

FLUOROCROMO DE MOLÉCULAS CONJUGADAS PARA DETECCIÓN DE Hg⁺², PROCESO DE PREPARACIÓN Y PROCESO PARA REALIZAR TAL DETECCIÓN

5

CAMPO TÉCNICO DE LA INVENCION

10 La presente invención suministra una sonda con fluorocromo que puede detectar selectivamente el Hg⁺². Así mismo se divulga el proceso para la síntesis de esta sonda y para la detección del mercurio con la misma en organismos acuáticos. La invención puede ser empleada en la industria ambiental y alimenticia.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

15

La contaminación con mercurio (Hg) en alimentos continúa siendo un problema global, debido al riesgo en la salud por su bioacumulación [1], y las crecientes y frecuentes mediciones de las concentraciones del metal en muestras ambientales y específicamente en peces de consumo humano [2]. El Hg es uno de los elementos más tóxicos del planeta [3] y está ubicado dentro del top diez de productos químicos peligrosos para la salud humana de acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS) [4]. El ion mercúrico (Hg²⁺) y el metilmercurio (CH₃Hg⁺), son las especies de mayor impacto contaminante en cuerpos de aguas naturales y en consecuencia en peces de consumo humano [5]. La exposición crónica a CH₃Hg⁺ provoca efectos neurológicos nocivos, produce temblores, alucinaciones, psicosis, cambios visuales o auditivos, problemas de memoria, pérdida de apetito, de peso e irritabilidad [6]. La ingesta de esta fase orgánica puede ocasionar envenenamiento o daños permanentes del cerebro y los riñones, especialmente a mujeres en estado de embarazo, jóvenes y niños [7].

20

25

30

En lo que se refiere a las técnicas utilizadas para medición de las especies de Hg en el ambiente, se destacan las basadas en emisión y absorción atómica,

complementadas con procesos de cromatografía, micro extracción y vapor frío, entre otras [8], tal como se evidencia en los siguientes documentos:

La patente US7552617 muestra un sistema automatizado para procesar una muestra de prueba líquida. El sistema descrito comprende un separador de gas y líquido; un accesorio para una primera fuente de gas que proporciona un flujo de gas para transferir la muestra de prueba desde un recipiente de muestra sellable al separador de gas y líquido y para eliminar al menos un componente volátil de la muestra de prueba, en el que un compuesto químico de interés presente en la muestra de prueba se convierte en al menos una especie volátil que luego es retenida e identificada por HPLC. Estos compuestos volátiles de interés pueden ser iones y compuestos con mercurio.

La patente US9523683 que divulga un microarreglo en liposomas con monómeros de poliacetileno unidos a moléculas con fluorescencia, las cuales al interactuar con iones mercurio cambian su luminosidad. Este desarrollo requiere que la muestra a analizar se coloque sobre una lámina que contiene el microarreglo, por lo que es un ensayo de laboratorio.

La patente CN104391070 muestra un método de detección de alquiluro de mercurio en un tipo de agua basado en la concentración de extracción en fase sólida, medición de la técnica de acoplamiento cromatografía líquida- HPLC-ICP-MS. El método de detección de alquiluro de mercurio tiene un ancho de rango de linealidad, con un límite de detección es bajo y puede medir este componente en cualquier fuente de agua.

Por su parte, el documento CN107677744 divulga un método de detección de mercurio en forma de células de tejido animal, que comprende los siguientes pasos: (1) preparación de la solución estándar; (2) pretratamiento de la muestra por digestión; (3) utilización de cromatografía líquida de ultra rendimiento, y medición del método de combinación de espectrometría de masas de plasma acoplado por inductividad para lograr la medición de mercurio.

El documento CN110286180 divulga un método para detectar diferentes formas de mercurio en un cuerpo de agua ambiental basado en la combinación HPLC-

ICP-MS, que comprende los pasos de: (1) preparación de una solución estándar mixta de mercurio tomando la fase móvil L-cisteína como disolvente; (2) dibujar una curva estándar de mercurio; (3) pretratamiento de la muestra; (4) detección de muestras: medir y analizar la concentración de la forma de mercurio en la solución anterior de la muestra a detectar mediante HPLC-ICP-MS, y calcular y analizar el valor de concentración de la forma de mercurio según la desviación estándar relativa RSD de la intensidad de la señal obtenida por cálculo y la curva estándar de la forma de mercurio.

