambda=515$  nm. El error cometido en la absorbancia está debajo del 5% del error permitido, no así el valor del pH. Lo cual muestra que el grupo cromóforo no cambió a pesar del incremento del pH, mostrando gran estabilidad y la dificultad de tener un pH estable mientras se esté más alejado del valor de  $pK_{a2}$ .

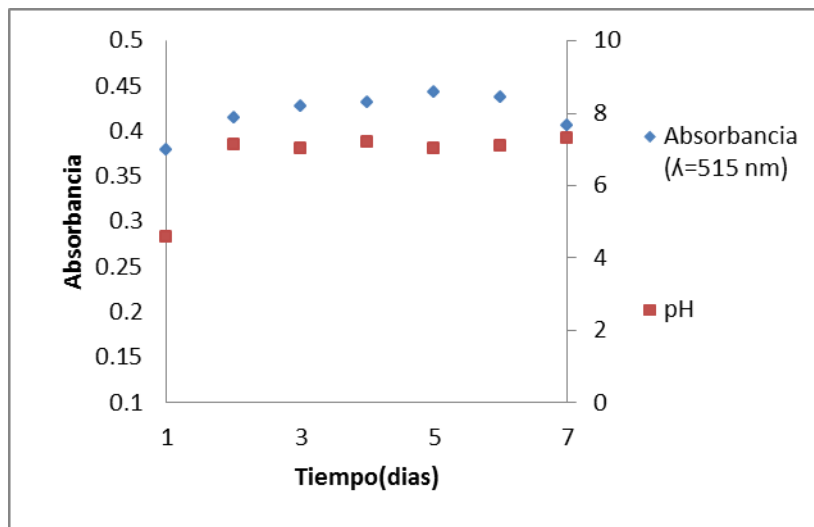


Figura 3.1.3.3. Absorbancia contra tiempo, pH contra tiempo de la especie  $EY^{2-}$ ,  $[Eosina-Y]=5 \times 10^{-6} M$   $\lambda=515 nm$

En la figura 3.1.3.4 se observa el comportamiento de la absorbancia y el pH contra el tiempo a  $\lambda=250 nm$ , el cual viene del efecto batocrómico de  $\lambda=240 nm$  cuando la forma dianiónica predomina en el sistema. El valor del pH no excede el 1% con variaciones del 0.72% y la absorbancia tiene fluctuaciones del 5.01% dentro de un tiempo de dos horas, en 20 minutos más las fluctuaciones de la absorbancia son de 8.79%.

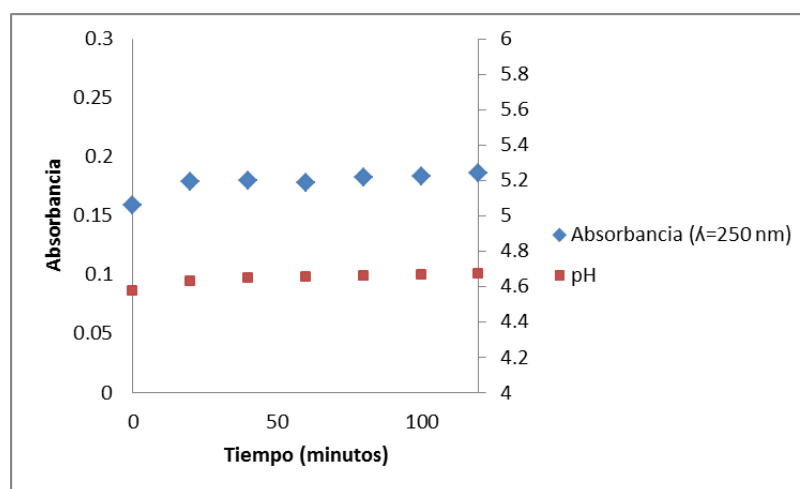


Figura 3.1.3.4. Absorbancia contra tiempo, pH contra tiempo de la especie  $EY^{2-}$ ,  $[Eosina-Y]=5 \times 10^{-6} M$   $\lambda=250 nm$

La especie  $EY^{2-}$  dentro del tiempo de 2 h, es estable. Incluso hasta siete días. Considerando las anteriores pruebas de estabilidad, el cálculo de los valores de  $pK_a$  se obtendrá en una hora o menos para cada una de las 3 zonas donde predomina cada una de las especies de

Eosina-Y y en un intervalo tentativo de 370 nm a 605 nm, en el que se omiten las bandas del ultravioleta cercano que son principalmente más afectadas por la posible descomposición o los equilibrios de tautomerización.

### 3.2 Determinación de curva de calibración por espectroscopia UV-visible

La construcción de la curva de calibración (CC) se realiza al graficar la absorbancia de cada una de las soluciones de la sección 2.2.2 contra la concentración a una longitud de onda óptima. Dicha longitud de onda se localiza en la familia de espectros de absorción (figura 3.2.1).

De acuerdo con la figura 3.2.1, la señal o absorbancia incrementa de manera proporcional a la concentración de Eosina-Y a  $\text{pH}=4.0\pm 0.1$ , donde la especie predominante es  $\text{EY}^{2-}$  teniendo un estado energético que se puede alterar por la absorción de radiación a determinada longitud de onda, siendo ésta el máximo de absorción localizado en  $\lambda_{\text{max}}=515 \text{ nm}$ .

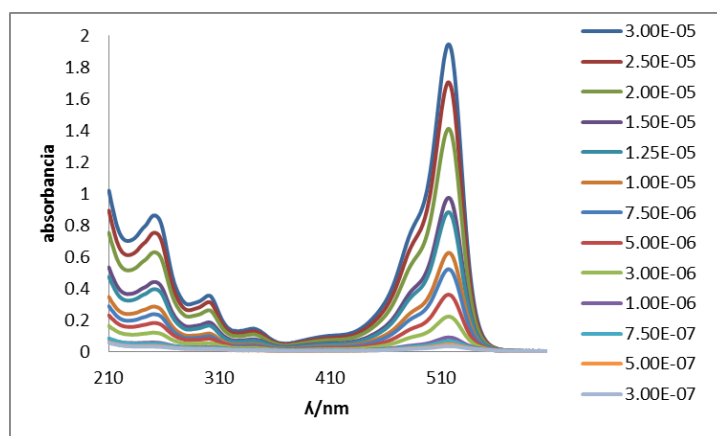


Figura 3.2.1 Familia de espectros de absorción a  $\text{pH}\approx 4.0$  para el intervalo de concentraciones de  $3.00 \times 10^{-7} < [\text{Eosina-Y}] < 3.00 \times 10^{-5} \text{ M}$

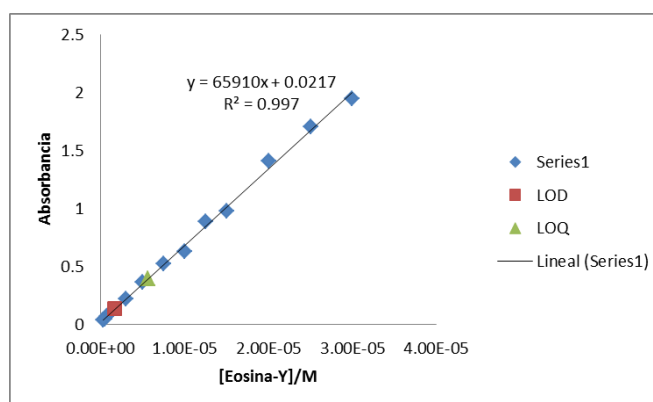
Con la longitud de onda máxima, se recaban los valores de absorbancia (tabla 3.2.1) para cada una de las soluciones para la construcción de la CC.

Tabla 3.2.1. Valores de concentración y absorbancia a para cada solución  $\lambda_{\text{max}}= 515 \text{ nm}$

Solución	[Eosina-Y]	Absorbancia
1	3.00E-05	1.942
2	1.00E-05	0.974
3	7.50E-06	0.522

4	5.00E-06	0.362
5	3.00E-06	0.223
6	1.00E-06	0.0914
7	7.50E-07	0.0688
8	5.00E-07	0.0464
9	3.00E-07	0.0358

En la figura 3.2.2 se muestra la CC obtenida a partir de la información de la tabla 3.2.1. El comportamiento de todo el intervalo de concentraciones con respecto a la absorción es lineal al utilizar la aproximación de mínimos cuadrados. El factor de correlación resulta  $r^2 = 0.997$ , por tanto se puede establecer que cumple la Ley de Beer.



*Figura 3.2.2. Curva de calibración (CC) elaborada por lo espectros de absorción del sistema SM1 y SM2, a  $pH \approx 4.0$  y máximo de absorción en 515 nm. Con intervalo de concentración de  $3.00 \times 10^{-7} < [Eosina-Y] < 3.00 \times 10^{-5} M$*

Los parámetros de desempeño de una CC están ilustrados en la figura 3.2.2 los cuales son: la sensibilidad que es la pendiente de la ecuación,  $LOD_x$  (por límite de detección) señala donde se distingue la señal de la muestra a la del ruido.  $LOQ_x$  (por límite de cuantificación) que permite cuantificar la concentración con menor error con un dato de absorbancia conocido. Los dos últimos parámetros se calculan con las siguientes ecuaciones:

$$LOD_x = \frac{3S_y}{m} \quad ; \quad LOQ_x = \frac{10S_y}{m} \quad (3.2.1)$$

Donde  $S_y$  = desviación estándar de la recta de regresión lineal  $m$  = pendiente de la recta

Otro parámetro de desempeño es el intervalo dinámico lineal que comienza en el valor de LOQX o LODX hasta que se pierde la linealidad: LOL (por límite de linealidad). Los parámetros se muestran en la tabla 3.3.1.

El intervalo lineal es  $5.66 \times 10^{-6} < [\text{Eosina-Y}] < 3.0 \times 10^{-5}$ , del cual se calcularán los valores de pKa por espectroscopia de UV-visible. La concentración propuesta a utilizar será de  $1 \times 10^{-5}$  M, cuyos valores de absorbancia estén entre  $0.2 < A < 1.0$  que darán una precisión optima de la respuesta y no se presentaran desviaciones a la Ley de Beer [11].

Tabla 3.3.1. Parámetros de desempeño para el intervalo de  $3.00 \times 10^{-7} < [\text{Eosina-Y}] < 3.00 \times 10^{-5}$  M

Parámetro de desempeño	
LODX/M	$1.7 \times 10^{-6} \pm 7.7 \times 10^{-7}$
LOQX/M	$5.66 \times 10^{-6} \pm 6.42 \times 10^{-7}$
Intervalo dinámico lineal/M	$5.66 \times 10^{-6} < [\text{Eosina-Y}] < 3.0 \times 10^{-5}$

### 3.3 Determinación de curva de calibración por espectroscopia de fluorescencia

Las longitudes de excitación ( $\lambda_{ex}$ ) para obtener los espectros de emisión y posteriormente utilizadas para la construcción de su respectiva curva de calibración, fueron seleccionadas de la familia de espectros de absorción (figura 1.2.1) las longitudes de onda de 240 nm, 410 nm, y 300 nm, 340 nm, 515 nm y 490 nm. En caso del espectro de excitación (figura 1.2.2) se escogió la longitud de onda de 250 nm respectivamente. La única longitud de emisión  $\lambda_{em}=540$  nm fue seleccionada del espectro de excitación del trabajo previo.

Las curvas de calibración se realizan a  $pH \approx 4.0$ , siguiendo la especie quien posiblemente rige la fluorescencia:  $EY^{2-}$ . El anillo de xanteno, grupo fluoróforo y aceptor de electrones, presenta fluorescencia la cual es modificada por la parte benzoica quien dona electrones e incrementan el rendimiento de la fluorescencia [10,12].

#### 3.3.1 Longitud de excitación de 300 y 340 nm

En la figura 3.3.1.1 se muestra la familia de espectros de emisión fluorescente obtenidos a partir de las soluciones de la sección 2.3.2, donde la especie predominante es  $EY^{2-}$ . En dichos espectros, se esperan señales con longitudes de onda de 600 nm y 680 nm debida

al primer armónico de la luz empleada para excitar las soluciones. Estos artefactos pueden retirarse usando del filtro de 350 nm de modo que la respuesta es únicamente al analito.

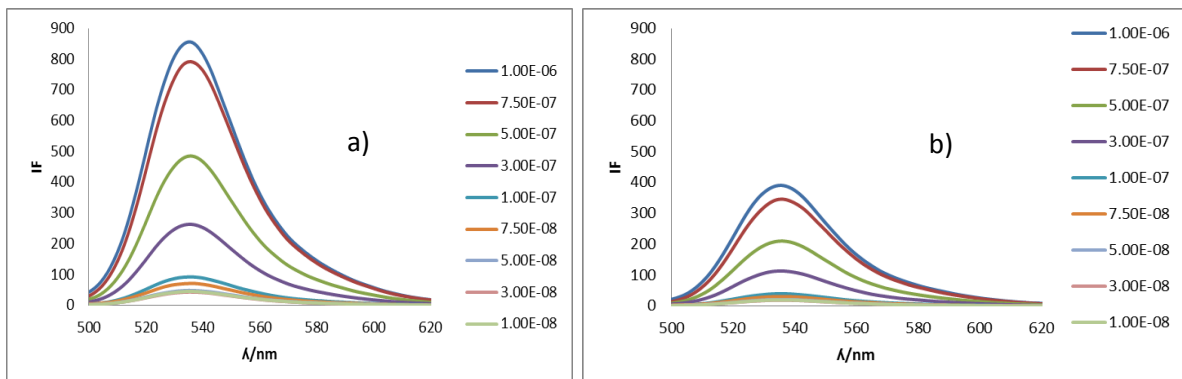


Figura 3.3.1.1 Espectros de emisión fluorescente a pH≈4.0: a)  $\lambda_{ex}=300$  nm, b)  $\lambda_{ex}=340$  nm

De acuerdo a la figura 3.3.1.1, a pesar de las mismas condiciones de abertura de rendija para excitación y emisión. Se presenta mayor respuesta fluorescente para una  $\lambda_{ex}=300$  nm lo que indica que para esa longitud de excitación hay mayor excitación a la molécula que para una  $\lambda_{ex}=340$  nm.

El perfil de los espectros para las dos familias es similar, para las tres concentraciones más altas la separación entre las señales máximas ( $\lambda=535$  nm) no es proporcional. Lo que podría indicar desviaciones del comportamiento lineal. En la tabla 3.3.1.1 se recaban los valores máximos de IF ubicados en una  $\lambda_{em}=535$  nm fija para la construcción de la CC y las búsqueda del intervalo dinámico lineal. La longitud de onda de 540 nm del trabajo preliminar, no se realizó la búsqueda adecuada del máximo de absorción y por ende se aproximó a 540 nm.

Tabla 3.3.1.1 Valores de IF a una  $\lambda_{em}=535$  nm fija para cada concentración y  $\lambda_{ex}$

		IF	
Solución	[Eosina-Y]	$\lambda_{ex}=300$ nm	$\lambda_{ex}=340$ nm
1	1.00E-06	856.0518	391.348
2	7.50E-07	791.671	346.659
3	5.00E-07	485.369	210.959
4	3.00E-07	263.564	113.884
5	1.00E-07	92.562	40.332
6	7.50E-08	71.433	30.903
7	5.00E-08	48.724	21.352



8	3.00E-08	43.300	19.398
9	1.00E-08	45.632	19.768

La curva de calibración para cada  $\lambda_{EX}$  se ilustra en la figura 3.3.1.2. En los extremos máximo y mínimo de concentración presenta un comportamiento curvilíneo y por tanto una desviación del comportamiento lineal. Se obtienen para  $\lambda_{EX}=340$  nm los cálculos de la regresión lineal a todos los datos: pendiente (m) igual a  $4.09 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ , ordenada al origen (b) igual a 4.895, y con coeficiente de correlación al cuadrado ( $r^2$ ) igual a 0.9863. Con una suma de residuos al cuadrado de 2113.426. La cuestión es minimizar la suma de cuadrados de los residuos. Al retirar las soluciones 1 y 9, que evidentemente no pertenecen al intervalo lineal,  $m= 4.51 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ ,  $b=-4.318$ ,  $r^2=0.9913$  y suma de cuadrados de 674.41. La disminución de la suma de cuadrados corrobora que dichas soluciones no pertenecen al comportamiento lineal y el valor de  $r^2$  mejora. En el extremo máximo la desviación ocurre por el incremento de probabilidad de que la molécula se relaje o pierda el exceso de energía mediante degradación térmica por colisiones debida a concentraciones elevadas, efecto que se aminora con concentraciones de soluto pequeñas [9]. Sin embargo, a concentraciones suficientemente diluidas (solución 9) ocurre también la desviación, debida a un error de lectura por radiación parásita o que se está por debajo del LODx.

Se repite el mismo proceso para la solución 2, haciendo el cálculo sólo con seis puntos de la tabla 3.3.1.1, con resultados  $m= 4.08 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ ,  $b=1.024$ ,  $r^2= 0.9928$ . Los residuos son 5.812,-9.609, -1.515,-0.738,-0.0836, 6.126, con suma de cuadrados de 166.58. Con esta regresión lineal el residuo para la solución 2 es 39.462, el cual es más grande significativamente que los otros residuos. Por lo tanto se excluye del intervalo lineal, además el valor de  $r^2$  mejora sin su presencia.

Procediendo de los misma manera con la solución 3, con resultados con sólo cinco puntos  $m= 3.60 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ ,  $b=5.159$ ,  $r^2=0.9961$ . Los residuos son 0.578, -0.876, -1293, -1.832, 3.423 con suma de cuadrados de 17.850. Con esta regresión lineal el residuo para la solución 3 es 25.556, que es significativamente más grande que los otros residuos. Po tanto es razonable excluir esta solución en el intervalo lineal. El valor de  $r^2$  no mejora notablemente, pero sigue habiendo relación entre señal y concentración.

Repitiendo el mismo proceso para la solución 8, haciendo el cálculo sólo con 4 puntos de la tabla 3.3.1.1, con resultados  $m= 3.69 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ ,  $b=3.144$ ,  $r^2= 0.99996$ . Los residuos son -0.057,-0.255, 0.060,-0.258, con suma de cuadrados de 0.138. Con esta regresión lineal el residuo para la solución 8 es 26.768, el cual es más grande significativamente que los otros residuos. Por lo tanto se excluye del intervalo lineal, además el valor de  $r^2$

incrementa notablemente. El comportamiento y anterior procedimiento descrito es similar para la  $\lambda_{EX}=300$  nm.

Debido a lo anterior, se descartan los puntos que provocan dicho comportamiento y calculan los parámetros de desempeño con las ecuaciones 3.2.1. Al retirar la disolución 1-3 y 8-9 para ambas CC se obtienen un comportamiento lineal como se ilustra en la figura 3.3.1.3.

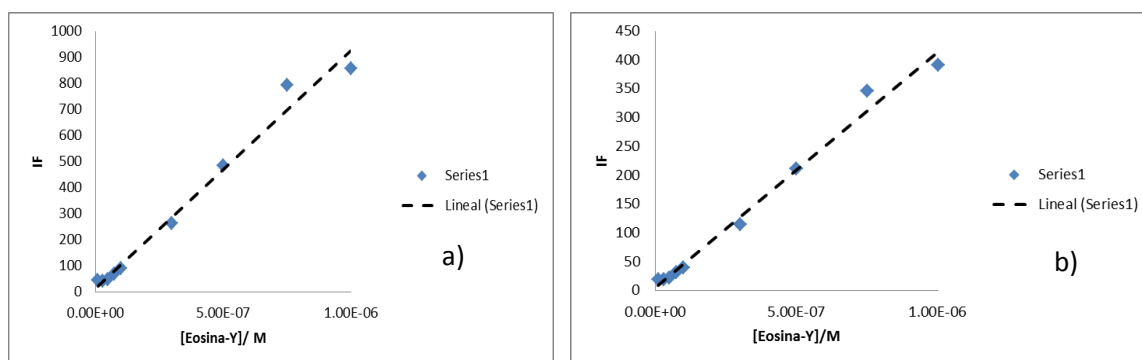


Figura 3.3.1.2. Curva de calibración (CC) elaborada por lo espectros de emisión del sistema SM1, a  $pH \approx 4.0$  y máximo de IF en 535 nm: a) CC con  $\lambda_{EX} = 300$  nm b) CC con  $\lambda_{EX} = 340$  nm. Ambas con el intervalo de concentración de  $1.00 \times 10^{-8} < [Eosina-Y] < 1.00 \times 10^{-6}$  M

De acuerdo a la figura 3.3.1.2, la IF con respecto al intervalo de concentraciones de Eosina-Y sigue un comportamiento lineal al utilizar la aproximación de mínimos cuadrados. Los factores de correlación resultan  $r^2 = 0.99995$  para  $\lambda_{EX} = 300$  nm y  $r^2 = 0.99996$  para  $\lambda_{EX} = 340$  nm.