- 10 El artículo de González-Morales, et. al (2020), divulga un método de bajo costo para la detección de iones mercurio, que emplea espectrometría UV-Vis y quimio sensores [9].

De otra parte, el documento de patente CN105203666 divulga un tipo de método que emplea vapor frío para detectar metilmercurio, etilmercurio y mercurio inorgánico en alimentos acuáticos. Requiere el procesamiento de diferentes partes de muestra biológica por vapor frío y L-cisteína, un procesamiento adicional y se analiza la generación AFS de cromatografía líquida de alta resolución.

De forma similar, el artículo de Escudero, et.al. (2013) enseña un proceso para detección de iones mercurio por medio del extracción en fase sólida líquida iónica soportada por polímeros para la determinación de trazas de mercurio orgánico e inorgánico en muestras de agua mediante em método de espectrometría de absorción atómica de vapor frío con inyección de flujo [8].

Otros emplean sondas fluorescentes, como el documento CN102516992 que divulga una sonda fluorescente para la detección de iones Hg^{+2} y un método de síntesis de esta. La sonda emplea como precursores ácido acrílico 3-2-furano y cloruro de tionilo, diclorometano como solvente y rodamina etilendiamina y trietilamina como fluoróforos.

Así mismo, el documento CN102492417 sintetiza una sonda fluorescente censora de iones de mercurio y un método de preparación de esta. La sonda

tiene una identificación específica para los iones de mercurio a través del ajuste y control del ácido, y cambia junto con el color de la fluorescencia visible a simple vista bajo una lámpara ultravioleta. La sonda fluorescente tiene una función de detección cromófora y tiene amplias perspectivas de aplicación en los campos biológicos y de detección de iones.

Estas técnicas requieren procesos de preservación, almacenamiento, preconcentración, separación, análisis y detección en laboratorio en equipos de alta complejidad, aspectos que las hacen inaccesibles para mediciones a gran escala en tiempo y lugar para caracterización de bioacumulación de Hg en peces, se requiere un procedimiento que no se limita a un órgano o sistema específico del animal [10], lo que implica sacrificios de un gran número de ejemplares para un bajo porcentaje de masa corporal que permita la determinación de la concentración [11].

De otra parte, tal como se observa en el estado del arte las técnicas utilizadas para la detección y medición de bioacumulación son aún limitadas por costo, portabilidad, y sencillez metodológica [12]. Esto plantea la urgente necesidad de desarrollar nuevas alternativas que permitan prácticas de detección y medición con protocolos, o dispositivos suficientemente sensibles, de bajo costo, portables y de uso simple.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

La presente invención resuelve ese problema al suministrar un fluorocromo conjugado o sonda de detección de Hg^{+2} que es específica para este elemento, funciona en medio acuoso, portable y que puede ser empleada con muestras de cuerpos de agua o muestras biológicas de diverso tipo de tejido de organismos acuáticos.

El fluorocromo conjugado de la invención corresponde al compuesto 2-benzoil-N-[2-[bis[2-[(2-benzoilbenzoil) amino] etil]amino] etil] benzamida ($C_{48}H_{42}N_4O_6$).

Este fluorocromo conjugado de detección del ion Hg^{+2} es sintetizada a partir de los compuestos hidracida de rodamina B ($\text{C}_{28}\text{H}_{32}\text{N}_4\text{O}_2$) y fluoresceína sódica ($\text{C}_{20}\text{H}_{10}\text{Na}_2\text{O}_5$)

- 5 La detección del ion mercurio por la sonda es de tipo ON-OFF, es decir, que ante la presencia de este elemento la fluorescencia disminuye su intensidad, algo que es destacable de esta sonda de la invención puesto que las sondas del estado de la técnica no son específicas para Hg^{+2} y son de tipo OFF-ON, lo que limita la eficiencia de la detección.

10

Es un segundo objeto de la invención el suministrar el proceso para sintetizar el fluorocromo conjugado para detección de Hg^{+2} , teniendo dicho proceso las etapas fundamentales de disolver 12% (p/v) de hidracida de rodamina B - $\text{C}_{28}\text{H}_{32}\text{N}_4\text{O}_2$ y 9% (p/v) fluoresceína sódica - $\text{C}_{20}\text{H}_{10}\text{Na}_2\text{O}_5$ en disolvente CH_2Cl_2 :

- 15 MeOH al 79% (p/v) en proporción 2:1.5, con atmósfera de argón; incubar a una temperatura entre 50°C y 80°C por entre 18 y 30 horas; y descartar el disolvente y se obtiene el compuesto [bis(dietilamino)-3- oxospiro[isoindolina-1,9'-xanten]-2-il)imino)-6-hydroxi-3H-xanten-9-yl) ácido benzoico. En este proceso la sonda conformada por este compuesto final detecta Hg^{+2} bajo la luz UV y/o luz natural
- 20 en dos picos observables que están en la longitud de onda 510-530 nm y 565-585 nm y funciona en pH neutro.

Es un tercer objeto de la invención el proceso para detectar Hg^{+2} con la sonda de la invención en muestras biológicas, en el cual se mezcla la sonda de fórmula

25 1 en una concentración de 100 ppm por cada 1ml agua desionizada; se agrega la muestra biológica a ensayar en agua desionizada en una proporción 14:100 y se incuba a T° ambiente durante 2 horas; después se puede realizar la detección de Hg^{+2} en medio acuoso y longitudes de onda entre 490 y 650 nm por fluorescencia con luz UV.

30

Este último proceso también tiene modalidades preferidas en las cuales la detección del ion mercurio se puede realizar en medio acuoso y luz natural por percepción visual de variación de color; o por escala colorimétrica en espectrofotometría.

La sonda de la invención puede ser empleada para detectar ion mercurio en muestras biológicas de organismos acuáticos, especialmente muestras de tejidos muscular, branquial, conectivo, renal, pulmonar, hepático, estomacal o epitelial de éstos.

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1. Cromatograma de HRMS para hidracida de rodamina B

10 **Figura 2.** Espectro de HRMS para hidracida de rodamina B

Figura 3. Cromatograma de HRMS para fluoresceína

Figura 4. Espectro de HRMS para fluoresceína

Figura 5. Cromatograma de HRMS para sonda de detección

Figura 6. Espectro de HRMS para sonda de detección

15 **Figura 7.** Selectividad de la sonda de detección luz natural

Figura 8. Selectividad de la sonda de detección luz natural + Luz UV

Figura 9. Selectividad de la sonda de detección luz UV

Figura 10. Espectrofotometría de fluorescencia para selectividad de la sonda de detección.

20 **Figura 11.** Intensidad de fluorescencia en sonda de detección para diferentes valores de pH. Espectrofotometría fluorescente.

Figura 12. Intensidad de fluorescencia en sonda de detección para diferentes solventes. Espectrofotometría fluorescente. H₂O des =Agua desionizada, H₂O llav = Agua potable, Etan =Etanol, Metan = Metanol, Acet = Acetona, Clorof = Cloroformo.

25 **Figura 13.** Captura inicial de tejido con fluóforos independientes. A) tejido con Rodamina B –Laser Rhodamine Red x. B) tejido con fluoresceína – Laser Alexa Fluor 488.

30 **Figura 14.** Cálculo gráfico del ponderado de eficiencia cuántica para tejido branquial. A) Concentración de 100 µg/L de Hg²⁺. B) Rendimiento cuántico concentración de 100 µg/L de Hg²⁺. C) Concentración de 0 de Hg²⁺. D, Rendimiento cuántico concentración 0 µg/L de Hg²⁺.

Figura 15. Caracterización de tejido externo de pez (bagre), microscopia óptica y de fluorescencia; A) Fluorescencia en piel; B) Óptica en aleta; C) Óptica en Branquia.

Figura 16. Incubación de tejido branquial Hg^{2+} con sonda de detección

5 **Figura 17.** Incubación de tejido branquial con sonda de detección. A) Incubación de sonda de detección sin Hg^{2+} , B) Incubación de sonda de detección en muestra con 1000 $\mu\text{g/L}$.