Los parámetros de desempeño se muestran en la tabla 3.3.1.2, donde el intervalo dinámico lineal es semejante y se propone la fusión de éstos para realizar a la misma concentración el cálculos de los valores de pKa, resultando ser de  $7.9 \times 10^{-9} < [Eosina-Y] < 3.0 \times 10^{-7}$  M.

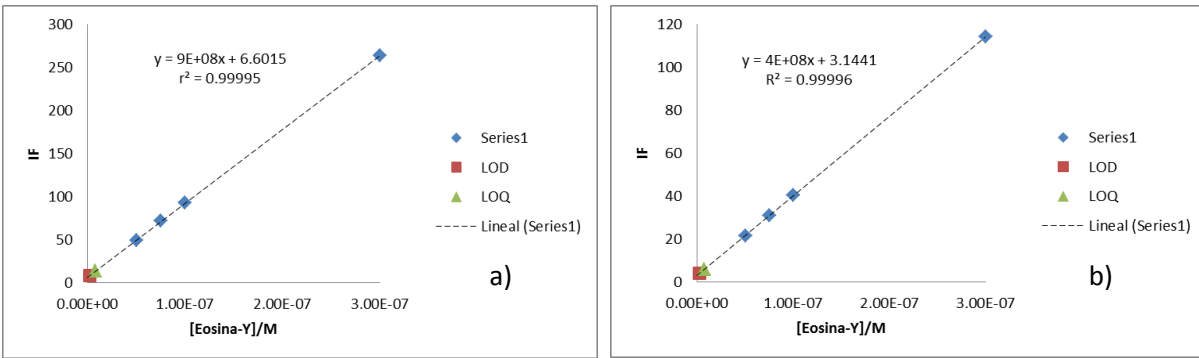


Figura 3.3.1.3 Curva de calibración (CC) elaborada por lo espectros de emisión del sistema SM1, a pH≈4.0 y máximo de IF en 535 nm: a) CC con  $\lambda_{Ex}= 300$  nm b) CC con  $\lambda_{Ex}= 300$  nm. Ambas con el intervalo de concentración de  $5.00 \times 10^{-8} < [Eosina-Y] < 3.00 \times 10^{-7}$  M

Tabla 3.3.1. Parámetros de desempeño para el intervalo de  $5.00 \times 10^{-8} < [Eosina-Y] < 3.00 \times 10^{-7}$  M

Parámetro de desempeño	$\lambda_{Ex}/nm$	
	300	340
LODX/M	$2.2 \times 10^{-9} \pm 1.4 \times 10^{-9}$	$2.1 \times 10^{-9} \pm 1.2 \times 10^{-9}$
LOQX/M	$7.9 \times 10^{-9} \pm 1.3 \times 10^{-9}$	$7.1 \times 10^{-9} \pm 1.2 \times 10^{-9}$
Intervalo dinámico lineal/M	$7.9 \times 10^{-9} < [Eosina-Y] < 3.0 \times 10^{-7}$	$7.13 \times 10^{-9} < [Eosina-Y] < 3.0 \times 10^{-7}$

### 3.3.2 Longitud de excitación de 490 y 515 nm

La utilización de las  $\lambda_{Ex}= 490$  nm y 515 nm trae consigo ciertas consideraciones para la obtención de los espectros de emisión fluorescente, ilustrados en la figura 3.3.2.1. En la familia de espectros de  $\lambda_{Ex}= 490$  nm (figura 3.3.2.1.a), se presenta una señal a la misma longitud de onda (espectro 490\_3) que al modificar el barrido de 500 -620 nm puede ser omitida (espectro 490\_2). Sin embargo, queda parte de la señal de la  $\lambda_{Ex}$  de tal modo que al utilizar el filtro de 515 nm (espectro 490\_1) el espectro de emisión fluorescente queda limpio.

Para la familia de espectros a  $\lambda_{Ex}=515$  nm (figura 3.3.2.1.b), se espera una respuesta a la misma longitud de onda (espectro 515\_1), de modo que el intervalo de barrido no puede ser de 500-620 nm o a longitudes de onda menores ya que la respuesta se da a longitudes de onda mayores a la  $\lambda_{Ex}$  por la pérdida de energía en el estado excitado debida a la

relajación vibracional. El intervalo de barrido será de 530-620 nm con filtro de 515 nm (espectro 515\_2) para evitar la señal por parte de la  $\lambda_{Ex}$ , pero queda un residuo de ésta.

Tomando en cuenta las consideraciones del uso del filtro, en la figura 3.3.2.2 se muestra la familia de espectros de emisión fluorescente obtenidos a partir de las soluciones de la sección 2.3.2, donde la especie predominante es  $EY^{2-}$ .

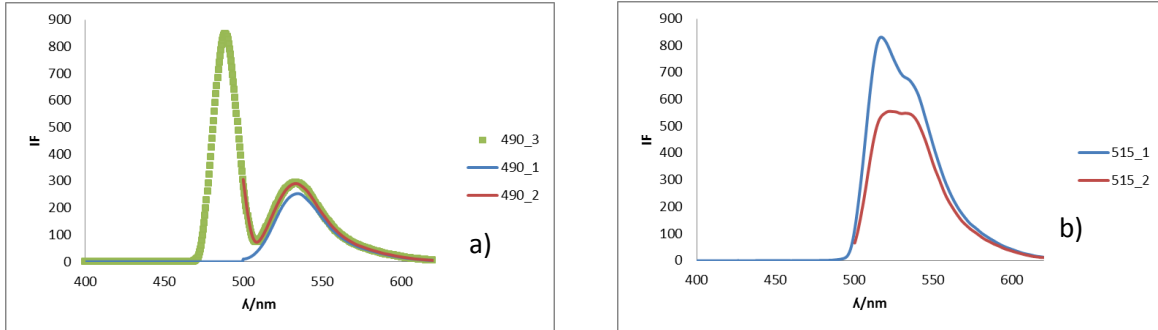


Figura 3.3.2.1 Espectros de emisión fluorescente a  $pH \approx 4.0$  modificando el filtro: a)  $\lambda_{ex} = 490 \text{ nm}$ , b)  $\lambda_{ex} = 515 \text{ nm}$

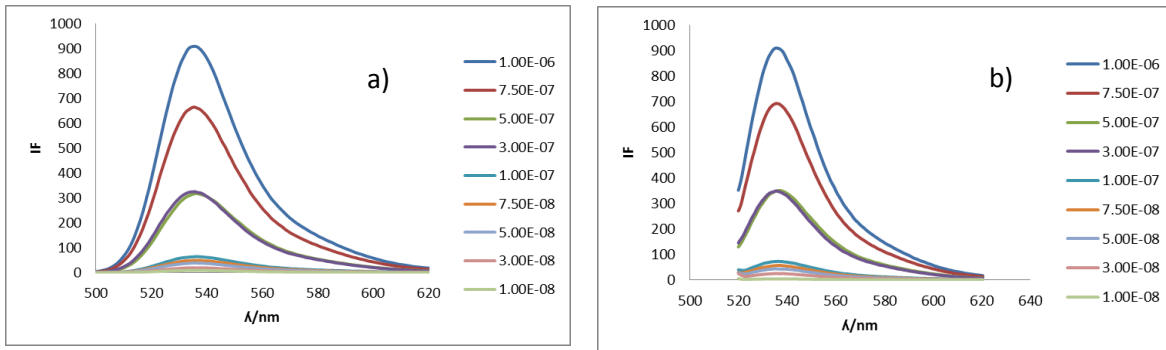


Figura 3.3.2.2 Espectros de emisión fluorescente a  $pH \approx 4.0$ : a)  $\lambda_{ex} = 490 \text{ nm}$ , b)  $\lambda_{ex} = 515 \text{ nm}$

De acuerdo a la figura 3.3.1.2, a pesar de las mismas condiciones de apertura de rendija para excitación y emisión. Las dos  $\lambda_{Ex}$  presentan similarmente la misma IF dando valores cerca del límite del equipo (1000 cuentas), lo que lleva a que el perfil de los espectros para las dos familias sea similar. Sin embargo, en las cuatro soluciones de concentración mayor el espaciado entre los máximos no es proporcional y además la concentración de  $3 \times 10^{-7} \text{ M}$  y  $5 \times 10^{-7} \text{ M}$  presentan la misma IF, presentándose un error por parte del experimentador o desviaciones del comportamiento lineal. Como consecuencia una suma de residuos de 19535.66 y 16932.76 para  $\lambda_{Ex} = 490 \text{ nm}$  y  $515 \text{ nm}$  respectivamente.

En la tabla 3.3.2.1 se recaban los valores máximos de IF ubicados en una  $\lambda_{Em} = 536 \text{ nm}$  fija para la construcción de la CC y las búsqueda del intervalo dinámico lineal.

Tabla 3.3.2.1 Valores de IF a una  $\lambda_{Em}= 536$  nm fija para cada concentración y  $\lambda_{Ex}$

Solución	[Eosina-Y]/ M	IF	
		$\lambda_{Ex}= 490$ nm	$\lambda_{Ex}= 515$ nm
1	1.00E-06	907.428	908.380
2	7.50E-07	662.742	691.383
3	5.00E-07	317.0875	349.257
4	3.00E-07	324.148	348.262
5	1.00E-07	64.0577	72.422
6	7.50E-08	49.211	56.535
7	5.00E-08	38.421	43.199
8	3.00E-08	19.274	24.729
9	1.00E-08	9.243	4.0119

La curva de calibración para cada  $\lambda_{Ex}$  se ilustra en la figura 3.3.2.3. Ambas CC tienden a una ecuación polinomial de segundo grado en lugar de una relación lineal.

Al retirar las soluciones 1 y 2 para la  $\lambda_{Ex}=515$  nm, se hace cálculo sólo con siete puntos de la tabla 3.3.2.1, con resultados  $m= 7.96 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ ,  $b=7.272$ ,  $r^2= 0.8986$ , con suma de cuadrados de 14080.45. La suma de cuadrados no disminuye notoriamente y el valor de  $r^2$  no se favorece. Por tanto, el análisis se realizara con las soluciones 3 y 4, las cuales presentan IF semejante.

Al realizar el análisis retirando la solución 3, da resultados con sólo seis puntos  $m= 1.2 \times 10^9$ ,  $b=-21.617$ ,  $r^2=0.985$ , con suma de cuadrados de 1227.67. Y retirando la solución 5,  $m= 6.93 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ ,  $b=3.336$ ,  $r^2=0.9992$ , con suma de cuadrados de 68.53. La disminución de la suma de cuadrados para ambos casos disminuye en gran cantidad de la inicial. Sin embargo, una mejor correlación entre la respuesta y la concentración se da al retirar la solución 5 denotado por el incremento de  $r^2$  y la gran disminución de la suma de cuadrados.

Realizando el análisis de residuos sin la solución 3, haciendo el cálculo sólo con cinco puntos de la tabla 3.3.2.1, con resultados  $m= 7.43 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ ,  $b=0.776$ ,  $r^2= 0.9807$ . Los residuos son -2.70,  $3.03 \times 10^{-5}$ , 5.25, 1.64, -4.20, con suma de cuadrados de 55.20. Con esta regresión lineal el residuo para la solución 3 es 540.36, el cual es más grande significativamente que los otros residuos. Por lo tanto se excluye del intervalo lineal,

aunque con su presencia haya mejorado el valor de  $r^2$ . El comportamiento y anterior procedimiento descrito es similar para la  $\lambda_{Ex}=490$  nm.

Debido a lo anterior, se descartan los puntos que provocan dicho comportamiento y calculan los parámetros de desempeño con las ecuaciones 3.2.1. Al retirar la disolución 1-4 para ambas CC, se obtienen un comportamiento lineal como se ilustra en la figura 3.3.1.3.

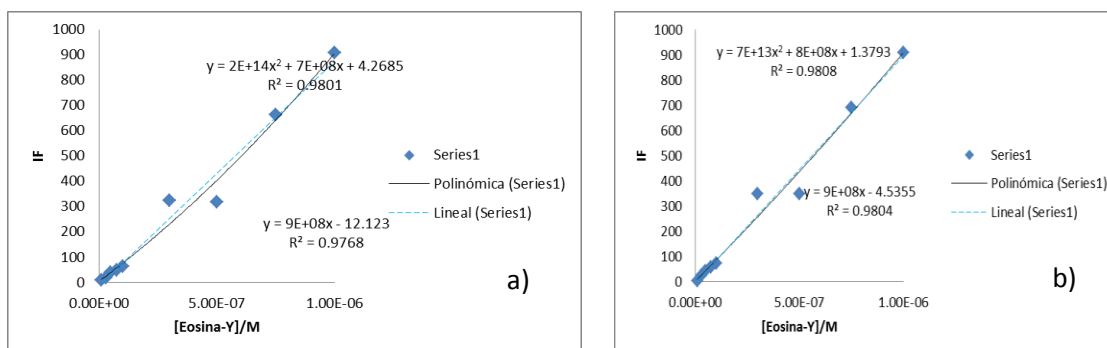


Figura 3.3.2.3. Curva de calibración (CC) elaborada por lo espectros de emisión del sistema SM1, a  $pH \approx 4.0$  y máximo de IF en 536 nm: a) CC con  $\lambda_{Ex}= 490$  nm b) CC con  $\lambda_{Ex}= 515$  nm. Ambas con el intervalo de concentración de  $1.00 \times 10^{-8} < [Eosina-Y] < 1.00 \times 10^{-6}$  M

De acuerdo a la figura 3.3.2.4, la IF con respecto al intervalo de concentraciones de Eosina-Y sigue un comportamiento lineal. Al aplicar la regresión con en Excel (forma simple de método por mínimos cuadrados), el valor de  $r = 0.9869$  para  $\lambda_{Ex}= 490$  nm y  $r^2= 0.9807$  para  $\lambda_{Ex}= 515$  nm. Los parámetros de desempeño se muestran en la tabla 3.3.2.2, donde el intervalo dinámico lineal es semejante y se propone la fusión de éstos para realizar a la misma concentración el cálculo de los valores de  $pK_a$  resultando ser de  $5.8 \times 10^{-8} < [Eosina-Y] < 1.0 \times 10^{-7}$  M.

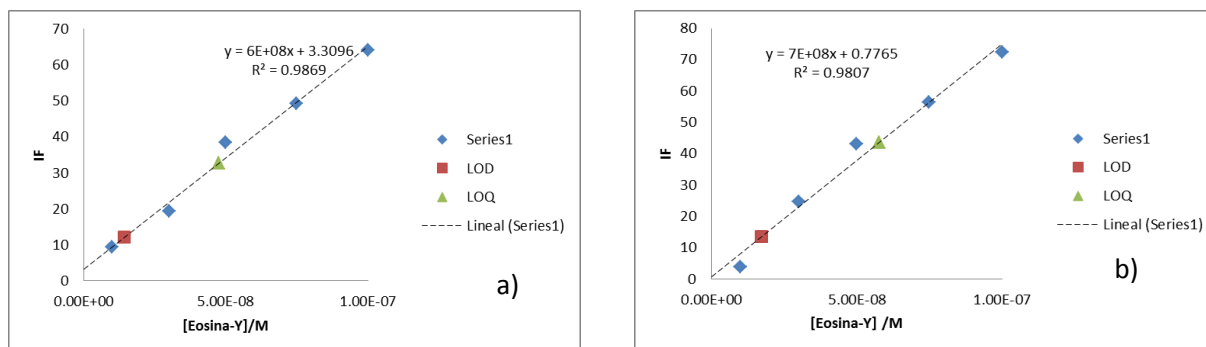


Figura 3.3.2.4. Curva de calibración (CC) elaborada por lo espectros de emisión del sistema SM1, a  $pH \approx 4.0$  y máximo de IF en 536 nm: a) CC con  $\lambda_{Ex}= 490$  nm b) CC con  $\lambda_{Ex}= 515$  nm. Ambas con el intervalo de concentración de  $1.00 \times 10^{-8} < [Eosina-Y] < 1.00 \times 10^{-7}$  M

Tabla 3.3.2.2. Parámetros de desempeño para el intervalo de  $1.00 \times 10^{-8} < [\text{Eosina-Y}] < 1.00 \times 10^{-7} \text{ M}$

Parámetros de desempeño	$\lambda_{\text{Ex}}/\text{nm}$	
	490	515
LODX/M	$1.42 \times 10^{-8} \pm 0.78 \times 10^{-8}$	$1.73 \times 10^{-8} \pm 0.90 \times 10^{-8}$
LOQX/M	$4.74 \times 10^{-8} \pm 0.53 \times 10^{-8}$	$5.77 \times 10^{-8} \pm 0.64 \times 10^{-8}$
Intervalo dinámico lineal/M	$4.7 \times 10^{-8} < [\text{Eosina-Y}] < 1.0 \times 10^{-7}$	$5.8 \times 10^{-8} < [\text{Eosina-Y}] < 1.0 \times 10^{-7}$

### 3.3.3 Longitud de excitación de 240 y 410 nm

En la figura 3.3.3.1 se muestra la familia de espectros de emisión fluorescente obtenidos a partir de las soluciones de la sección 2.3.2. En la utilización de la  $\lambda_{\text{Ex}} = 240 \text{ nm}$ , perteneciente a los espectros de absorción, se presentara una señal en la longitud de 480 nm (doble de  $\lambda_{\text{Ex}}$ ) que puede ser omitida con el filtro de 290 nm. En el caso de  $\lambda_{\text{Ex}} = 410 \text{ nm}$ , la señal directa se espera en la misma longitud de onda que no se verá reflejada en el intervalo de barrido de 500-620 nm. Sin embargo, el filtro de 430 nm omitirá alguna posible señal o un decaimiento en la señal como lo fue en  $\lambda = 490 \text{ nm}$ .

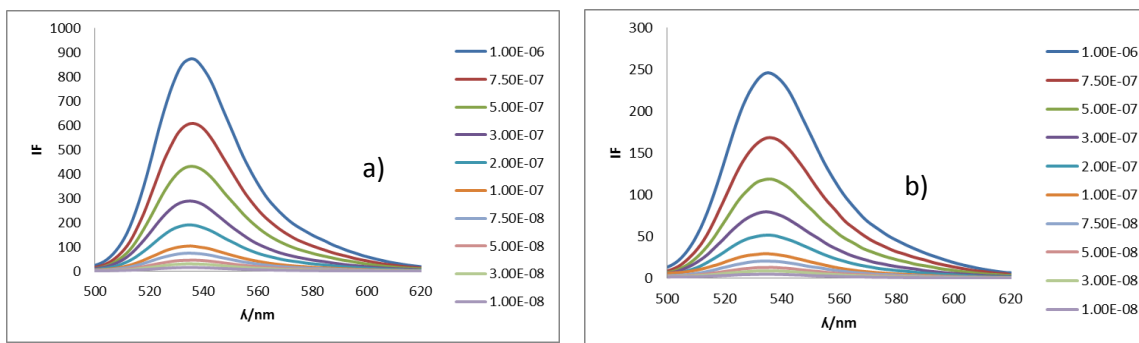


Figura 3.3.3.1 Espectros de emisión fluorescente a  $\text{pH} \approx 4.0$ : a)  $\lambda_{\text{ex}} = 240 \text{ nm}$ , b)  $\lambda_{\text{ex}} = 410 \text{ nm}$

De acuerdo a la figura 3.3.3.1, en donde los espectros se midieron con la rendija de emisión para la  $\lambda_{\text{Ex}} = 410 \text{ nm}$  con la máxima apertura (20 nm), la IF no es mayor en comparación con  $\lambda_{\text{Ex}} = 240 \text{ nm}$  y apertura de rendija = 14.0 nm. Lo que podría indicar que la  $\lambda_{\text{Ex}} = 410 \text{ nm}$  no es óptima para excitar en forma eficiente a la molécula.