Figura 18. Incubación de tejido branquial Hg^{2+} con sonda de detección. Luz UV.

10 **Figura 19.** Microscopía de fluorescencia para tejido branquial. Intensidad en función de cambios de concentración de Hg^{2+} .

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

15 **Proceso para preparar la sonda**

El proceso para preparar la sonda de detección de Hg^{+2} , a partir de hidracida de rodamina B y fluoresceína sódica, debe seguir los siguientes pasos:

- 20 a) disolver entre el 10 y 15% (p/v) de hidracida de rodamina B - $\text{C}_{28}\text{H}_{32}\text{N}_4\text{O}_2$ y entre el 7 y 12% (p/v) de fluoresceína sódica - $\text{C}_{20}\text{H}_{10}\text{Na}_2\text{O}_5$ en disolvente CH_2Cl_2 : MeOH entre el 75 y 85% (p/v) en proporción 2:1.5, con atmósfera de argón;
- b) agitar e incubar a una temperatura entre 50°C y 80°C por 18 a 30 horas;
- 25 c) descartar el disolvente y se obtiene el compuesto [bis(dietilamino)-3-oxospiro[isoindolina-1,9'-xanten]-2-il)imino)-6-hydroxi-3H-xanten-9-yl) ácido benzoico;

30 Siguiendo el proceso anterior, la sonda conformada por este compuesto final detecta Hg^{+2} bajo la luz UV y/o luz natural en dos picos observables que están en la longitud de onda 510-530 nm y 565-585 nm y funciona en pH neutro. Aunque puede detectarse en un pH de 7 hasta 11.

En la etapa a) del proceso las concentraciones preferidas de los compuestos son 12% (p/v) de hidracida de rodamina B y 9% (p/v) fluoresceína sódica en disolvente CH₂Cl₂: MeOH al 79% (p/v).

- 5 Para ese proceso la atmósfera de argón se logra por 99.9% (1.66 Kg/m³) de argón a temperatura ambiente, estando esta temperatura en 20°C ± 5°C.

Además, en la etapa b) la temperatura preferible a emplear es de 60°C y la mezcla se agita a 150 rpm durante 24 h. En la etapa c) se elimina el disolvente
10 de CH₂Cl₂: MeOH preferiblemente al vacío.

Por otra parte, para obtener el compuesto de partida hidracida de rodamina B del proceso anterior, se puede realizar el siguiente proceso:

- 15 a) preparar solución de clorhidrato de rodamina 0.417 mmol y trietilamina 1.25 mmol en 60% de etanol anhidro, en atmósfera de argón;
- b) añadir hidrato de hidracina 2,09 mmol e incubar en atmósfera de argón;
- c) enfriar la mezcla, filtrar y eliminar disolvente;
- 20 d) añadir 75% diclorometano a la mezcla resultante y lavar con agua desionizada 3 veces;
- e) secar la fase orgánica con 30% Na₂SO₄ anhidro y purificar compuesto resultante.

- 25 Para la etapa a) de este proceso el tiempo de incubación en atmósfera de argón puede ser de 15 a 45 minutos, preferiblemente de 30 minutos. Mientras que en la etapa b) se calienta la solución en reflujo durante 24 h en atmósfera de argón.

La forma preferida para eliminar el disolvente es al vacío, aunque puede ser
30 empleada cualquier otra técnica conocida en el estado de la técnica para este fin.

Para purificar el compuesto obtenido en la etapa e) se procede a purificar en cromatografía en columna para obtener el reactivo Hidracida de rodamina B.

Las concentraciones de reactivos empleadas son las equivalentes a este ejemplo de realización donde se empleó: solución de clorhidrato de rodamina B (0,20 g, 0,417 mmol) y trietilamina (0,18 ml, 1,25 mmol) en etanol seco (10 ml) durante 30 min en atmósfera de argón. Luego, en la etapa b) se añade hidrato de hidracina (0,13 ml, 2,09 mmol). En la etapa d) se añade diclorometano (30 ml) a la mezcla resultante y la solución se lava con agua desionizada (30 ml). La fase orgánica se seca con Na₂SO₄ anhidro, en la cantidad necesaria para lograrlo.