En la tabla 3.3.3.1 se recaban los valores máximos de IF medidos para  $\lambda_{Em}=535$  nm fija, donde se agregó una solución de  $[Eosina-Y]=2 \times 10^{-7}$  M, para la construcción de la CC y las búsqueda del intervalo dinámico lineal.

Tabla 3.3.3.1 Valores de IF a una  $\lambda_{Em}= 535$  nm fija para cada concentración y  $\lambda_{Ex}$

Solución	[Eosina-Y]/ M	IF	
		$\lambda_{Ex}= 240$ nm	$\lambda_{Ex} =410$ nm
1	1.00E-06	871.631	245.691
2	7.50E-07	606.293	168.144
3	5.00E-07	430.828	118.628
4	3.00E-07	288.899	79.221
5	2.00E-07	190.861	51.517
6	1.00E-07	104.173	29.165
7	7.50E-08	74.679	20.425
8	5.00E-08	45.851	12.864
9	3.00E-08	30.899	8.533
10	1.00E-08	15.957	4.727

La curva de calibración (CC) para cada  $\lambda_{Ex}$  se ilustra en la figura 3.3.3.2. Ambas CC tienen un perfil similar y la ecuación polinomial de grado dos con la funcional lineal ajustan bien los datos. Sin embargo, se debe trabajar con la parte lineal. Se observa que a partir de la solución 5-9 los datos parecen tener un comportamiento lineal.

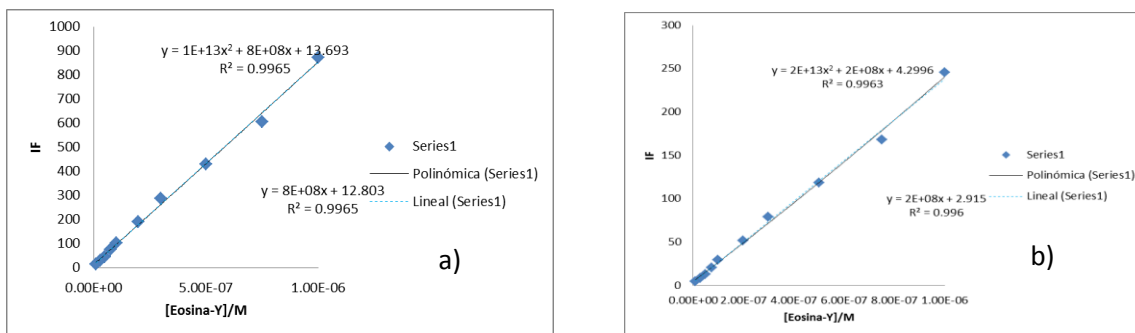


Figura 3.3.3.2. Curva de calibración (CC) elaborada por lo espectros de emisión del sistema SM1, a  $pH \approx 4.0$  y máximo de IF en 535 nm: a) CC con  $\lambda_{Ex}= 240$  nm b) CC con  $\lambda_{Ex}= 410$  nm. Ambas con el intervalo de concentración de  $1.00 \times 10^{-8} < [Eosina-Y] < 1.00 \times 10^{-6}$  M



En el caso de  $\lambda_{\text{ex}}=240$  nm, se obtienen los cálculos de la regresión lineal para todos los datos:  $m= 8.40 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ ,  $b= 12.80$ , y  $r^2= 0.9965$ . Con una suma de residuos al cuadrado de 2586.8. Al retirar las soluciones 1, haciendo el cálculo solo con seis puntos de la tabla 3.3.3.1, con resultados  $m= 8.10 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ ,  $b=17.16$ ,  $r^2= 0.9948$ . Los residuos son -19.05, 8.21, 28.46, 11.52, 5.92, -3.30, -11.86, -10.59, -9.31, con suma de cuadrados de 1758.62. Con esta regresión lineal el residuo para la solución 1 es 1897.33, el cual es más grande significativamente que los otros residuos. Por lo tanto se excluye del intervalo lineal.

Procediendo de la misma manera con la solución 2, con resultados con ocho puntos  $m= 8.68 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ ,  $b=10.59$ ,  $r^2=0.9953$ . Los residuos son -13.53, 18.05, 6.76, 6.83, -0.97, -8.11, -5.72, -3.31, con suma de cuadrados de 711.63. Con esta regresión lineal el residuo para la solución 2 es 3020.09, que es significativamente más grande que los otros residuos. Por tanto es razonable excluir esta solución en el intervalo lineal. El valor de  $r^2$  no mejora notablemente, pero sigue habiendo relación entre señal y concentración.

Repitiendo el mismo proceso para la solución 3, haciendo el cálculo solo con siete puntos de la tabla 3.3.3.1, con resultados  $m= 9.48 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ ,  $b=3.7012$ ,  $r^2= 0.9987$ . Los residuos son 0.72, -2.49, 5.65, 0.14, -5.26, -1.25, 2.77, con suma de cuadrados de 75.59. Con esta regresión lineal el residuo para la solución 3 es 2208.80, el cual es más grande significativamente que los otros residuos. Por lo tanto también se excluye del intervalo lineal y el valor de  $r^2$  incrementa.

De igual manera para la solución 4, el cálculo con seis puntos de la tabla 3.3.3.1, con resultados  $m= 9.41 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ ,  $b=4.12$ ,  $r^2= 0.9979$ . Los residuos son -1.52, 5.92, -0.04, -5.33, -1.46, 2.42, con suma de cuadrados de 73.86. Con esta regresión lineal el residuo para la solución 4 es 5.72, el cual no es tan grande que el resto de los otros residuos. Por lo tanto, se incluye en el intervalo lineal.

Para la  $\lambda_{\text{ex}}= 410$  nm, da como cálculos  $m= 2.35 \times 10^{-8} \text{ M}^{-1}$ ,  $b= 2.915$ ,  $r^2= 0.996$ , con suma de cuadrados de 234.22 al utilizar todos los puntos de la tabla 3.3.3.1. Al retirar la solución 1,  $m= 2.24 \times 10^{-8} \text{ M}^{-1}$ ,  $b=4.60$ ,  $r^2=0.9951$ , con suma de cuadrados 109.96. Los residuos son -4.62, 1.92, 7.35, 2.07, 2.14, -0.99, -2.95, -2.80, -2.12, con suma de cuadrados 109.96. El residuo para la solución 1 es 284.69, el cual es significativamente más grande que el resto. Al retirar dicha solución la suma de cuadrados disminuye, de modo que se rechaza del intervalo lineal.

Continuando con la solución 2, dan resultados de  $m= 2.37 \times 10^{-8} \text{ M}^{-1}$ ,  $b= 3.01$ ,  $r^2= 0.995$ . Los residuos son -3.36, 4.83, 0.92, 2.36, -0.43, -2.04, -1.61, -0.66, con suma de cuadrados de 48.38. El residuo para la solución 2 es -13.33, no es significativamente más grande que el resto. Al retirar dicha solución la suma de cuadrados disminuye en al menos un cuarto de

cantidad, y el valor de  $r^2$  se mantiene idéntico. De tal modo, que se descarta del intervalo ya que sin su presencia la suma de cuadrados disminuye adecuadamente.

Repitiendo los cálculos con la solución 3, dan resultados de  $m= 2.57 \times 10^{-8} \text{ M}^{-1}$ ,  $b= 1.30$ ,  $r^2= 0.9987$ . Los residuos son 0.53, 1.38, 2.06, -0.22, -1.33, -0.51, 0.84, con suma de cuadrados de 9.26. El residuo para la solución 3 es -11.66, que no es significativamente más grande que el resto. Al retirar dicha solución la suma de cuadrados disminuye en al menos un quinto de cantidad, y el valor de  $r^2$  aumenta. Se descarta la solución 3, debido a la disminución suma de cuadrados. El hecho de usar este tipo de discriminación provocara la reducción del intervalo lineal siendo este a criterio de la exactitud que se requiera [14].

De acuerdo a lo anterior, para la  $\lambda_{\text{Ex}}= 240 \text{ nm}$  y  $\lambda_{\text{Ex}}= 410 \text{ nm}$  se retiran las disoluciones 1-3, y se calculan los parámetros de desempeño con las ecuaciones 3.2.1. Se obtiene para ambas CC una tendencia lineal como se ilustra en la figura 3.3.3.3.

De acuerdo a la figura 3.3.3.3, la IF con respecto al intervalo de concentraciones de Eosina-Y sigue un comportamiento lineal al utilizar la aproximación de mínimos cuadrados. Los coeficientes de correlación resultan dar  $r^2=0.9987$  para  $\lambda_{\text{Ex}}=240 \text{ nm}$  y  $r^2= 0.9979$  para  $\lambda_{\text{Ex}}= 410 \text{ nm}$ .

Los parámetros de desempeño se muestran en la tabla 3.3.3.2, donde el intervalo dinámico lineal es semejante y se propone la fusión de éstos para realizar a la misma concentración el cálculo de los valores de  $\text{pKa}$  resultando ser de  $5.27 \times 10^{-8} < [\text{Eosina-Y}] < 3.0 \times 10^{-7} \text{ M}$ .

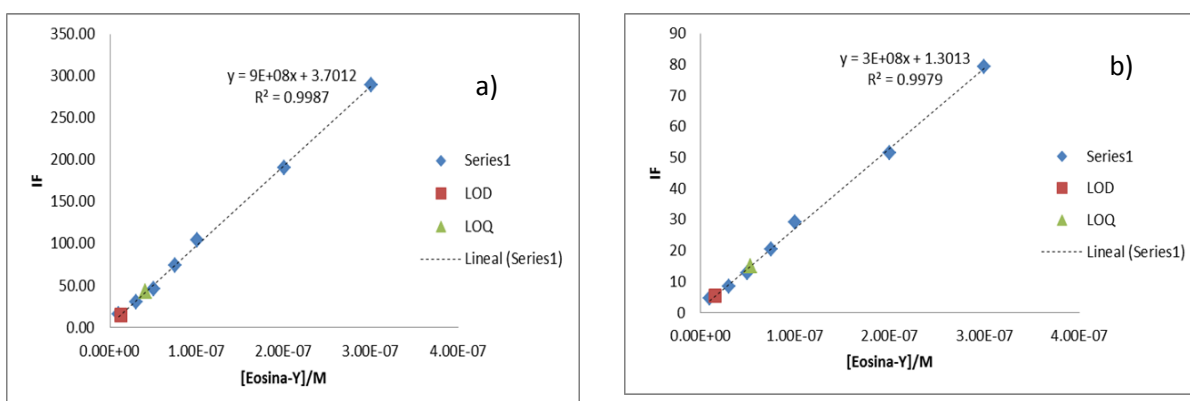


Figura 3.3.3.3. Curva de calibración (CC) elaborada por lo espectros de emisión del sistema SM1, a  $\text{pH} \approx 4.0$  y máximo de IF en 535 nm: a) CC con  $\lambda_{\text{Ex}}= 240 \text{ nm}$  b) CC con  $\lambda_{\text{Ex}}= 410 \text{ nm}$ . Con intervalo correspondiente de  $1 \times 10^{-8} < [\text{Eosina-Y}] < 3.0 \times 10^{-7}$ .

Tabla 3.3.3.2. Parámetros de desempeño para el intervalo  $1 \times 10^{-8} < [\text{Eosina-Y}] < 3.0 \times 10^{-7}$

Parámetros de desempeño	$\lambda_{\text{EX}}/\text{nm}$	
	240	410
<b>LODX/M</b>	$1.23 \times 10^{-8} \pm 0.60 \times 10^{-8}$	$1.58 \times 10^{-8} \pm 0.76 \times 10^{-8}$
<b>LOQX/M</b>	$4.10 \times 10^{-8} \pm 0.53 \times 10^{-8}$	$5.27 \times 10^{-8} \pm 0.64 \times 10^{-8}$
<b>Intervalo dinámico lineal/M</b>	$4.10 \times 10^{-8} < [\text{Eosina-Y}] < 3.0 \times 10^{-7}$	$5.27 \times 10^{-8} < [\text{Eosina-Y}] < 3.0 \times 10^{-7}$

### 3.3.4 Longitud de excitación de 250 y longitud de emisión 540 nm

En la figura 3.3.4.1 se muestra la familia de espectros de emisión fluorescente obtenidos a partir de las soluciones de la sección 2.3.2. En la utilización de la  $\lambda_{\text{EX}} = 250 \text{ nm}$ , se presentara una señal del primer armónico en  $\lambda = 500 \text{ nm}$  (doble de  $\lambda_{\text{EX}}$ ) que puede ser omitida con el filtro de 290 nm. En el caso de  $\lambda_{\text{EM}} = 540 \text{ nm}$ , la señal del primer armónico se espera en  $\lambda = 270 \text{ nm}$  (mitad de  $\lambda_{\text{EM}}$ ) el cual será omitido con el filtro de 390 nm.

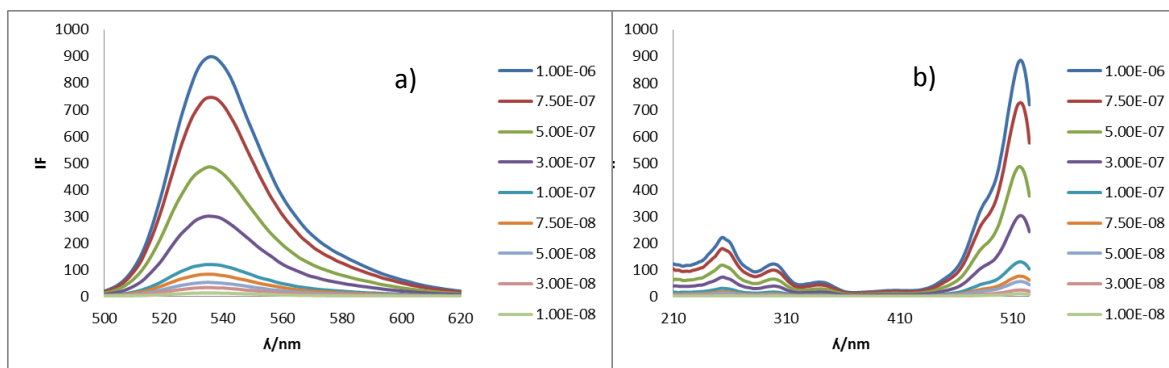


Figura 3.3.4.1 Espectros de: a) Emisión a  $\lambda_{\text{ex}} = 250 \text{ nm}$ , b) Excitación a  $\lambda_{\text{em}} = 540 \text{ nm}$ , fluorescente a  $\text{pH} \approx 4.0$ .

De acuerdo a la figura 3.3.3.1, los espectros de emisión fluorescente son semejantes a los de  $\lambda_{\text{EX}} = 240 \text{ nm}$  presentándose una IF grande a las mismas condiciones de rendija. A pesar de que estas dos bandas aparezcan en ciertos valores de pH en los espectros de absorción (sección 1.2). Parece ser que estas dos  $\lambda_{\text{EX}}$  están poblando de igual forma el estado excitado.

En el caso de los espectros de excitación fluorescente, en el máximo de IF localizado en la  $\lambda = 517 \text{ nm}$  la separación parece ser proporcional y para tener una mejor visión es

necesario construir la CC, donde en la tabla 3.3.3.1 se recaban los valores máximos de IF para esta y la  $\lambda_{EX}= 250$  nm requeridos para su elaboración.

Tabla 3.3.4.1 Valores de IF a  $\lambda_{EX}=250$  nm a  $\lambda_{Em}=535$  nm fija y  $\lambda_{Em}=540$  nm a  $\lambda_{EX}=517$  nm fija para cada concentración

solución	[Eosina- Y]/ M	IF	
		$\lambda_{EX}= 250$ nm	$\lambda_{Em}= 540$ nm
1	1.00E-06	895.741	885.120
2	7.50E-07	745.0454	726.0348
3	5.00E-07	484.918	486.0551
4	3.00E-07	301.260	302.994
5	1.00E-07	119.826	130.0277
6	7.50E-08	83.244	76.119
7	5.00E-08	52.828	55.743
8	3.00E-08	33.378	24.583
9	1.00E-08	13.0355	10.380

La curva de calibración (CC) para la  $\lambda_{EX}$  y  $\lambda_{Em}$  se ilustra en la figura 3.3.4.2. Ambas CC tienen un perfil similar y la ecuación polinomial de grado 2 se ajusta mejor a los datos, además en el extremo mayor de concentración se presenta una ligera curvatura de modo que se realizara el análisis de residuos para su posible extracción del intervalo lineal.

Se obtienen para  $\lambda_{EX}=250$  nm los cálculos de la regresión lineal a todos los datos:  $m= 9.16 \times 10^8$  M<sup>-1</sup>,  $b=17.93$ , y  $r^2=0.9957$ . Con una suma de residuos al cuadrado de 4113.92. Al retirar las solución 1, haciendo el cálculo solo con ocho puntos de la tabla 3.3.4.1, con resultados  $m= 9.73 \times 10^8$  M<sup>-1</sup>,  $b=9.60$ ,  $r^2= 0.9984$ . Los residuos son -97.37, 5.31, -11.44, -0.39, 23.07, 0.63, -5.44, -5.42, -6.30, con suma de cuadrados de 790.93. Con esta regresión lineal el residuo para la solución 1 es -87.37, el cual es más grande significativamente que los otros residuos. Por lo tanto se excluye del intervalo lineal, además que la suma de cuadrados disminuye notoriamente pero el valor de  $r^2$  disminuye.

Procediendo de la misma manera con la solución 2, con resultados con sólo siete puntos  $m= 9.57 \times 10^8$  M<sup>-1</sup>,  $b=11.29$ ,  $r^2=0.9961$ . Los residuos son 15.59, -5.08, 2.74, 22.99, 0.14, -6.33, -6.63, -7.83, con suma de cuadrados de 707.59. Con esta regresión lineal el residuo para la solución 2 es 15.69, que no es significativamente más grande que los otros residuos. Po tanto es razonable incluirlo en el intervalo lineal. El valor de  $r^2$  no mejora notablemente, pero sigue habiendo relación entre señal y concentración.

Con en análisis anterior la solución 5 tiene un residuo más grande que todos los demás, lo cual podría ser que no pertenezca al intervalo lineal. Repitiendo el mismo proceso para la solución 5, haciendo el cálculo solo con siete puntos de la tabla 3.3.4.1, con resultados  $m=9.80 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ ,  $b=4.64$ ,  $r^2=0.9997$ . Los residuos son 5.16, -9.88, 2.52, 5.08, -0.82, -0.67, -1.40, con suma de cuadrados de 132.93. Con esta regresión lineal el residuo para la solución 5 es 27.36, el cual es más grande que los otros residuos. La suma de cuadrados disminuye notablemente y el valor de  $r^2$  mejora bastante, lo cual es razonable excluirlo del intervalo. El comportamiento y anterior procedimiento descrito es similar para la  $\lambda_{Em}=540 \text{ nm}$  llevando a la misma conclusión.

Al retirar las soluciones 1 y 5 para ambas CC, se calculan los parámetros de desempeño con las ecuaciones 3.2.1. Se obtiene para ambas CC una tendencia lineal como se ilustra en la figura 3.3.4.3

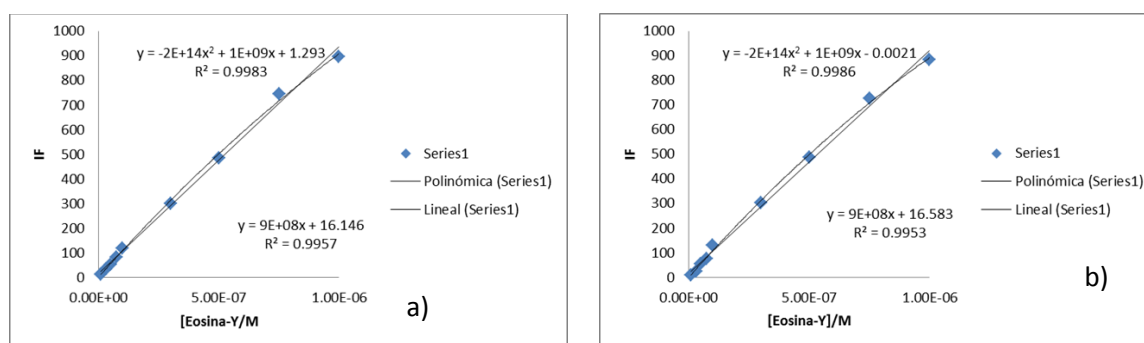


Figura 3.3.4.2. Curva de calibración (CC) elaborada por lo espectros de emisión del sistema SM1 y  $pH \approx 4.0$ : a) CC con  $\lambda_{Ex}=250 \text{ nm}$  con max. de IF en 535 nm b) CC con  $\lambda_{Em}=540 \text{ nm}$  con max. de IF en 517 nm. Ambas con el intervalo de concentración de  $1.00 \times 10^{-8} < [\text{Eosina-Y}] < 1.00 \times 10^{-6} \text{ M}$

De acuerdo a la figura 3.3.4.3, la IF con respecto al intervalo de concentraciones de Eosina-Y sigue un comportamiento lineal. Al aplicar la línea al utilizar la aproximación de mínimos cuadrados. Los coeficientes de correlación son  $r^2=0.9997$  para  $\lambda_{Ex}=250 \text{ nm}$  y  $r^2=0.9996$  para  $\lambda_{Em}=540 \text{ nm}$ .

Los parámetros de desempeño se muestran en la tabla 3.3.4.2. Se propone la fusión de los intervalos dinámicos lineales para la longitud de excitación y emisión, resultando ser de  $5.76 \times 10^{-8} < [\text{Eosina-y}] < 1.50 \times 10^{-7} \text{ M}$ .

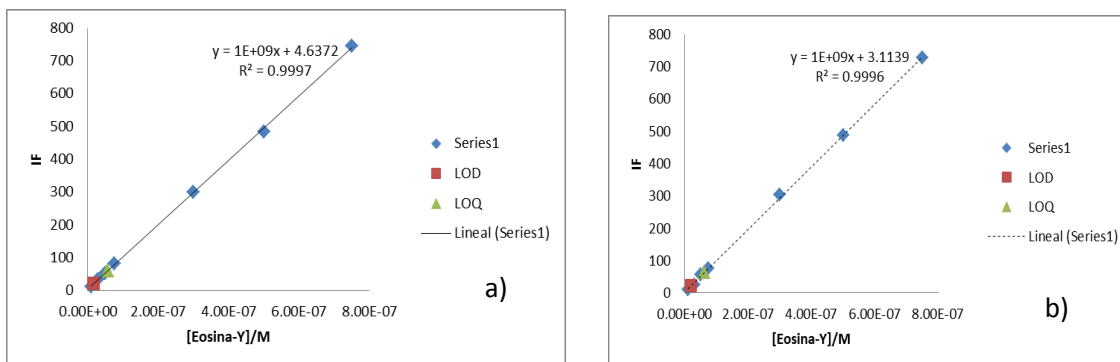


Figura 3.3.4.3. Curva de calibración (CC) elaborada por lo espectros de emisión del sistema SM1 y  $pH \approx 4.0$ : a) CC con  $\lambda_{Ex} = 250 \text{ nm}$  con max. de IF en 535 nm b) CC con  $\lambda_{Em} = 540 \text{ nm}$  con max. de IF en 517 nm. Ambas con el intervalo de concentración de  $1.00 \times 10^{-8} < [Eosina-Y] < 7.50 \times 10^{-7} \text{ M}$

Tabla 3.3.4.2. Parámetros de desempeño para el  $1.00 \times 10^{-8} < [Eosina-Y] < 7.50 \times 10^{-7}$

Parámetros de desempeño	$\lambda_{Ex} = 250 \text{ nm}$	$\lambda_{Em} = 540 \text{ nm}$
LODX/M	$1.73 \times 10^{-8} \pm 0.79 \times 10^{-8}$	$1.87 \times 10^{-8} \pm 0.85 \times 10^{-8}$
LOQX/M	$5.76 \times 10^{-8} \pm 0.74 \times 10^{-8}$	$6.23 \times 10^{-8} \pm 0.79 \times 10^{-8}$
Intervalo dinámico lineal/M	$5.76 \times 10^{-8} < [Eosina-Y] < 1.50 \times 10^{-7}$	$6.23 \times 10^{-8} < [Eosina-Y] < 7.50 \times 10^{-7}$

En la tabla 3.3.4.3 se muestran los 4 intervalos dinámicos para las  $\lambda_{ex}$  y  $\lambda_{em}$  utilizadas, con la finalidad de proponer un intervalo donde coexistan y una concentración para el cálculo de valores pKa dentro de éste.

El nuevo intervalo dinámico lineal resulta ser de  $5.80 \times 10^{-8} < [Eosina-Y] < 1.0 \times 10^{-7} \text{ M}$  con una concentración de propuesta de  $7.5 \times 10^{-8} \text{ M}$ , donde hipotéticamente los valores de pKa calculados a partir de los espectros de emisión y excitación fluorescente con dicha concentración sean estadísticamente iguales con los calculados con los espectros de absorción.

Tabla 3.3.4.3. Conjunto de intervalos lineales de [Eosina-Y] a pH≈ 4.0 para cada par de longitudes de excitación y emisión.

$\lambda_{Ex}$ /nm	$\lambda_{Em}$ /nm	Intervalos de linealidad
<b>300</b>	500-620	$7.9 \times 10^{-9} < [Eosina-Y] < 3.0 \times 10^{-7}$ M
<b>340</b>	500-620	
<b>490</b>	500-620	$5.8 \times 10^{-8} < [Eosina-Y] < 1.0 \times 10^{-7}$ M
<b>515</b>	530-620	
<b>240</b>	500-620	$5.27 \times 10^{-8} < [Eosina-Y] < 3.0 \times 10^{-7}$ M
<b>410</b>	500-620	
<b>250</b>	500-620	$5.76 \times 10^{-8} < [Eosina-Y] < 1.50 \times 10^{-7}$ M
<b>210-525</b>	540	

### 3.4 Valoraciones por espectroscopia de UV-visible ácido-base concentración $1 \times 10^{-5}$ M

Teniendo en cuenta las condiciones de trabajo proporcionadas por las pruebas de estabilidad, se realizaron las valoraciones ácido-base. En el intervalo de longitud de onda 210 nm a 605 nm y de 370 nm a 605 nm.

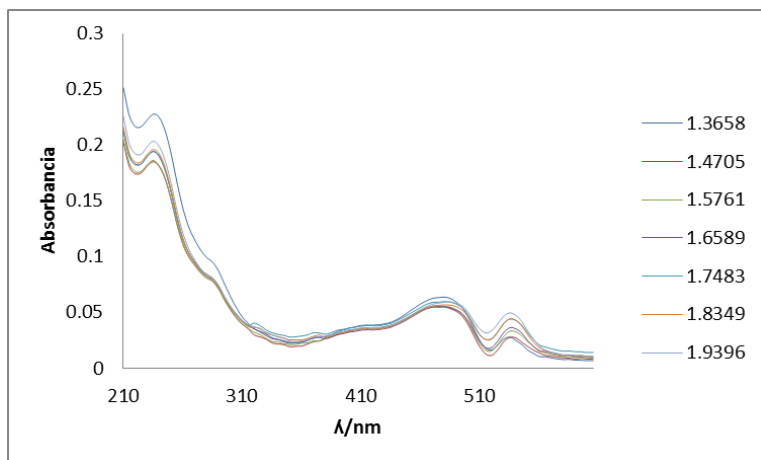
#### 3.4.1. Valoraciones por espectroscopia de UV-visible ácido-base para $210 \text{ nm} < \lambda < 605 \text{ nm}$

En el conjunto figuras 3.4.1.1 se muestra la familia de espectros para la concentración de  $1 \times 10^{-5}$  M separados por la predominancia de cada una de las 3 especies de Eosina-Y (figura a-c) de acuerdo a diagrama de distribución y la mezcla de estas (figura d), de la cual se muestra algunos valores de pH. El pH de trabajo es de  $1.3658 < \text{pH} < 4.9862$ , contemplando la zona del ultravioleta, la mayoría de los valores del absorbancia están dentro del intervalo en el cual los errores de lectura son menores.

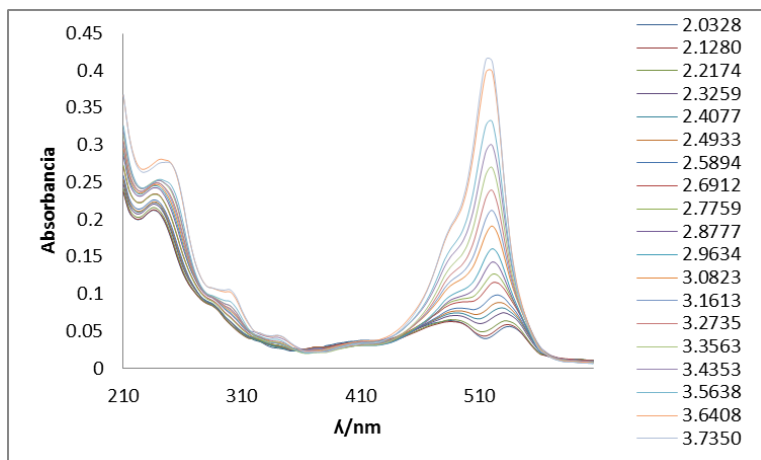
El comportamiento de las señales representativas del espectro de absorción, son similares a la descripción de la sección 3.1. Sin embargo, difieren en una señal localizada en 540 nm apareciendo a pH inicial de 1.3658 (figura 3.4.1.1). Para la figura 1.2.1 dicha señal aparece por primera vez a pH=1.732 a la longitud de onda de 520 nm. La señal en 540 nm presenta un comportamiento idéntico a la longitud de 520 nm de la figura 1.2.1, es decir, un

comportamiento batocrómico y un efecto hipsocrómico hasta  $\lambda = 515$  nm conforme el valor del pH incrementa.

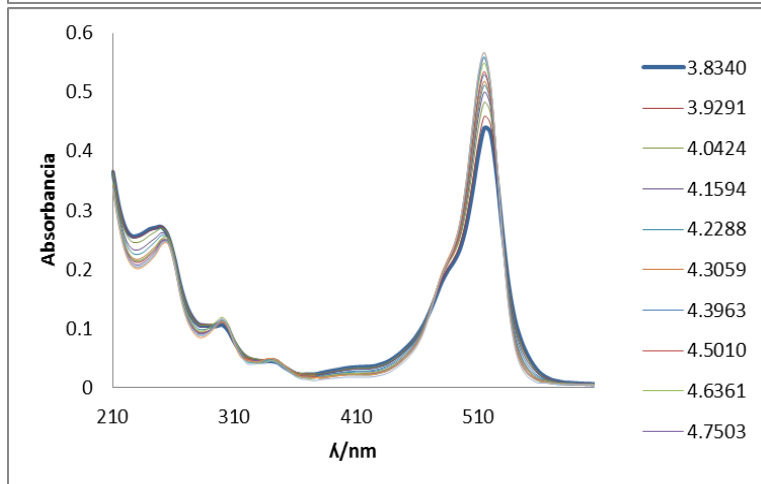
La solución inicial es incolora por la predominancia de la especie neutra  $H_2EY$  y conforme el valor del pH incrementa se va tornando rosada y anaranjada al estar presente  $EY^{2-}$ .



a)

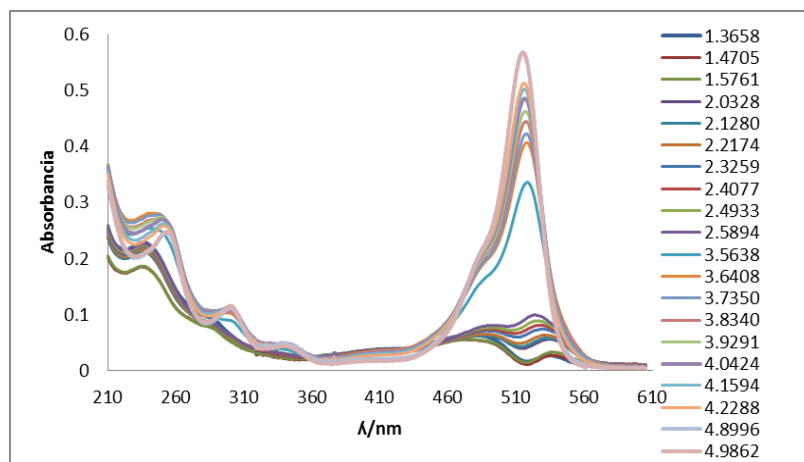


b)



c)





d)

Figura 3.4.1.1 Espectros de absorción de  $[Eosina-Y]=1.0 \times 10^{-5} M$  a diferentes valores de pH: a)  $1.3658 < pH < 1.9396$  b)  $2.0328 < pH < 3.7350$  c)  $2.0328 < pH < 3.7350$  d)  $1.3658 < pH < 4.9862$

En el conjunto de figuras 3.4.1.1, se puede observar que no todas las líneas pasan por un punto isobéptico, las intersecciones difieren conforme predomina cada una de las tres especies de Eosina-Y en el sistema.

En la ampliación de la figura d) de la sección del espectro visible (figura 3.4.1.2.a) y la zona del ultravioleta (figura 3.4.1.2.b), se observa de igual manera que las líneas no pasan por un punto isobéptico. Las intersecciones incrementan principalmente por el efecto batocrómico de la  $\lambda=240 \text{ nm}$  cuando comienza a ser predominante  $EY^{2-}$ .

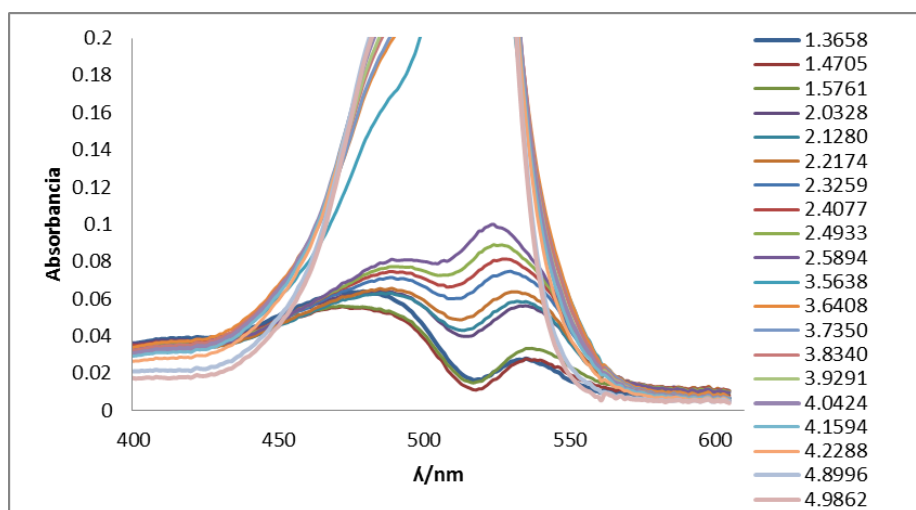


Figura 3.4.1.2.a Ampliación de los espectros de absorción de  $[Eosina-Y]=1.0 \times 10^{-5} M$ , en el intervalo de  $400 \text{ nm} < \lambda < 605 \text{ nm}$

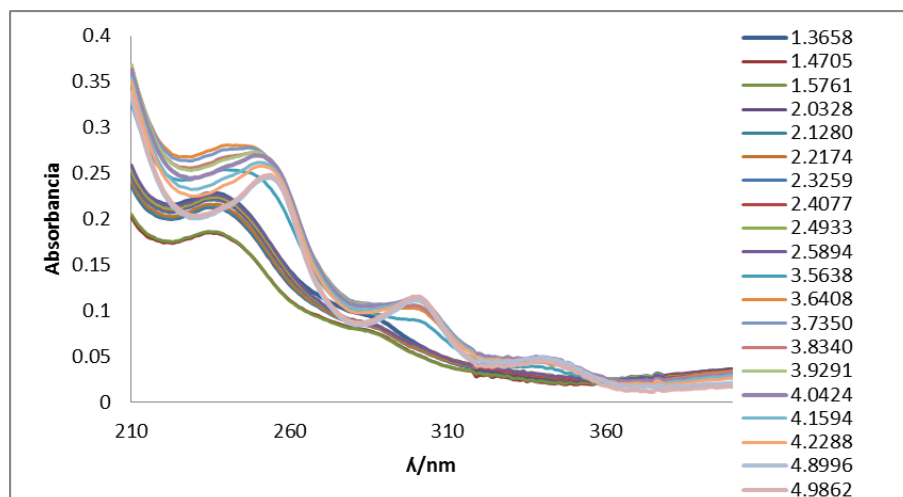


Figura 3.4.1.2.b. Ampliación de los espectros de absorción de  $[Eosina-Y]=1.0 \times 10^{-5} M$ , en el intervalo de  $210\text{nm} < \lambda < 400\text{nm}$

En la figura 3.4.1.3 se muestra los cambios de absorbancia con respecto al pH a dos longitudes de onda máxima del espectro visible para la familia de espectros obtenidos.

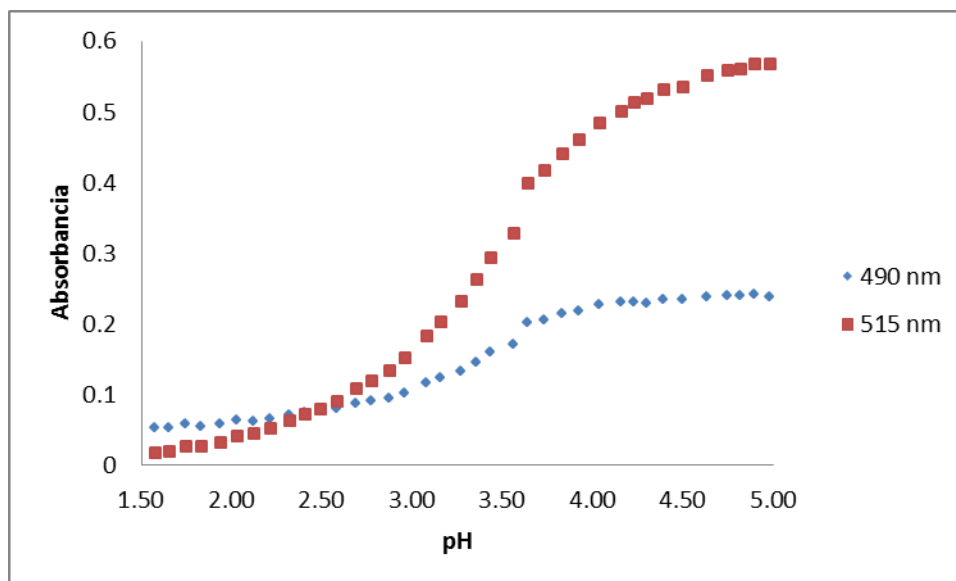


Figura 3.4.1.3. Absorbancia vs pH a dos longitudes de onda, en el intervalo  $1.3658 < pH < 4.9862$

Para ambas longitudes de onda, se observan dos sigmoides. Se espera un pka en la zona más ácida entre 2.0-3.0 y otro entre 3.5-4.5. Los valores de absorbancia son cercanos en el intervalo de pH de 2.3259-2.5894.

### 3.4.1.1 Determinación de valores de pKa utilizando SQUAD

Con la información de la familia de espectros de absorción y el programa computacional SQUAD para el refinamiento de las constantes de acidez, se calculan los valores de pKa.

El programa fue alimentado con 39 espectros comprendidos en el intervalo de pH entre  $1.3658 < \text{pH} < 4.9862$ , en el intervalo de longitud de onda de 210 nm a 605 nm, utilizando un modelo de dos equilibrios representado en la tabla 3.4.1.1.1.