10

De otra parte, para obtener el compuesto de partida fluoresceína sódica usada en el proceso para preparar la sonda, se puede realizar el siguiente proceso:

- a) disolver fluoresceína 0.5 mmol y bicarbonato de sodio 0.5 mmol en 80% de dimetilsulfóxido;
- 15 b) incubar a temperatura entre 120 y 180°C, enfriar;
- c) colocar mezcla en solución clorhídrica 2M a temperatura ambiente;
- d) extraer la solución anterior con 70% diclorometano,
- e) recoger la fase del diclorometano y eliminar el disolvente de la solución resultante, lavar con agua desionizada;
- 20 f) recoger el precipitado resultante y disolver en 70% de diclorometano y secar sobre Na₂SO₄ anhidro;
- g) eliminar el diclorometano y se obtiene la fluoresceína sódica.

En la etapa b) la mezcla obtenida en la etapa anterior se puede incubar preferiblemente a 150°C durante 4 horas.

25

En la etapa c) cuando se añade la solución clorhídrica, la mezcla se puede agitar a temperatura ambiente preferiblemente por 2 horas.

30 En las etapas d) y e) una forma preferida de su realización es que la solución obtenida en la etapa c) se extrae tres veces con diclorometano. Se recoge la fase de diclorometano y se elimina el disolvente al vacío para dar un aceite oscuro. Se añade agua desionizada y la mezcla se mantiene a temperatura ambiente durante 18 h.

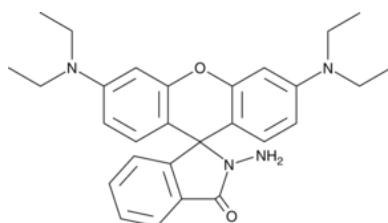
En la etapa f) el precipitado resultante se recoge preferiblemente mediante filtración al vacío, aunque puede ser empleada cualquier otra técnica conocida en el campo técnico. Se disuelve en diclorometano y se seca sobre Na₂SO₄ anhidro.

A continuación, se elimina el diclorometano, preferiblemente al vacío, para obtención del reactivo fluoresceína sódica.

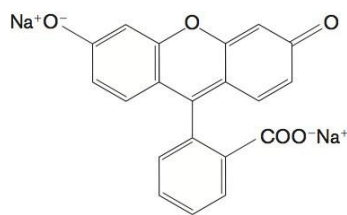
Las concentraciones y cantidades de reactivos empleadas son las equivalentes a este ejemplo de realización donde se empleó: fluoresceína (0,40 g, 0,5 mmol) y bicarbonato de sodio (0,40 g, 0,5 mmol) en dimetilsulfóxido (40 ml). Se vierte en solución clorhídrica 2 M (140 ml). En la etapa d) la solución se extrae tres veces con diclorometano (40 ml). En la etapa e) se añade agua desionizada (60 ml) y la mezcla se mantiene a temperatura ambiente durante 18 h. El precipitado resultante se recoge mediante filtración al vacío y se disuelve en diclorometano (40 ml) y se seca sobre Na₂SO₄ anhidro en cantidad suficiente para lograr el secado.

Sonda de detección de mercurio

La sonda de detección del ion Hg⁺² es sintetizada a partir de la conjugación de los compuestos hidracida de rodamina B (C₂₈H₃₂N₄O₂) de fórmula 2 y fluoresceína sódica (C₂₀H₁₀Na₂O₅) de fórmula 3, tal como se explicó en la parte anterior.



[Fórmula 2]



[Fórmula 3]

La sonda de detección de Hg de la invención corresponde a: [bis(dietilamino)-3-oxospiro[isoindolina-1,9'-xanten]-2-il)imino)-6-hidroxi-3H-xanten-9-yl) ácido benzoico (C₄₈H₄₂N₄O₆).

La sonda de la invención es selectiva para el mercurio, especialmente para el ion Hg⁺², aunque también puede detectar metilmercurio. De otra parte, no interactúa con iones metálicos tales como As, Cd, Cr, Zn y Pb, tal como se evidencia del ejemplo 2, mostrando que la sonda es altamente selectiva para mercurio.