Tabla 3.4.1.1.1. Valores de pKa obtenidos con SQUAD en el intervalo de 210-605 nm

Espectros de	Equilibrio	$\text{pK}_{a_i} \pm \sigma^*$	$\sigma_{\text{reg}}^{**}$
Absorción	$H_2EY \rightleftharpoons HEY^- + H^+$	$\text{pK}_{a1} = 3.355 \pm 0.024$	0.0050
	$HEY^- \rightleftharpoons EY^{2-} + H^+$	$\text{pK}_{a2} = 3.859 \pm 0.017$	

\*  $\sigma$  representa la desviación estándar de cada constante de equilibrio

\*\*  $\sigma_{\text{reg}}$  representa la desviación estándar de la regresión

De acuerdo a la tabla 3.4.1.1.1, el valor de pKa2 no es afectado por el valor de la concentración utilizada ni mucho menos de la señal que aparece en  $\lambda = 540$  nm si se compara con Batistela (2011). Sin embargo, el pKa1 está siendo afectado por la concentración o el intervalo de barrido dando un valor excesivo. El valor de pKa1 es comparable con el obtenido por Pierre Levillain (1985) con valor de  $3.25 \pm 0.05$  (tabla 1.2.1) a la misma concentración de  $10^{-5}$  M, pero en la familia de espectros de absorción no se presenta la señal de 540 nm de la figura 3.4.1.2.d y el intervalo de longitud de onda es de 400-550 nm (espectro visible).

### 3.4.1.2 Bondad del cálculo

En la figura 3.4.1.2.1 se muestran los espectros de absorción experimentales y los construidos con SQUAD (espectros teóricos) a partir de los valores de  $\log \beta$  y los coeficientes de absorptividad proporcionados, con el fin de evaluar el modelo teórico.

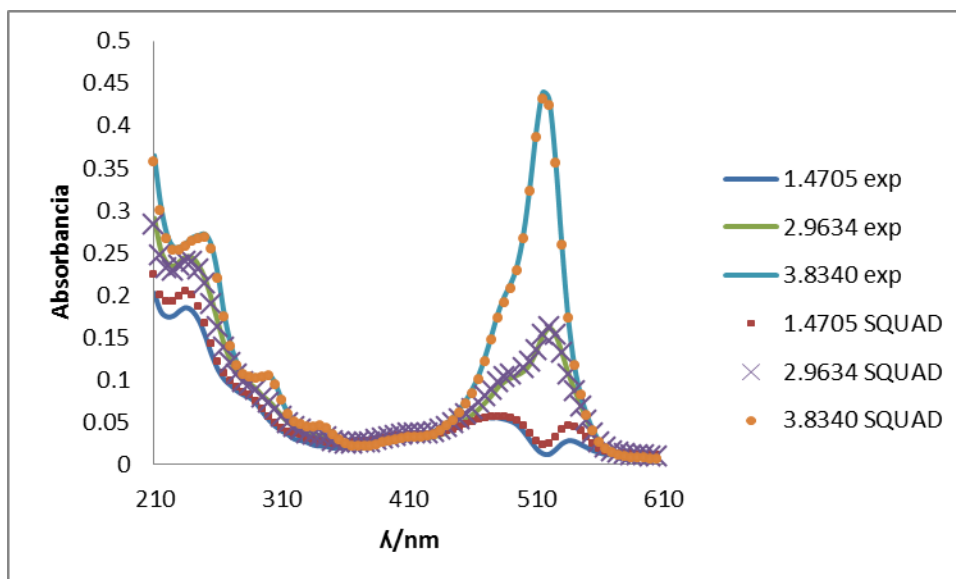


Figura 3.4.1.2.1. Espectros de absorción construidos con los datos de SQUAD (marcadores) y experimentales (línea sólida) para algunos valores de pH

Los espectros teóricos son superponibles a los espectros experimentales, lo que indica un buen ajuste. Sin embargo, hay desfase en el espectro de la zona más ácida en el intervalo de 210nm-255nm y 510nm-560nm. En general el ajuste es bueno pero el valor de pKa1 es poco confiable.

### 3.4.2.1 Valoraciones por espectroscopia de UV-visible ácido-base para $370\text{nm} < \lambda < 605\text{nm}$

Se repitió la experimentación omitiendo las señales del ultravioleta proponiendo un intervalo de longitud de onda de 370nm-605nm, con el fin de evaluar si se presenta efecto al excluir la señal en 240 nm.

En la figura 3.4.2.1.1 se muestra la familia de espectros para la concentración de  $1 \times 10^{-5}$  M en una zona comprendida entre  $1.3640 < \text{pH} < 4.9818$ . La señal en 540 nm no aparece lo que podría ser una posible contaminación en la muestra de la sección anterior.

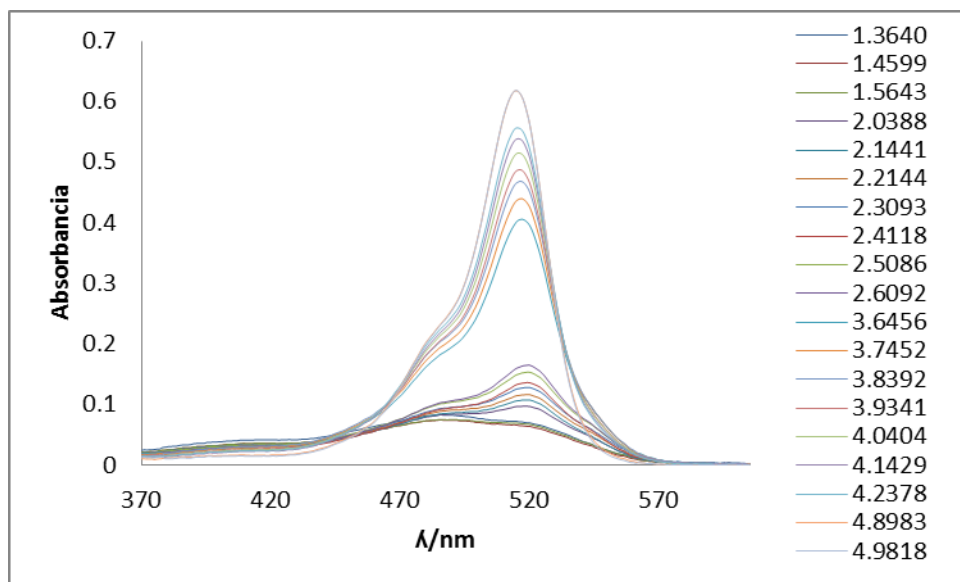


Figura 3.4.2.1.1 Espectros de absorción de  $[Eosina-Y]=1.0 \times 10^{-5} M$  a diferentes valores de  $pH$

En la ampliación (figura 3.4.2.1.2) se observa de igual manera que las líneas no pasan por un punto isobéptico. Las intersecciones incrementan principalmente por el efecto hipsocrómico de la  $\lambda=520 \text{ nm}$  a  $515 \text{ nm}$  cuando comienza a ser predominante  $EY^{2-}$ .

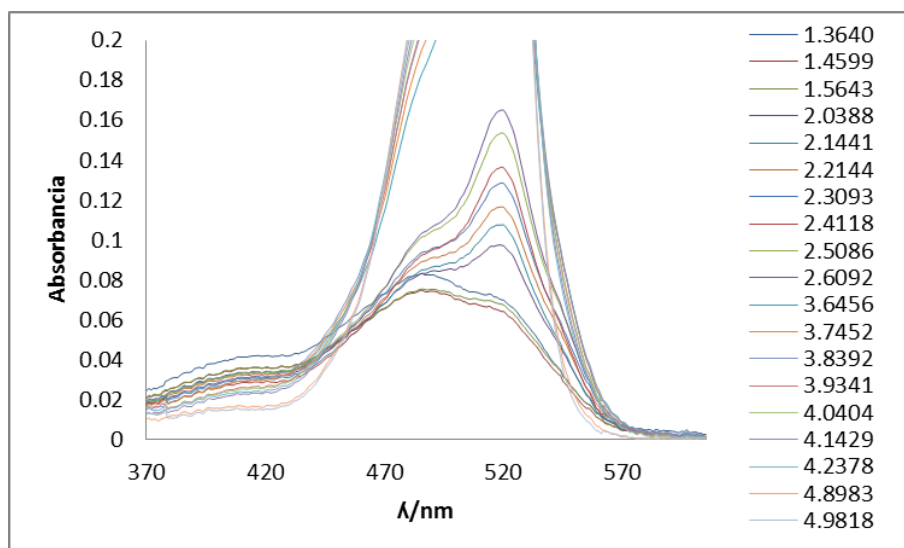


Figura 3.4.2.1.2. Ampliación de los espectros de absorción de  $[Eosina-Y]=1.0 \times 10^{-5} M$ , en el intervalo de  $370 \text{ nm} < \lambda < 605 \text{ nm}$

En la figura 3.4.2.1.3 se muestra los cambios de absorbancia con respecto al  $pH$  a dos longitudes de onda máxima del espectro visible para la familia de espectros obtenidos.

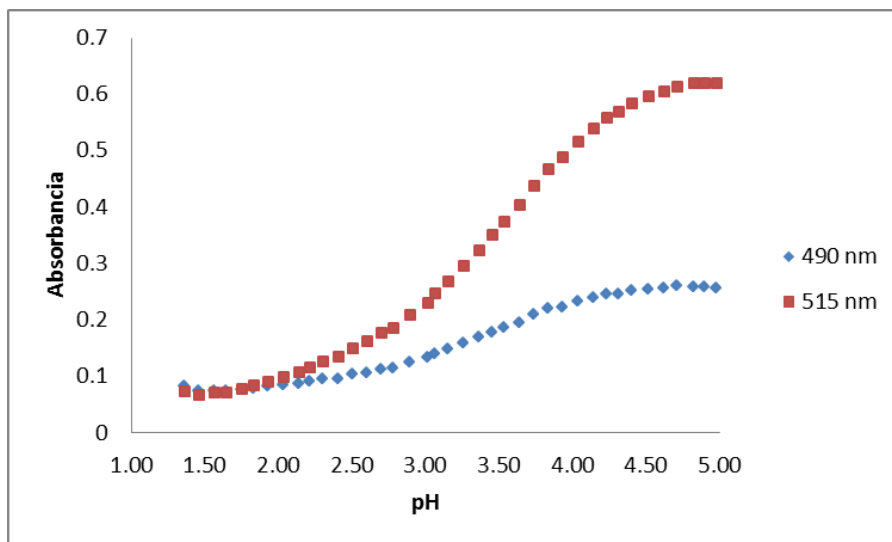


Figura 3.4.2.1.3. Absorbancia vs pH a dos longitudes de onda, en el intervalo  $1.3640 < \text{pH} < 4.9818$

Para ambas longitudes de onda, se observan dos sigmoides. Se espera un pKa en la zona más ácida entre 1.5-3.0 y otro entre 3.5-4.5.

### 3.4.2.2 Determinación de valores de pKa utilizando SQUAD

Con la información de la familia de espectros de absorción y el programa computacional SQUAD para el refinamiento de las constantes de acidez, se calculan los valores de pKa.

El programa fue alimentado con 39 espectros comprendidos en el intervalo de pH entre  $1.3640 < \text{pH} < 4.9818$ , en el intervalo de longitud de onda de 370 nm a 605 nm, utilizando un modelo de dos equilibrios representado en la tabla 3.4.2.2.1.

Tabla 3.4.2.2.1 Valores de pKa obtenidos con SQUAD en el intervalo de 370-605 nm

Espectros de	Equilibrio	$\text{pK}_{a_i} \pm \sigma^*$	$\sigma_{\text{reg}}^{**}$
Absorción	$\text{H}_2\text{EY} \rightleftharpoons \text{HEY}^- + \text{H}^+$	$\text{pK}_{a1} = 3.026 \pm 0.020$	0.0030
	$\text{HEY}^- \rightleftharpoons \text{EY}^{2-} + \text{H}^+$	$\text{pK}_{a2} = 3.871 \pm 0.010$	

\*  $\sigma$  representa la desviación estándar de cada constante de equilibrio

\*\*  $\sigma_{\text{reg}}$  representa la desviación estándar de la regresión

Por otro lado, los valores de pKa mostrados en la tabla 3.4.2.2.1 especialmente el pKa1 sigue siendo elevado a la concentración de  $1 \times 10^{-5}$  M pero es compatible con el reportado

por Hansen (1973) (tabla 1.2.1) y menor que el calculado en el intervalo de 210nm-605nm. El valor del pKa2 no sufre efecto por el cambio de barrido de  $\lambda$ . Parece indicar que el cambio de intervalo de obtención de la familia de espectros de la figura 3.4.2.1.1 no es el efecto principal sobre los pKas.

### 3.4.2.3 Bondad del cálculo

En la figura 3.4.2.3.1 se muestran los espectros de absorción experimentales y los construidos con SQUAD (espectros teóricos) a partir de los valores de  $\log\beta$  y los coeficientes de absorptividad proporcionados, con el fin de evaluar modelo teórico.

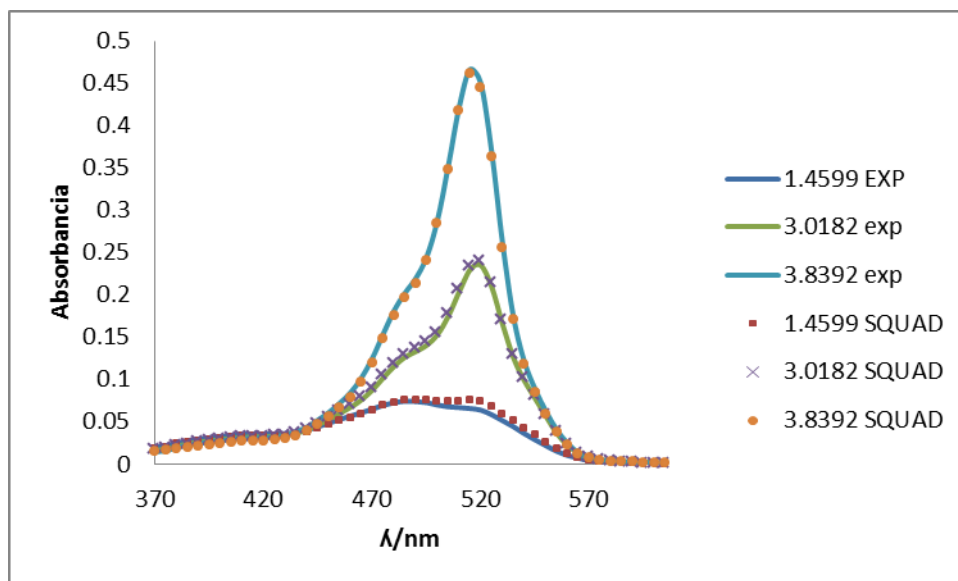


Figura 3.4.2.3.1 Espectros de absorción construidos con los datos de SQUAD (marcadores) y experimentales (línea sólida) para algunos valores de pH

Los espectros teóricos son superponibles a los espectros experimentales, lo que indica un buen ajuste. Se presenta una ligera desviación 510nm-530nm en el espectro de la zona más ácida en el intervalo, que muestra una señal mayor esperada. En general el ajuste es bueno pero el valor de pKa1 parece ser un valor dudoso.

La desviación en el rango de 510nm-530nm a pH=1.4599 cuando la especie H<sub>2</sub>EY es predominante, su espectro experimental presenta una menor respuesta de la esperada por el espectro teórico. Es posible que la fracción correspondiente al tautómero no sea despreciable a la concentración de trabajo utilizada y al alimentar SQUAD esto no está siendo considerada, lo que conlleva a disminuir la concentración de trabajo para despreciar la contribución del tautómero. La disminución de la concentración provoca mediciones de absorbancia que no estarán en el intervalo de  $0.2 < A < 1$ , principalmente

cuando la especie neutra  $H_2EY$  predomine en el sistema ( $pH < 2.4$ ) debido que es prácticamente incolora.

### 3.5.1 Valoraciones por espectroscopia de UV-visible ácido-base concentración $2.5 \times 10^{-6} M$

En la figura 3.5.1.1 se muestra la familia de espectros para la concentración de  $2.5 \times 10^{-6} M$  para algunos valores de pH. El pH de trabajo es  $1.4770 < pH < 4.4090$ , contemplando la zona del ultravioleta. El ruido atribuido a la señal de 340 nm a  $pH < 3.8$ , se debe a que no predomina de la especie  $EY^{2-}$ .

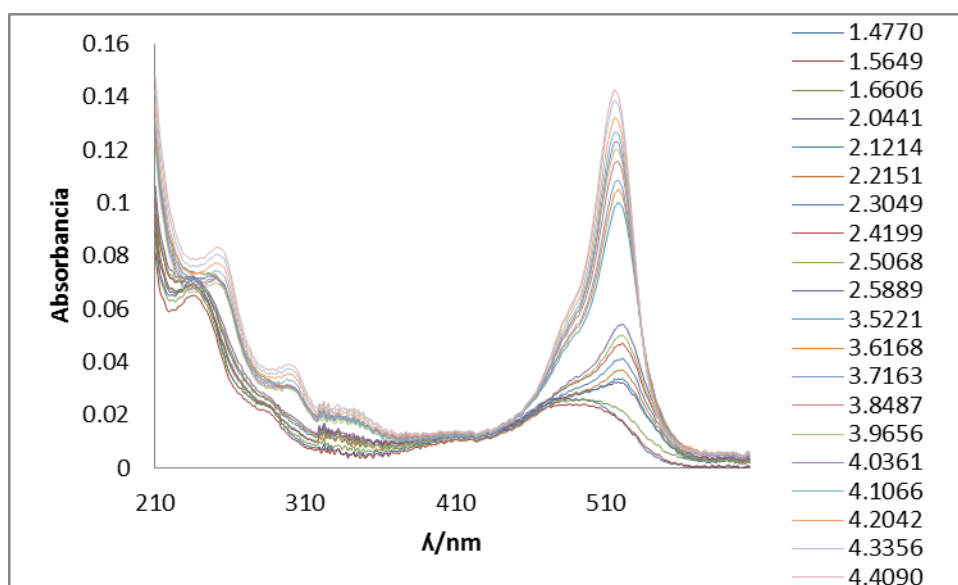


Figura 3.5.1.1 Espectros de absorción de  $[Eosina-Y] = 2.5 \times 10^{-6} M$  a diferentes valores de pH.

En cuestión de los puntos isobécticos, las líneas no pasan por un único punto teniendo un comportamiento similar a la concentración de  $1 \times 10^{-5} M$ .

En la figura 3.5.1.2 se muestran los cambios de absorbancia con respecto al pH a dos longitudes de onda máxima del espectro visible para la familia de espectros obtenidos.

Para ambas longitudes de onda, se esperaría observar dos sigmoides como lo fue para la concentración de  $1 \times 10^{-5} M$ . Sin embargo, no tienen el mismo perfil debido a la concentración baja que se utilizó.



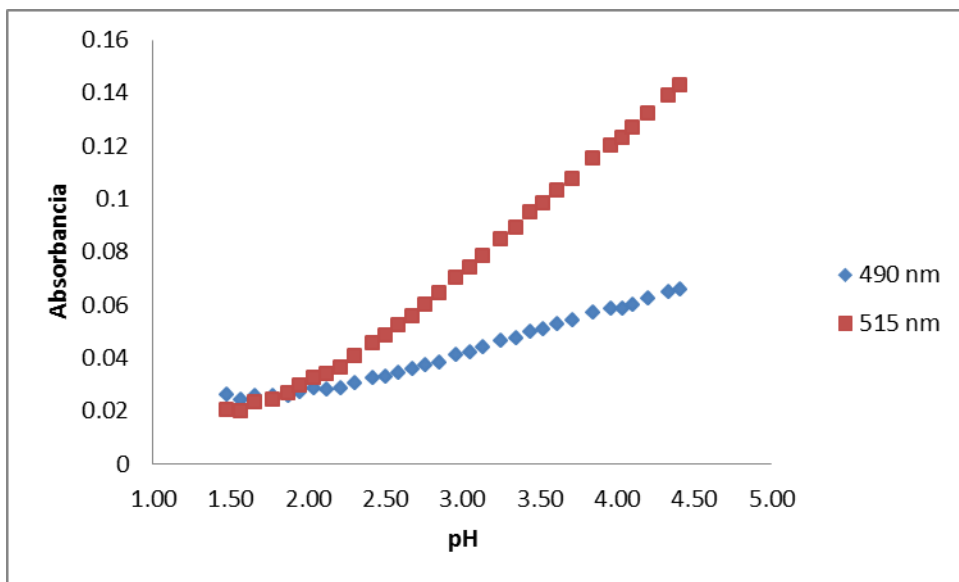


Figura 3.5.1.2 Absorbancia vs pH a dos longitudes de onda, en el intervalo  $1.4770 < \text{pH} < 4.4090$

### 3.5.2 Determinación de valores de pka utilizando SQUAD

Con la información de la familia de espectros de absorción y el programa computacional SQUAD para el refinamiento de las constantes de acidez, se calculan los valores de pKa.