Además, la sonda puede ser empleada en diferentes solventes acuosos, tales como agua, agua desionizada, metanol, etanol y mezclas de éstos. Así mismo, puede ser reactiva en pH entre 7 y 12, tal como se observa en el ejemplo 3.

La sonda puede detectar Hg⁺² tanto por la escala colorimétrica o fluorescente, es reactiva a partir de una concentración mínima de 0.5 ppm y máxima de 10000 ppm de Hg⁺² presente en la muestra biológica.

Además, la sonda de la invención presenta disminución de intensidad fluorescente en función de aumento en la concentración de Hg²⁺, funcionando como un sensor molecular fluorescente tipo On-Off, tal como se ve en el ejemplo 4.

Proceso para detectar el mercurio con la sonda de la invención

Proceso para detectar Hg⁺² con la sonda de la invención:

- a) mezclar la sonda de fórmula 1 en una concentración de 100 ppm en agua desionizada;

- b) agregar muestra biológica a ensayar en agua desionizada en una proporción 14:100 e incubar a T° ambiente durante 2 horas;
- c) realizar detección de Hg^{+2} en medio acuoso y longitudes de onda entre 490 y 650 nm por fluorescencia con luz UV.

5

En este proceso la detección de Hg^{+2} de la etapa c) también se puede realizar en medio acuoso y luz natural por percepción visual de color, siendo positiva si hay variación de color de la solución a diferentes grados de rojo, o negativa si se mantiene el color naranja de la solución.

10

También se puede realizar la detección de Hg^{+2} de la etapa c) en medio acuoso por escala colorimétrica en espectrofotometría.

15

En el proceso para detectar Hg^{+2} con la sonda de la invención, como se mencionó antes, la escala colorimétrica o fluorescente es reactiva a partir de una concentración mínima de 0.5 ppm y máxima de 10000 ppm de Hg^{+2} presente en la muestra biológica.

20

La muestra biológica puede ser seleccionada de tejido muscular, branquial, conectivo, renal, pulmonar, hepático, estomacal o epitelial de organismos acuáticos, preferiblemente de especies de peces, los ejemplos 5 y 6 ilustran una forma de realización de esta parte, aunque no se limita a ésta.

Kit de detección de mercurio

25

Este proceso de detección de Hg^{+2} con la sonda de la invención también puede ser realizado por un usuario a través de un kit de detección, en el cual se suministra la sonda de la invención en un recipiente, en seco o con previa dilución en cualquiera de los solventes acuosos ensayados. La muestra biológica por su parte puede ser incorporada al recipiente, previo lavado y macerado, o simplemente en su forma natural siempre que esté en la proporción indicada en el proceso para detectar mercurio.

Se suministra al usuario el respectivo instructivo. También se puede incluir una escala colorimétrica para aquellos que deseen realizar las pruebas de detección en campo.

5 Ejemplos

Ejemplo 1. Proceso para preparar la sonda de detección de mercurio

En un ejemplo de realización del proceso para preparar la sonda de detección de mercurio se mezclaron las siguientes cantidades de hidracida de rodamina B (0,197 g, 0,43 mmol) y fluoresceína sódica (0,076 g, 0,20 mmol) en CH₂Cl₂: MeOH (2 ml: 1,5 ml), con atmósfera de argón. La mezcla se agita a 150 rpm y se calienta a 60 °C durante 24 h, se elimina el disolvente al vacío.

Para la elucidación de la estructura molecular del compuesto sintetizado, se utilizan las técnicas de resonancia magnética nuclear (RMN), espectroscopia de masas de alta resolución (HRMS) y cromatografía de capa fina (TLC), se muestran los resultados de HRMS (Figuras 1 a 6), obteniendo la siguiente aproximación molecular: C₄₈H₄₂N₄O₆ (770.886 g/mol), [bis(dietilamino)-3-oxospiro[isoindolina-1,9'-xanten]-2-il)imino)-6-hidroxi-3H-xanten-9-yl) ácido benzoico.

El eje vertical representa la intensidad relativa o la señal de los iones detectados, mientras que el eje horizontal representa la relación masa/carga. Por lo tanto, los picos más altos representan la intensidad relativa y masa con mayor presencia en la molécula.

En los espectros de masas se observan picos con intensidades relativas a los valores de masas en una (unidad de masa atómica). Cuando se observan varios picos con intensidades relativamente altas, se podrían asociar comportamientos de fragmentación. Dicha fragmentación, puede deberse al proceso de ionización de la molécula en función de los grupos que la componen.

Con base en el análisis de los resultados de las pruebas RMN, HRMS y TLC, y con ayuda del recurso electrónico *chemdrawdirect perkinelmer*, se realiza una aproximación de estructura molecular para el producto de la síntesis de la sonda de detección. Se propone la estructura de fórmula 1 para ésta.

5

Ejemplo 2. Pruebas de selectividad de la sonda

Se valida la selectividad de la sonda de detección en función de posibles interferencias con otros metales pesados. Los reactivos utilizados para las pruebas de selectividad son Hg^{2+} standard, Arsénico (As^{3+}), Cadmio (Cd^{2+}), Cromo (Cr^{5+}), Plomo (Pb^{2+}) y Zinc (Zn^{2+}). El disolvente utilizado es agua desionizada. Las soluciones se prepararon en viales de vidrio de 20 ml en campana de extracción y con concentraciones de 100 $\mu\text{g/L}$ cada uno.

15 Se presenta la figura 7, con la fotografía comparativa de los metales en conjugación con la sonda de detección para irradiación con luz natural.

El funcionamiento colorimétrico de la sonda de detección resulta útil para evaluar la selectividad. En la figura 7 se observa un cambio de color únicamente para la solución con la sonda en presencia de Hg^{2+} , validando la hipótesis de que la sonda es selectiva.

Se realiza una prueba con irradiación de luz natural y luz UV simultáneamente (Figura 8), para proyectar posibles configuraciones de la sonda de detección. La imagen es concordante con el resultado anterior y aporta evidencia de que la sonda de detección es selectiva para concentraciones de Hg^{2+} .

Luego, se realiza una prueba con irradiación de luz UV (Figura 9), en las mismas condiciones de las dos pruebas anteriores. Los resultados soportan la calidad de la sonda de ser selectiva para Hg^{2+} . La variación de emisión fluorescente se evidencia, ya no en cambio de color, sino en disminución de la intensidad. Lo anterior puede relacionarse con funcionamiento de sensores fotoquímicos, tipo On– Off.

Debido a que las variaciones ópticas sugieren que la sonda de detección propuesta es selectiva para Hg^{2+} , se plantea una caracterización cuantitativa de la emisión fluorescente en espectrofotometría (Figura 10).

- 5 Las curvas obtenidas evidencian, de forma cuantitativa, la selectividad del sistema para Hg^{2+} . El valor del primer pico de máxima intensidad de emisión fluorescente se reduce en un 83% con respecto a la emisión de la sonda de detección. La disminución del pico para As, Cd y Cr esta entre 2 y 5 %, y para Zn y Pb es del orden de 7%. Los datos confirman la hipótesis de que el sistema
- 10 es altamente selectivo para Hg^{2+} .

Ejemplo 3. Solventes y pH que pueden ser empleados con la sonda

- Para caracterizar la sonda, según su solubilidad, y validar su comportamiento en
- 15 diferentes medios, se realizan pruebas con distintos pH (Figura 11) y diferentes solventes (Figura 12).

- Las variaciones en la intensidad en la figura 11, soportan la aproximación de las condiciones óptimas de pH para el correcto funcionamiento de la sonda de
- 20 detección diseñado. Los resultados sugieren que la mejor configuración de la sonda de detección, en concentración de 100 $\mu\text{g/L}$, se presenta en pH superior a 7, es decir en medios neutros y básicos.