El programa fue alimentado con 32 espectros comprendidos entre el intervalo de pH entre  $1.4770 < \text{pH} < 4.4090$ , utilizando un modelo de dos equilibrios representado en la tabla 3.5.2.1.

Tabla 3.5.2.1 Valores de pKa obtenidos con SQUAD en el intervalo de 210-605 nm

Espectros de	Equilibrio	$\text{pK}_{a_i} \pm \sigma^*$	$\sigma_{\text{reg}}^{**}$
Absorción	$\text{H}_2\text{EY} \rightleftharpoons \text{HEY}^- + \text{H}^+$	$\text{pK}_{a1} = 2.416 \pm 0.047$	0.0019
	$\text{HEY}^- \rightleftharpoons \text{EY}^{2-} + \text{H}^+$	$\text{pK}_{a2} = 3.801 \pm 0.027$	

\*  $\sigma$  representa la desviación estándar de cada constante de equilibrio

\*\*  $\sigma_{\text{reg}}$  representa la desviación estándar de la regresión

De acuerdo a la tabla 3.5.2.1, el valor de pKa2 no es afectado por el valor de la concentración utilizada comparado con  $1 \times 10^{-5}$  M a pesar de la contribución del barrido de la zona del ultravioleta.

El valor de pka1 disminuyó notablemente hasta un valor cercano a bastistela (2011). Parece ser que la fracción del tautómero por parte de  $\text{H}_2\text{EY}$  es despreciable, lo que conlleva a que la concentración de trabajo utilizada y alimentada en SQUAD es la original.

En la tabla 3.5.2.2, se muestra el promedio de 12 repeticiones siendo reproducible el valor de los pKas de la tabla 3.5.2.1.

Tabla 3.5.2.2 Valores de pKa obtenidos con SQUAD en el intervalo de 210-605 nm

Espectros de	Equilibrio	$pK_{ai} \pm \sigma^*$
Absorción	$H_2EY \rightleftharpoons HEY^- + H^+$	$pK_{a1} = 2.401 \pm 0.065$
	$HEY^- \rightleftharpoons EY^{2-} + H^+$	$pK_{a2} = 3.809 \pm 0.084$

\*  $\sigma$  representa la desviación estándar de cada constante de equilibrio

### 3.5.3. Bondad del cálculo

En la figura 3.5.3.1 se muestran los espectros de absorción experimentales y los construidos con SQUAD (espectros teóricos) a partir de los valores de  $\log \beta$  y los coeficientes de absorptividad proporcionados en la experimentación relacionada con la tabla 3.5.2.1., con el fin de evaluar el modelo teórico.

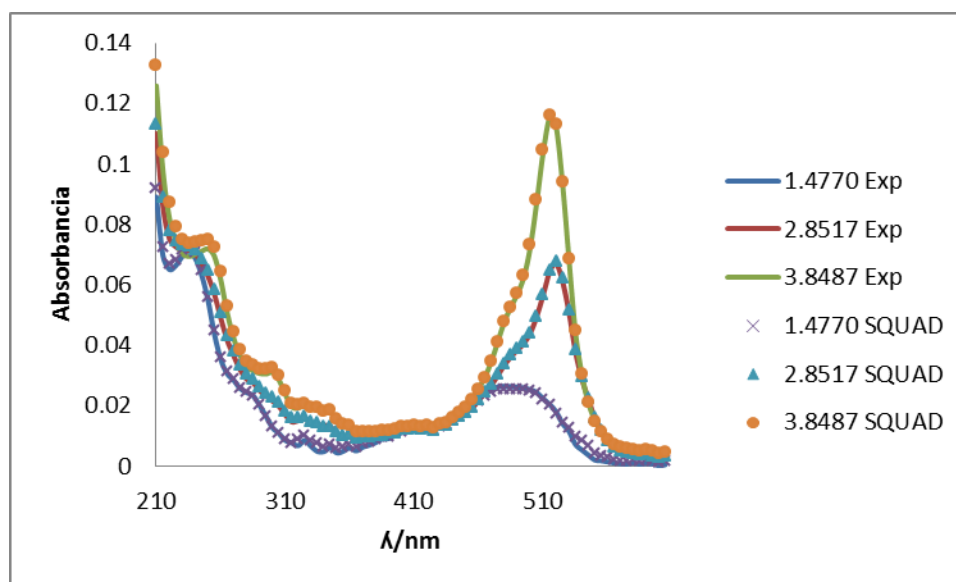


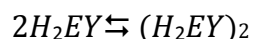
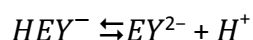
Figura 3.5.3.1. Espectros de absorción construidos con los datos de SQUAD (marcadores) y experimentales (línea sólida) para algunos valores de pH

Los espectros teóricos son superponibles a los espectros experimentales, lo que indica un buen ajuste. Las desviaciones mencionadas en la zona del ultravioleta en secciones anteriores, no se presentan. Lo que conlleva a que los valores de pKa calculados son más confiables.

### 3.5.4 Discusión de valoraciones por espectroscopia de UV-visible acido-base

El cálculo del valor de pka2, considerando y no así la zona del ultravioleta a la concentración de  $1 \times 10^{-5}$  M. Resulta un valor reproducible y compatible con la mayoría de los valores reportados. Sin embargo, se presenta una discrepancia del valor del pKa1 a las mismas condiciones del intervalo de barrido y principalmente a la elevada concentración, que favorece el proceso de la precipitación de H<sub>2</sub>EY por la transformación del zwitterion en la forma de lactona. La precipitación se da por primera instancia por la formación de agregados: dímeros, trímeros, ect. Por ello, se contempla en el programa computacional SQUAD un equilibrio de dimerización de la especie H<sub>2</sub>EY para el cálculo de su logaritmo de formación global, se obtienen las fracciones de las especies con el programa MEDUSA y se evalúa el ajuste.

El programa fue alimentado con 39 espectros comprendidos entre el intervalo de pH entre  $1.3640 < \text{pH} < 4.9818$  de la figura 3.4.1.b.1, utilizando un modelo de tres equilibrios representado a continuación:



Los valores de pKa utilizados son los representados en la tabla 3.5.2.2 los cuales fueron fijados en el programa computacional SQUAD. Además se fijó el valor el coeficiente de absorptividad de la especie H<sub>2</sub>EY con valores siguientes, este proviene de la concentración de  $2.5 \times 10^{-6}$  M:

Longitud de onda /nm	$\epsilon_{H_2EY}^{(\lambda)}$ (M <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> )	Longitud de onda /nm	$\epsilon_{H_2EY}^{(\lambda)}$ (M <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> )
370	2.82E+03	490	8.99E+03
375	3.01E+03	495	8.87E+03
380	3.28E+03	500	8.43E+03
385	3.69E+03	505	7.75E+03
390	3.77E+03	510	6.29E+03
395	4.18E+03	515	4.73E+03
400	4.45E+03	520	3.15E+03
405	4.80E+03	525	1.94E+03
410	4.86E+03	530	1.89E+03
415	4.82E+03	535	1.40E+03

420	4.78E+03	540	1.47E+03
425	4.67E+03	545	1.30E+03
430	5.15E+03	550	7.16E+02
435	5.36E+03	555	6.80E+02
440	5.90E+03	560	6.66E+02
445	6.41E+03	565	5.29E+02
450	6.94E+03	570	5.09E+02
455	7.49E+03	575	5.19E+02
460	8.33E+03	580	6.68E+02
465	9.01E+03	585	5.34E+02
470	9.39E+03	590	7.11E+02
475	9.50E+03	595	4.68E+02
480	9.35E+03	600	3.20E+02
485	9.15E+03	605	5.73E+02

En la tabla siguiente se muestra el valor del logaritmo de formación global para el posible dímero:

Espectros de	Equilibrio	Log $\beta_{D1} \pm \sigma^*$	$\sigma_{reg}^{**}$
Absorción	$2H_2EY \rightleftharpoons H_4EY_2$	Log $\beta_{D1} = 17.912 \pm 0.021$	0.00044

\*  $\sigma$  representa la desviación estándar de cada constante de equilibrio

\*\*  $\sigma_{reg}$  representa la desviación estándar de la regresión

En la figura 3.5.4.1 se muestra el diagrama de distribución construido a partir de las fracciones proporcionadas por el programa MEDUSA a la concentración de  $1 \times 10^{-5}$  M.

Bajo el modelo de tres equilibrios, la especie predominante al pH inicial de trabajo es el dímero  $(H_2EY)_2$  y no  $H_2EY$ , lo que podría indicar que el modelo va acorde con la presencia de un equilibrio de más en el sistema.

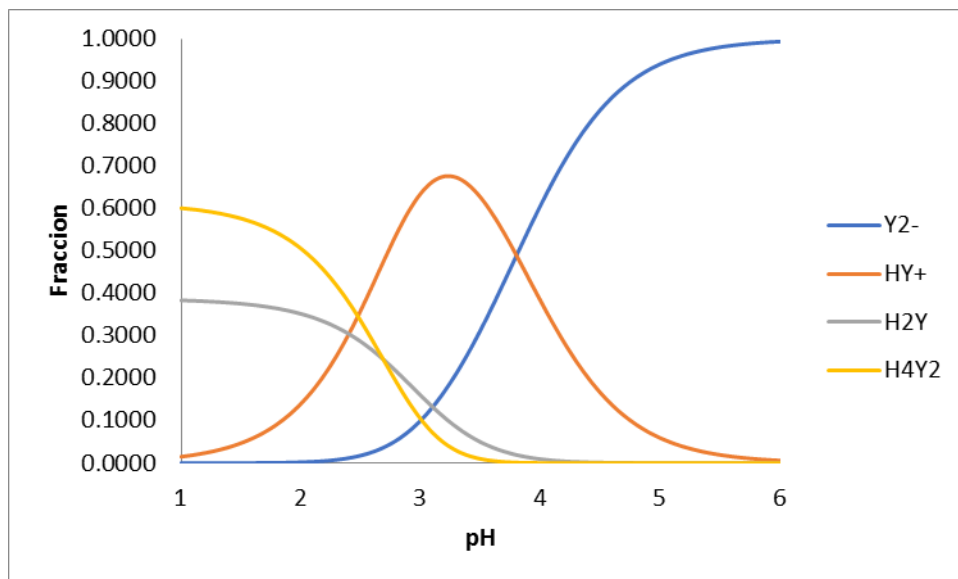


Figura 3.5.4.1 Diagrama de distribución de las especies de Eosina Y como función del pH. Fracciones proporcionadas por el programa MEDUSA a concentración  $1 \times 10^{-5}$  M.

En la figura 3.5.4.2 se muestran los espectros de absorción experimentales y los construidos a partir de los coeficientes de absorción de SQUAD (espectros teóricos) y las fracciones proporcionadas por MEDUSA a la concentración del sistema a valores de pH de 1.4599, 3.02182, 3.8392; que corresponden a  $9.48 \times 10^{-6}$ ,  $7.98 \times 10^{-6}$  y  $7.59 \times 10^{-6}$  M. Concentraciones dadas por el efecto de dilución conforme el valor del pH se incrementaba.

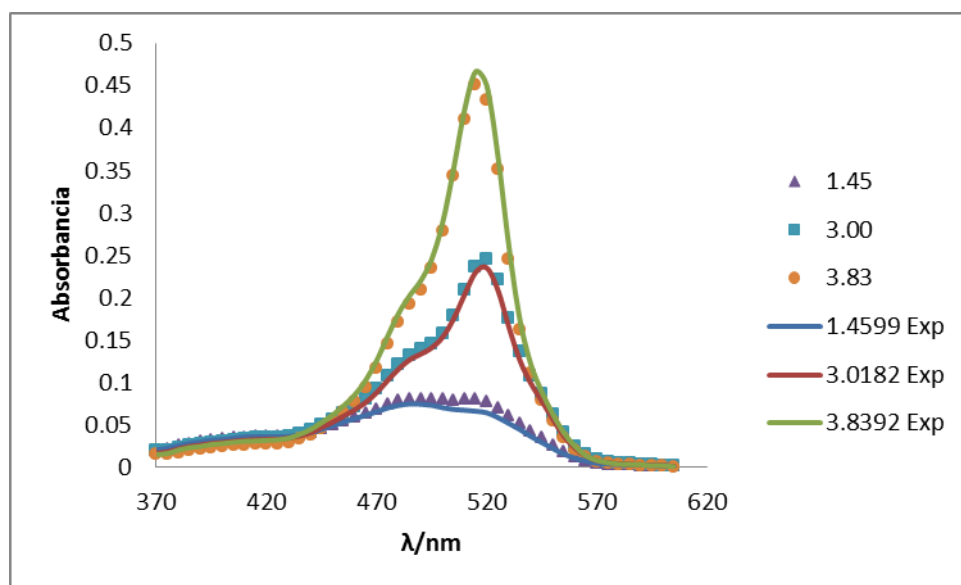


Figura 3.5.4.2. Espectros de absorción construidos con los coeficientes de absorción de SQUAD (marcadores) y experimentales (línea sólida) para algunos valores de pH

Los espectros teóricos son superponibles en la mayor zona de los espectros experimentales, lo que indica un buen ajuste. Se presenta una ligera desviación 510nm-530nm en el espectro de la zona más acida en el intervalo, caso semejante a la figura 3.4.3.b.1. El ajuste no mejoró notablemente a pesar del modelo de 3 equilibrios, lo cual no apoya la existencia del dímero.

El comportamiento de los espectros a concentración de  $1 \times 10^{-5}$  M bajo un modelo de tres equilibrios, parece no ser suficiente para que el ajuste de los espectros teóricos a los experimentales sea bueno, efecto dado por la precipitación o posiblemente por formación del dímero. Por ello, al disminuir la concentración a  $2.5 \times 10^{-6}$  M la fracción del dímero disminuye (figura 3.5.4.3) y el ajuste de los espectros teóricos contra los experimentales es bueno (figura 3.5.3.1).

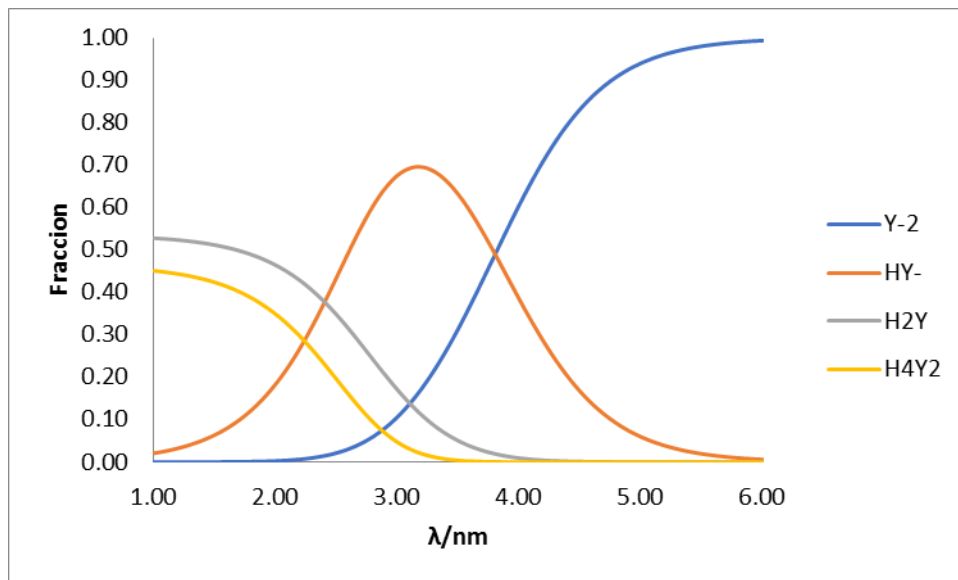


Figura 3.5.4.3 Diagrama de distribución de las especies de Eosina Y como función del pH. Fracciones proporcionadas por el programa MEDUSA a la concentración  $2.5 \times 10^{-6}$  M

### 3.6 Valoraciones por espectroscopia de fluorescencia ácido-base

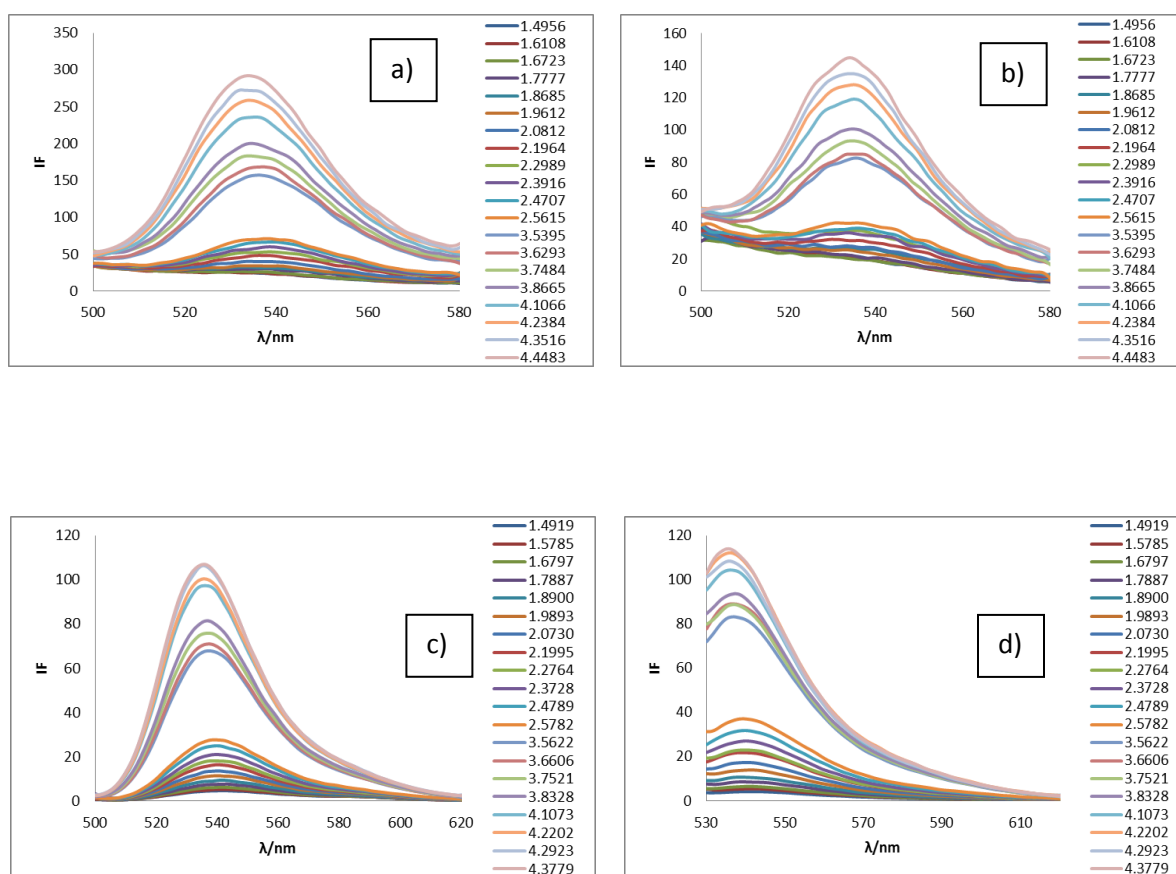
#### 3.6.1 Longitud de excitación 300, 340, 490, 515, 240, 410 y 250 nm.

En el conjunto de figuras 3.6.1.1 se muestra la familia de espectros de emisión para la concentración de  $7.5 \times 10^{-8}$  M en una zona comprendida en general de  $1.4 < \text{pH} < 4.5$ , en el conjunto de figuras 3.6.1.1 se muestra solo algunos valores de pH.

Cada espectro de emisión fluorescente tiene un máximo que varía entre 535 nm y 536 nm y comportamiento similar, la intensidad de fluorescencia (IF) se incrementa a medida con el valor del pH lo hace. Para las longitudes de excitación de 300, 340, y 410 nm la respuesta no tiene una buena definición, lo cual puede deberse a estas no son las adecuadas para poblar el estado electrónico excitado a comparación de las longitudes de 515 nm y 490 nm (máximos en espectros de absorción).

En los seis espectros de emisión fluorescente no se presenta algún punto isobéptico, debido que la técnica es selectiva y es posible que únicamente se esté observando mayormente el decaimiento de energía de una sola especie, la cual parece ser  $EY^{2-}$  debido al par electrónico libre del fenol y la parte benzoica.

La solución inicial es incolora por la predominancia de la especie neutra  $H_2EY$  y conforme el valor del pH incrementa se va tornando ligeramente rosada y anaranjada difícil de percibir



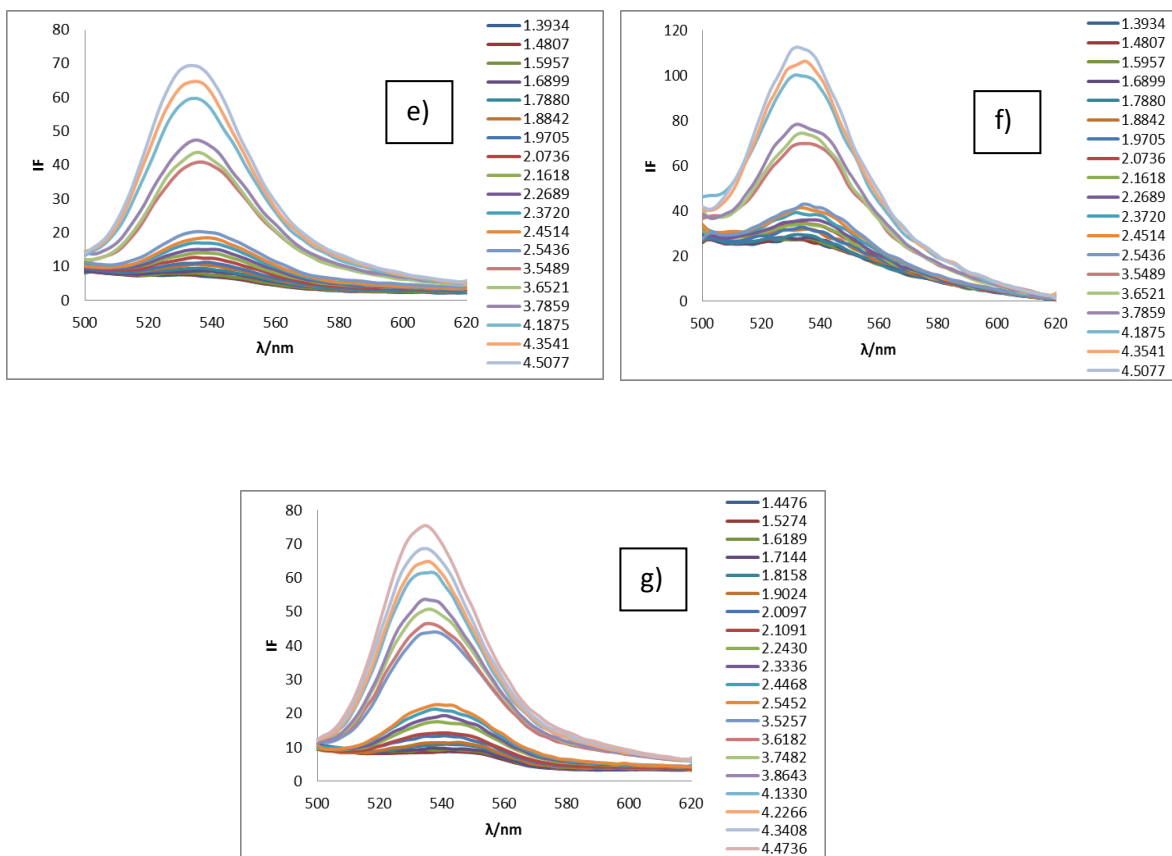
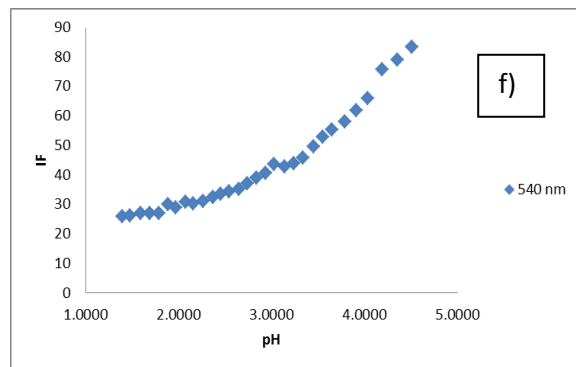
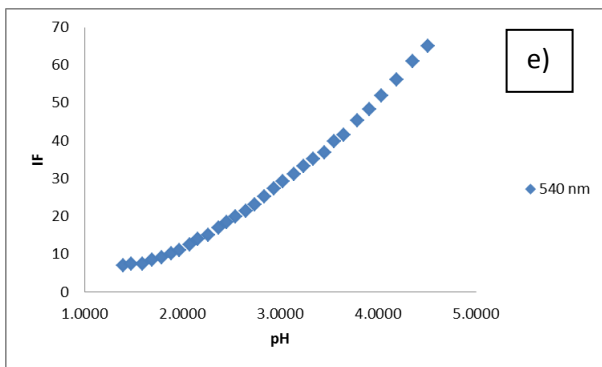
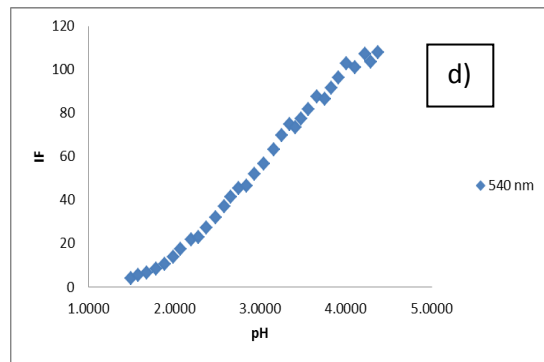
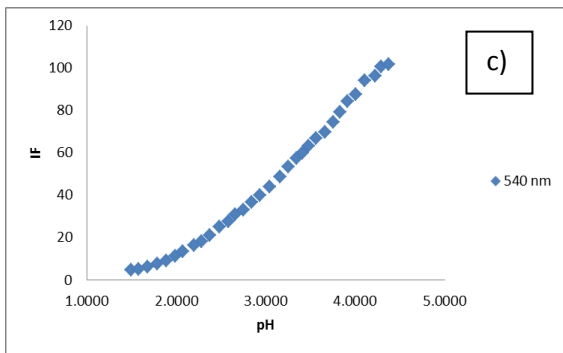
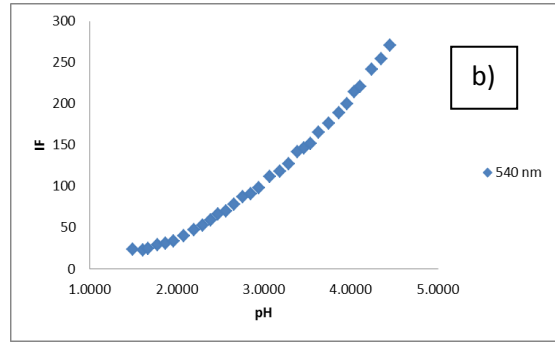
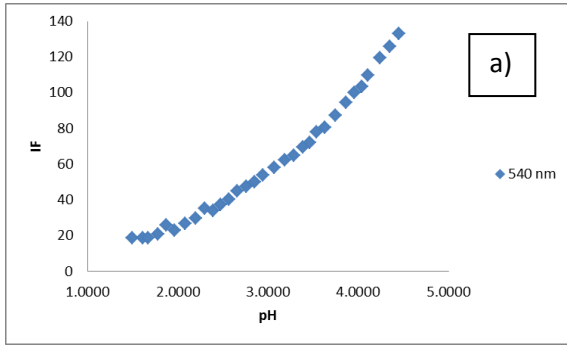


Figura 3.6.1.1. Espectros de emisión fluorescente de  $[Eosina-Y]=7.5 \times 10^{-8} M$  a diferentes valores de pH a longitud de excitación de: a) 300 nm b) 340 nm c) 490 nm d) 515 nm e) 240 nm f) 410 nm g) 250 nm

En la figura 3.6.1.2. se muestra los cambios de IF con respecto al pH a longitud de onda máxima de 540 nm del espectro de emisión fluorescente para la familia de espectros obtenidos.

Para cada  $\lambda_{Ex}$  se debería observar dos sigmoides. Sin embargo, no son fácilmente apreciables debido al bastante dilución de la concentración de Eosina-Y.





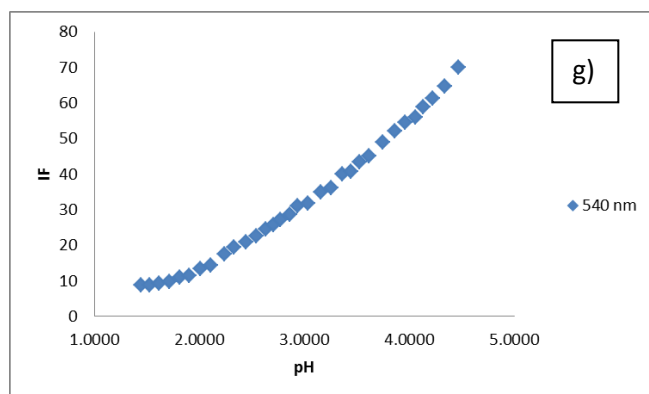


Figura 3.6.1.2. Intensidad de fluorescencia vs pH, en el intervalo general  $1.4 < \text{pH} < 4.5$  de:  
 a) 300 nm b) 340 nm c) 490 nm d) 515 nm e) 240 nm f) 410 nm g) 250 nm

### 3.6.2 Longitud de emisión 540 nm.

En el conjunto de figuras 3.6.2.1 se muestra la familia de espectros para la concentración de  $7.5 \times 10^{-8}$  M en una zona comprendida de  $1.4336 < \text{pH} < 5.0353$ . En el conjunto de figuras 3.6.2.1 se muestra solo algunos valores de pH

El comportamiento excitación fluorescente es similar a los espectros de emisión fluorescente, la intensidad de fluorescencia (IF) se incrementa a medida con el valor del pH lo hace. En dicho espectro, se presentan 4 señales localizadas en las longitudes de onda de 250, 300, 340 nm con un máximo en 515 nm.

En los espectros de excitación fluorescente no se presenta ningún punto isobéptico, debido que es posible que únicamente se esté observando el decaimiento de energía de una sola especie, cuya longitud de emisión de 540 nm es propia de ella, siendo esta  $EY^{2-}$ .

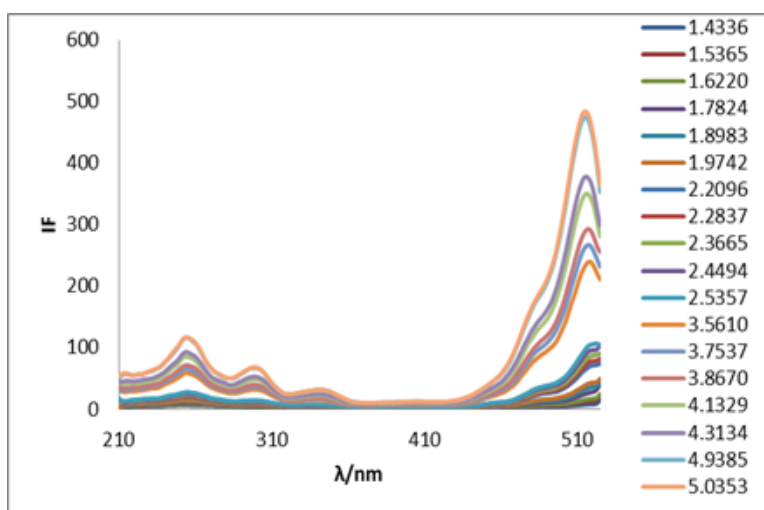


Figura 3.6.2.1 Espectros de excitación fluorescente de  $[Eosina-Y] = 7.5 \times 10^{-8}$  M a diferentes valores de pH

En la figura 3.6.2.2 se muestra los cambios de IF con respecto al pH a dos longitudes de onda máxima del espectro de excitación fluorescente para la familia de espectros obtenidos.

Para las longitudes de onda de 515nm y 490 nm, se observa un mejor perfil de las dos sigmoides que se esperarían ver como en el caso de la concentración de  $1 \times 10^{-5}$  M, a comparación de las construidas a partir de los espectros de emisión. Se espera un pKa en la zona más ácida entre 2.0-3.0 y otro entre 3.5-4.5.

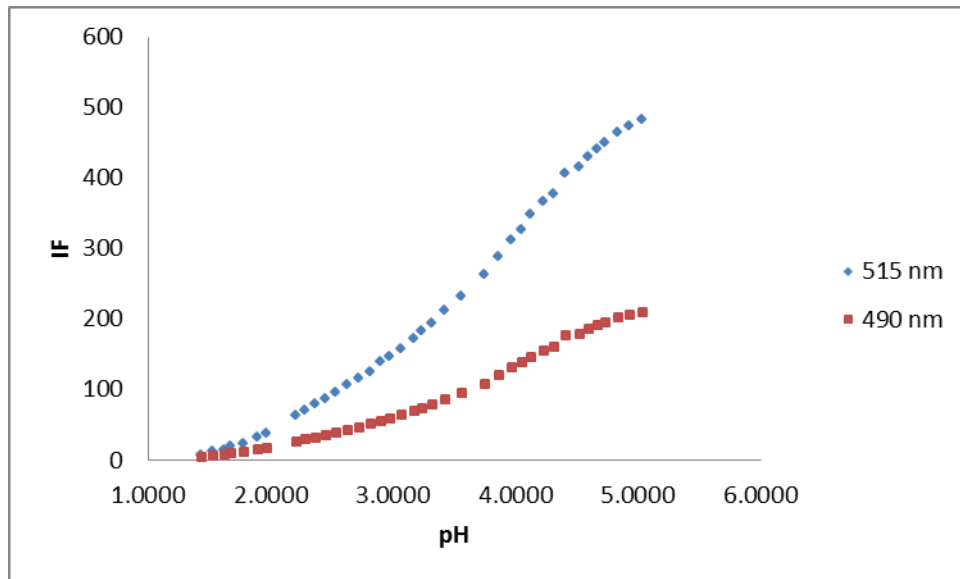


Figura 3.6.2.2. Intensidad de fluorescencia vs pH a dos longitudes de onda, en el intervalo  $1.4336 < \text{pH} < 5.0353$

### 3.6.3 Determinación de valores de pKa utilizando SQUAD

Con la información de la familia de espectros de emisión y excitación fluorescente y el programa computacional SQUAD para el refinamiento de las constantes de acidez, se calculan los valores de pKa.

El programa fue alimentado con por lo menos 30 espectros de emisión fluorescente o 38 espectros de excitación fluorescente, comprendidos entre el intervalo de pH de  $1.4 < \text{pH} < 4.5$  y  $1.4336 < \text{pH} < 5.0353$  respectivamente. Cada espectros de emisión y excitación fue dividido entre mil para simular una respuesta de absorción. Se utilizó un modelo de dos equilibrios y se obtienen los valores de pKa representados en la tabla 3.6.3.1.

En la tabla 3.6.3.2, se muestra el promedio de al menos 4 repeticiones de cálculo de los valores de pKa usando espectros de excitación fluorescente ya que estos valores no

fueron concluyentes al realizar el contraste con los obtenidos por los espectros de absorción.

De acuerdo a las tablas antes mencionadas, el valor del  $pK_{a1}$  que ha entrado en controversia por cuestiones de precipitación a concentraciones elevadas, oscila entre 2.4 y 2.5 calculado a una concentración en la cual se aminora dicha problemática.

Tabla 3.6.3.1. Valores de  $pK_a$  obtenidos con SQUAD a partir de espectros de emisión y excitación fluorescente

Espectro	$\lambda_{ex}/nm$	Equilibrio	$pK_{ai} \pm \sigma^*$	$\sigma_{reg}^{**}$
Emisión Fluorescente	300	$H_2EY \rightleftharpoons HEY^- + H^+$	$pK_{a1} = 2.496 \pm 0.026$ $pK_{a2} = 4.177 \pm 0.012$	0.0016
	340		$pK_{a1} = 2.263 \pm 0.085$ $pK_{a2} = 4.2666 \pm 0.0383$	0.0027
	490		$pK_{a1} = 2.541 \pm 0.016$ $pK_{a2} = 3.9386 \pm 0.008$	0.0004
	515	$HEY^- \rightleftharpoons EY^{2-} + H^+$	$pK_{a1} = 2.594 \pm 0.050$ $pK_{a2} = 3.7767 \pm 0.0291$	0.0009
	240		$pK_{a1} = 2.429 \pm 0.021$ $pK_{a2} = 4.1244 \pm 0.01$	0.0003
	410		$pK_{a1} = 2.240 \pm 0.041$ $pK_{a2} = 4.0803 \pm 0.018$	0.001
	250		$pK_{a1} = 2.41 \pm 0.030$ $pK_{a2} = 4.074 \pm 0.014$	0.0005
	$\lambda_{em}/nm$			
Excitación Fluorescente	540		$pK_{a1} = 2.473 \pm 0.007$ $pK_{a2} = 4.1047 \pm 0.0028$	0.0012

\*  $\sigma$  representa la desviación estándar de cada constante de equilibrio

\*\*  $\sigma_{reg}$  representa la desviación estándar de la regresión

Tabla 3.6.3.2. Valores de  $pK_a$  obtenidos con SQUAD en el intervalo de 210-525 nm

Espectros de	Equilibrio	$pK_{ai} \pm \sigma^*$
Excitación	$H_2EY \rightleftharpoons HEY^- + H^+$	$pK_{a1} = 2.483 \pm 0.014$

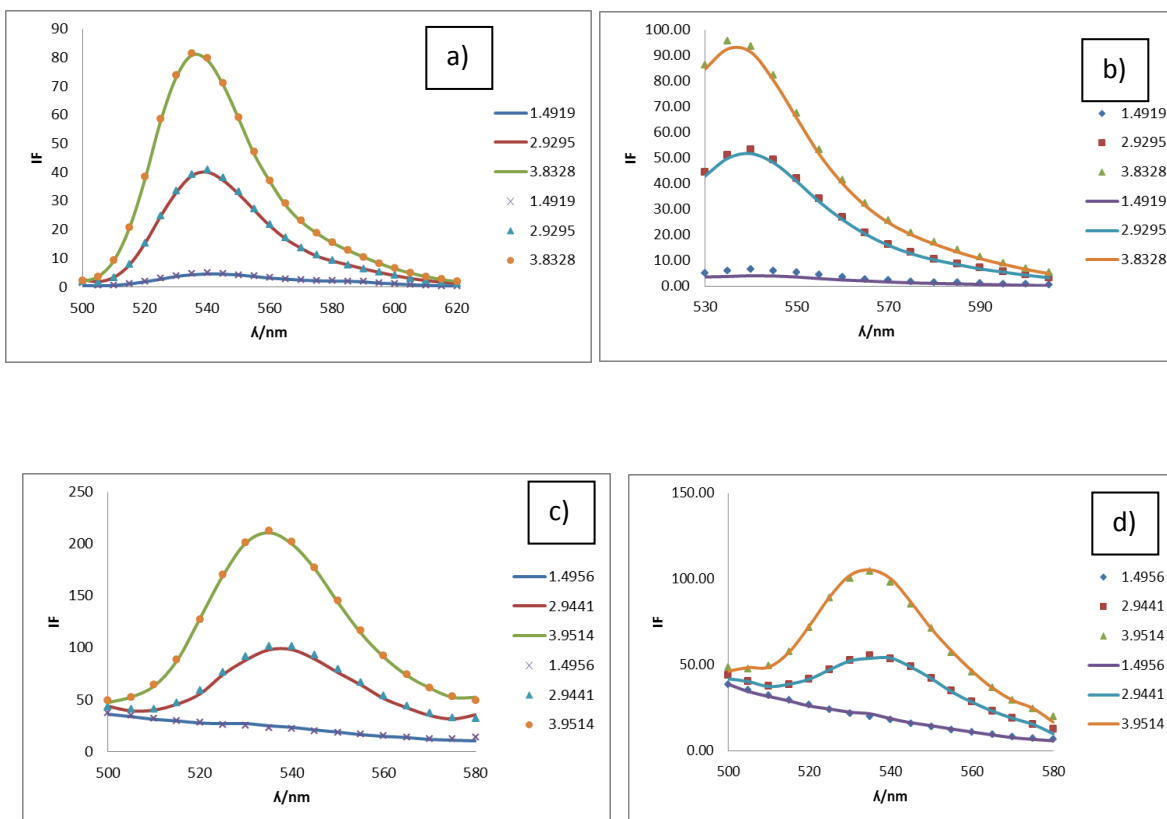
fluorescente	$HEY^- \rightleftharpoons EY^{2-} + H^+$	$pK_{a2} = 4.011 \pm 0.081$
--------------	------------------------------------------	-----------------------------

\*  $\sigma$  representa la desviación estándar de cada constante de equilibrio

### 3.6.4 Bondad del cálculo

En la figura 3.6.4.1 se muestran los espectros experimentales de emisión y excitación fluorescente, y los construidos con SQUAD (espectros teóricos) a partir de los valores de  $\log\beta$  y las absorptividades proporcionadas, siendo éstas multiplicadas por mil para regenerar los espectros de emisión o excitación.

En el caso de los espectros de excitación se realizó el ajuste con la experimentación relacionada con la tabla 3.6.3.1, con el fin de evaluar el modelo teórico.



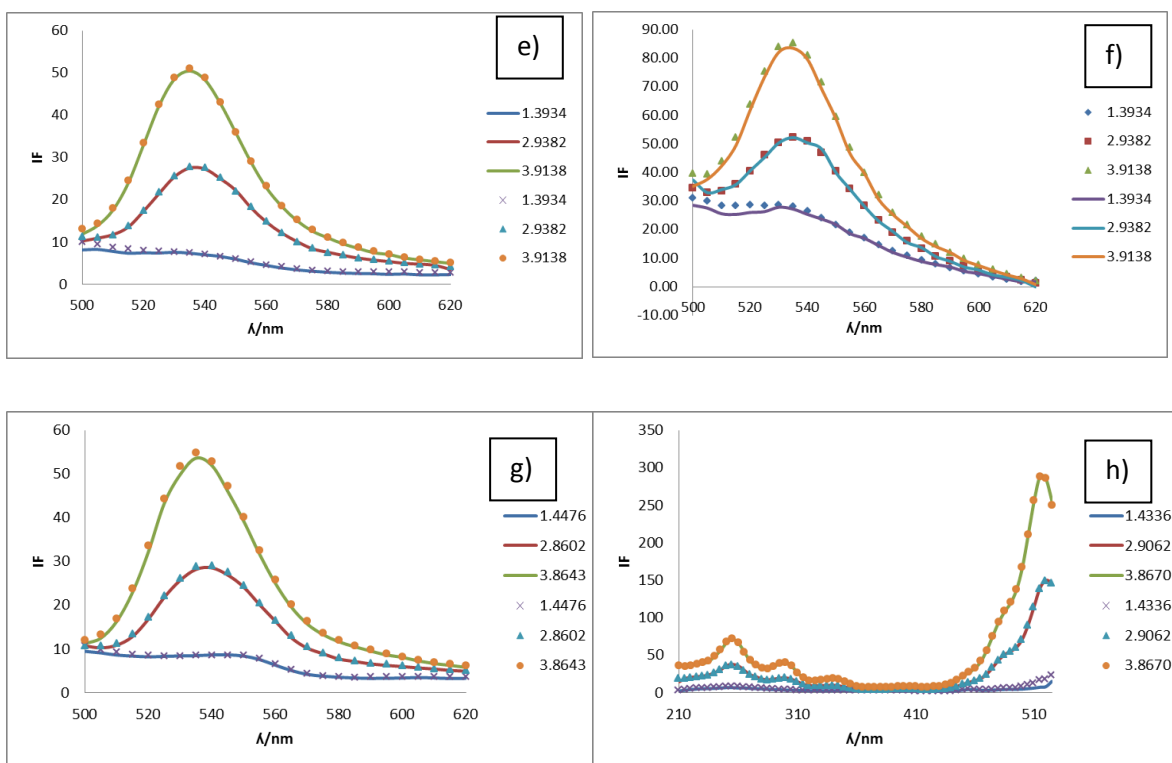


Figura 3.6.4.1. Espectros de emisión fluorescente: a) 490 nm b) 515 nm c) 300 nm d) 340 nm e) 240 nm f) 410 nm g) 250 nm, y espectros de excitación fluorescente: h) 540 nm. Construidos con los datos de SQUAD (marcadores) y experimentales (línea sólida) para algunos valores de pH

La mayor parte de los espectros teóricos a las  $\lambda_{EX}$  son superponibles a los espectros experimentales, lo que indica un buen ajuste. En el caso de la  $\lambda_{EX}$  de 340, 240 y 410 nm a pH más ácido, se presentan desviaciones en 530-550 nm, 500-520nm, 500-530, correspondientemente. Lo que pone en duda ambos pka de  $\lambda_{EX}$ =340nm, el valor de pK<sub>a2</sub> de  $\lambda_{EX}$ =240 nm, y pK<sub>a1</sub> de  $\lambda_{EX}$ =410nm. En las mencionadas longitudes de excitación no hay una buena excitación como lo son las longitudes de onda de 515 nm y 490 nm. Para el resto de las  $\lambda_{EX}$ , en general el ajuste es bueno.

### 3.6.5 Contraste de los valores de pKa obtenidos por UV-Visible y fluorescencia

En la tabla 3.6.5.1 se muestran los valores de la construcción de los intervalos de confianza al 95% de nivel de significancia de los 3 tipos de espectros utilizados.

Se realiza una comparación entre las medias de los valores de pKa obtenidos, analizando si hay intersección en los intervalos de confianza.

Tabla 3.6.5.1 Comparación de los intervalos de confianza (al 95% de nivel de significancia) de los valores de pKa obtenidos al ajustar diferentes conjuntos de espectros

Espectros	$\lambda_{ex}/\text{nm}$	Int.conf. pKa1	Int.conf. pKa2
Emisión fluorescente	300	2.444 <pKa1<2.548	4.153 <pka2<4.201
	340	2.093 <pKa1<2.433	4.190 <pka2<4.343
	490	2.509 <pKa1<2.573	3.923 <pka2<3.955
	515	2.494 <pKa1<2.694	3.719 <pka2<3.835
	240	2.387 <pKa1<2.471	4.104 <pka2<4.144
	410	2.158 <pKa1<2.322	4.044 <pka2<4.116
	250	2.349 <pKa1<2.469	4.046 <pka2<4.103
Excitación fluorescente	$\lambda_{em}=540\text{ nm}$	2.455< pka2<2.511	3.848< pka2< 4.173
Absorción		2.271 <pka2<2.531	3.641 <pka2<3.976

De acuerdo a la tabla 3.6.5.1, al realizar la comparación entre los valores de pKa obtenidos con el uso de los espectros de emisión contra los de excitación, son comparables ambos valores de pKa de la longitud de excitación de 490 nm, 250 nm y 300 nm, los cuales presentan un buen ajuste de los espectros teóricos con los experimentales (véase figura 3.6.4.1).

En general, el valor del pKa1 es comparable a cualquier longitud de excitación excepto a 410 nm, ésta longitud de excitación presenta una menor respuesta de emisión de acuerdo al siguiente orden de mayor a menor: 515 nm> 490nm>250nm>240nm>300nm>340nm > 410 nm. Como también presenta desviaciones en el ajuste del espectro de pH más ácido (figura 3.6.4.1.f) por lo que sus valores de pKa no son confiables. Los espectros de emisión a todas las longitudes de excitación se obtuvieron a pH=5.0 con abertura de rendija en excitación de 5.0 nm y de emisión de 18.0 nm para determinar el orden de respuesta de emisión.

En el caso del valor de  $pK_{a2}$ , es comparable a las longitudes de onda de excitación de 490 nm, 250 nm y 300 nm contemplando el ajuste de los espectros teóricos con los experimentales (véase figura 3.6.4.1).

De acuerdo a la tabla 3.6.5.1, al realizar la comparación entre los valores de  $pK_a$  obtenidos con el uso de los espectros de emisión contra los de absorción, son comparables ambos valores de  $pK_a$  de la longitud de excitación de 515 nm y 490 nm, los cuales presentan un buen ajuste en los espectros de los espectros teóricos a los experimentales (véase figura 3.6.4.1).

En general para cualquier longitud de excitación utilizada, el valor de  $pK_{a1}$  es equivalente pero de acuerdo al ajuste (figura 3.6.4.1) no son confiables los valores de  $pK_{a1}$  obtenidos con las longitudes de excitación de 340 nm y 410 nm, ambas no promueven una buena excitación. Y en el caso del  $pK_{a2}$  solo hay comparación entre la longitud de excitación de 515 nm y 490 nm, éstas dan un respuesta de IF mayor.

Realizando la comparación entre los valores de  $pK_a$  obtenidos por medio de los espectros de absorción y excitación a  $\lambda_{Em}=540$  nm son equivalentes.

Contemplando todo lo anterior, los valores de  $pK_a$  obtenidos por los espectros de emisión a  $\lambda_{Ex}=515$  nm y 490 nm, y excitación a  $\lambda_{Em}=540$  nm contra los obtenidos por espectros de absorción, son equivalentes. Sin embargo, la longitud de excitación de 490 nm presenta mejor contraste entre los valores de  $pK_a$  calculados por los espectros de absorción y excitación, a pesar de que presente una menor respuesta a comparación de la longitud de excitación de 515 nm. Lo cual puede ser debido a las condiciones de barrido de la  $\lambda_{Ex}=515$  nm en la sección 3.3.2.

Al realizar el contraste del valor de  $pK_{a1}$  obtenidos con los obtenidos por los espectros de emisión a  $\lambda_{Ex}=515$  nm y 490 nm, y excitación a  $\lambda_{Em}=540$  nm y absorción, con los de la tabla 1.2.1. No se presentan ninguna comparación, debido a la concentración elevada (mayor a  $10^{-5}$ ) que utilizaron para determinarlos lo cual repercute que solamente se reporte un valor de  $pK_a$ , por lo tanto los valores de  $pK_a$  de la Eosina-Y dependen de la concentración.

Por otro lado, el valor de  $pK_{a2}$  reportado por Pierre Levillain (1985) es equivalente con la longitud de excitación de 515 nm y la de emisión de 540 nm, al igual que con los espectros de absorción. Caso similar al realizar el contraste con el  $pK_{a2}$  de Batistela (2011).

Ahora bien, Batistela utiliza una concentración de  $4.18 \times 10^{-6}$  M para evitar el efecto de precipitación de la lactona que es la responsable de la discrepancia del valor de  $pK_{a1}$ . Sin embargo, el valor de  $pK_{a1}$  que reporta no es confiable debido que no muestra si el valor se repite y si reproduce los espectros de absorción experimentales.



Si el problema es la concentración, la espectroscopia de fluorescencia es una alternativa para solucionar el problema debido a las bajas concentraciones que se pueden utilizar y por consiguiente determinar los valores de pKa. De acuerdo a la tabla 3.6.3.1, el valor del pKa1 que reporta Batistela no es comparable y no es reproducible. En dicha tabla, el valor de pKa1 calculado con los espectros de emisión y excitación ronda entre 2.4 y 2.5, el cual también es reproducible utilizando los espectros de absorción. De modo que el valor del pka1 es más confiable y confirma los valores obtenidos con los espectros de absorción.

## **Capítulo 4**

### **Conclusiones generales**

#### **Conclusión general**

Se determinaron los valores de pKa de la Eosina-Y mediante una valoración ácido-base de Brønsted continua seguida por espectroscopia UV-Visible y por fluorescencia para resolver la problemática del equilibrio de precipitación de la lactona quien provoca la discrepancia del valor del pka1.

La prueba de estabilidad de la especie neutra H<sub>2</sub>EY, revela que la  $\lambda=240$  nm es la más afectada principalmente en el proceso de precipitación de la lactona o una posible degradación, modificando tentativamente el intervalo de longitud de onda del espectro de absorción para la obtención de los valores de pKa de 370 nm a 605 nm.

Se determinó el intervalo de linealidad para la Eosina-Y para  $\lambda_{Ex}= 300$  nm, 340 nm, 490 nm, 515 nm, 240 nm, 410 nm y 250 nm, y para la única  $\lambda_{Em}=540$  nm que ronda de  $5.8 \times 10^{-8}$  M < [Eosina-Y] <  $1.0 \times 10^{-7}$  M. Como también el intervalo de linealidad construido con los espectros de absorción con valor de  $5.66 \times 10^{-6}$  M < [Eosina-Y] <  $3.0 \times 10^{-5}$  M. Proponiendo concentraciones de  $7.5 \times 10^{-8}$  M y  $1 \times 10^{-5}$  M respectivamente para la determinación de los valores de pKa.

En la determinación de los valores de pKa a partir de los espectros de absorción a concentración  $1 \times 10^{-5}$  M, dan como resultado pKa1=3.355±0.024 y pKa2=3.859±0.017 en el intervalo  $\lambda= 210$ -605 nm, y pKa1=3.026±0.020 y pKa2=3.871±0.010 en el intervalo  $\lambda= 370$ -605 nm. Resultando ser comparable el pka1 con el reportado por Pierre Levillain y Dubost. Sin embargo, el ajuste de los espectros teóricos con los experimentales no es bueno y el valor del pka1 no es confiable.

La determinación de los valores de pKa a partir de los espectros de absorción se realizó a concentración  $2.5 \times 10^{-6}$  M para disminuir el proceso de precipitación. Los valores son pKa1=2.416±0.047 y pKa2=3.801±0.027 en el intervalo  $\lambda= 210$ -605 nm, siendo

reproducibles y presentando un buen ajuste de los espectros teóricos con los experimentales.

La problemática de la elevada concentración para el cálculo del pKa1 afectado por la precipitación de la lactona se resolvió por espectroscopia de fluorescencia, aprovechando la estructura de la molécula de Eosina-Y. El valor del pKa1 utilizando los espectros de emisión y excitación, a diferentes longitudes de excitación y emisión ronda entre 2.4 y 2.5. Y se presenta equivalencia entre los valores de pKa obtenidos a partir de  $\lambda_{Ex}=490$  y  $515\text{nm}$  y excitación a  $\lambda_{Em}= 540$  nm con los obtenidos con los espectros de absorción, considerando un 95% de nivel de significancia, los cuales presentan un mejor ajuste de los espectros teóricos con los experimentales.

La longitud de excitación de 490 nm presenta mejor contraste entre los valores de pKa calculados por los espectros de absorción y excitación. Lo cual la técnica de fluorescencia es apta para el cálculo de los valores de pKa de la Eosina-Y.

Siendo el valor del pKa una propiedad intrínseca. Los valores de las constantes de acidez para la Eosina-Y son alteradas, principalmente el valor del pKa1, por el uso de concentraciones diferentes.

### **Perspectivas**

- Se sugiere obtener los espectros de fluorescencia a diferentes longitudes de onda (de excitación o emisión, según sea el caso) comenzando el ajuste del pH de modo descendente.
- Determinar la estabilidad de las especies de Eosina-Y utilizando una solución buffer la cual no presente interacciones con la molécula.
- Obtener el intervalo dinámico lineal mediante las CC a valor de pH= 6.0, el cual ajustara mejor las rendijas de emisión y excitación para la omisión de radiación parasita.
- Determinar los valores de las constantes de tautoremisación de la lactona y el zwitterión utilizando una mezcla de etanol-agua al 90%.



### **Referencias**

[1] Tratado de química orgánica. F. Klages. Tomo III. Campos especiales. Editorial reverté, s.a. Barcelona-Buenos aires-Mexico. 1968

[2] Efficacy of topical application of eosin compared with Zinc oxide paste and corticosteroid cream for diaper dermatitis. Arad A, Mimouni D. Ben-Amitai D. Zeharia A, Dermatology; 319-322 (1999).

- [3] M. Majek, F. Filace, A.J. Von Wangelin. On the mechanism of photocatalytic reactions with eosin Y. *Beilstein J. Org. Chem.* 10, 983-984 (2014).
- [4] Protolytic equilibria of fluorescein Halo derivatives in aqueous-organic systems. N.O. Mchedlov-petrosyan, V.I. Kukhtik, and S.I. Egorova. *Russian Journal of general chemistry*, vol.76, No. 10, 1677-1687 (2006).
- [5] V.R. Batistela, D. Silva Pellosi, F. Dutra de Souza, W. Ferreira da Costa, S.M. de Oliveira Santin, V.R. de Souza, W. Caetano, H.P.M. de Oliveira, I. S. Scarminio, N. Hioka. *Spectrochimica Acta Part A*. 79, 889-897 (2011).
- [6] G. Trejo Córdova, M.T. Ramírez, A. Rojas-Hernández. *Los Diagramas de Zonas de Predominio Aplicados al Análisis Químico*. UAM-Iztapalapa. México. (1983).
- [7] P. Levillain, D. Fompeydie. Determination of equilibrium constants by derivative spectrophotometry. Application to the pKas of Eosin. Paris, Francia. *Anal. Chem.* 2561-2563 (1985).
- [8] A.J. Chavez, M.A Cruz, A. Rojas-Hernandez, F. Gonzales. Determinación de valores de pKa de la Eosina Y mediante espectroscopia de fluorescencia. UAM-Iztapalapa. México. (2017)
- [9] Legget, *Computational Methods for Determination of Formation constants*. New York, Plenum Press (1985).
- [10] T. Ueno T, Y. Urano, K. Setsukinai K, H. Takakusa , H. Kojima , K. Kikuchi , K. Ohkubo , S. Fukuzumi , T. Nagano. Rational principles for modulating fluorescence properties of fluorescein, Japan. 14079-14085 (2004).
- [11] Eugene D. Olsen. *Metodos opticos de analisis*. Profesor de Quimica. Universidad de South Florida. Barcelona-Bogota (1990)
- [12] T. Miura, Y. Urano, K. Tanaka, T. Nagano, K. Ohkubo, S. Fukuzumi. Rational Design Principle for Modulating Fluorescence Properties of Fluorescein-Based Probes by Photoinduced Electron Transfer. Japan. 8666-8671 (2003).
- [13] J.R. Lacowicz. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. University of Maryland, School of Medicine. Baltimore. USA. (2006)
- [14] J.M. Islas. Determinación de las constantes de acidez de compuestos piperídnicos de interés biológico. Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa. 2007. 12-15.

[15] John E. Freund, Irwin Miller, Marylees Miller. Estadística matemática con aplicaciones. 6ª.ed. Pearson educación, México, 2000

 <p>Casa abierta al tiempo UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA</p>	<b>ACTA DE EXAMEN DE GRADO</b>
Optimización de parámetros en fluorescencia para la obtención de los valores de pKa de la Eosina-Y	No. 00083 Matrícula: 2163802982
	En la Ciudad de México, se presentaron a las 11:00 horas del día 24 del mes de julio del año 2018 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:
Alan Chavez ALAN JOSHEP CHAVEZ VASQUEZ ALUMNO	DRA. MARIA TERESA RAMIREZ SILVA DRA. MARIA DEL ROSARIO MOYA HERNANDEZ DR. CARLOS ANDRES GALAN VIDAL
REVISÓ	Bajo la Presidencia de la primera y con carácter de Secretario el último, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:
LIC. JULIO CESAR DE LARA ISASSI DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES	MAESTRO EN CIENCIAS (QUIMICA) DE: ALAN JOSHEP CHAVEZ VASQUEZ
DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CBI	y de acuerdo con el artículo 78 fracción III del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:
DR. JESÚS ALBERTO OCHOA TAPIA	<u>- APROBAR -</u>
VOCAL	Acto continuo, la presidenta del jurado comunicó al interesado el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.
DRA. MARIA DEL ROSARIO MOYA HERNANDEZ	PRESIDENTA
DRA. MARIA TERESA RAMIREZ SILVA	SECRETARIO
DR. CARLOS ANDRES GALAN VIDAL	