- Los solventes utilizados son seleccionados acordes con la información del
- 25 estado del arte respecto a fluoróforos para detección de Hg^{2+} . La figura 12, muestra los cambios de espectros de emisión fluorescente debido a la interacción del solvente con la sonda de detección. Se descarta el uso de acetona y cloroformo, ya que muestran alteraciones estructurales en la sonda, produciendo cambios en la intensidad y longitud de onda en los picos de máxima
- 30 emisión fluorescente (incluso mostrando un solo pico). La similitud de las curvas de etanol y metanol puede explicarse debido a su acidez (superior a 15 pKa), aunque con estos solventes funciona la sonda, por razones de toxicidad en el ambiente se podría privilegiar el agua sobre éstos. Las curvas sugieren al H_2O ,

como el solvente óptimo para el funcionamiento de la sonda de detección de Hg^{2+} .

Ejemplo 4. Prueba de rendimiento cuántico de la sonda

El cálculo del rendimiento cuántico permite establecer uno de los criterios mas importantes para el funcionamiento de una sonda fluorescente para detección de Hg^{2+} . El rango y los límites de detección están estrechamente ligados con la eficiencia de una sonda de detección que funcione con técnicas fluorescentes. Se proponen dos métodos para establecer el rendimiento cuántico de la sonda diseñada, uno en medio acuoso y el otro de tejido branquial.

Utilizando los parámetros de la síntesis y la incubación de las muestras, se procede a calcular el ϕ con el software Spectra RF6000 (Espectrómetro RF 6000 Shimadzu). Se presenta la tabla 1, que reúne los resultados de los rendimientos cuánticos para las curvas de intensidad fluorescente. Cabe aclarar que no es posible realizar el cálculo de ϕ correspondiente a las concentraciones 5000 y 10000 $\mu\text{g/L}$ de Hg^{2+} , debido a que los valores salen del rango para el software utilizado (intensidad baja).

Tabla 1. Rendimientos cuánticos para curvas de emisión de fluorescencia, sonda de detección fluorescente. Abc = Área bajo la curva, ϕ = Rendimiento cuántico

Hg^{2+}	0	0,5	1	2	5	10	20	50	100	200	500	1000	2000
Abc	9331 1	5664 7	2724 8	2621 2	2549 5	2488 3	2307 4	2301 6	2254 9	1903 6	1858 8	1655 8	1547 5
ϕ	0,73	0,64	0,59	0,51	0,47	0,42	0,39	0,37	0,31	0,28	0,25	0,21	0,18

Los resultados permiten evidenciar que la sonda fluorescente tiene un ϕ de 0,73. Lo anterior, se traduce en que la eficiencia del sistema es superior al 70%. Además, los datos sugieren que el ϕ , es inverso a la concentración de Hg^{2+} , incluso cercano a cero para altas concentraciones. Los resultados sugieren que

el ϕ , decae aproximadamente un 75 % para las 13 mediciones realizadas, y un 56% para la concentración de 100 $\mu\text{g/L}$ de Hg^{2+} .

Rendimiento cuántico con microscopía confocal

- 5 La caracterización del software de microscopía confocal, permite realizar el cálculo de ϕ del proceso FRET. Dicho cálculo, requiere una configuración del microscopio para toma de imágenes, con incidencias específicas de los láseres y una secuencia en función de los fluoróforos utilizados como donador y aceptor respectivamente. Se realiza la captura de imágenes tomadas a tres muestras: i)
- 10 Tejido solamente con el donador, ii) Tejido solamente con el aceptor, y iii) tejido con la síntesis de ambos fluoróforos.

El radio de Forster (R_0), es una variable muy importante en los procesos FRET que se asocia con la distancia entre los fluoróforos que realizan la transferencia

15 energética. R_0 , representa la distancia intermolecular para que la tasa de transferencia de energía sea igual a la tasa de fluorescencia del donante en ausencia del receptor. Es decir, la distancia necesaria para la que la mitad de las moléculas participen en la transferencia de energía. Además, el rendimiento cuántico del proceso FRET, decae con la sexta potencia de R_0 .

20

Se presentan las dos imágenes de las muestras incubadas con donador y aceptor, respectivamente (Figura 13). Se debe buscar la configuración óptima para el funcionamiento de los láseres en la toma de las imágenes. Los parámetros seleccionados se configuran en intensidad media para los láseres

25 Rhodamine Red x. y Alexa Fluor 488, con 30 enfoques por toma.

Posteriormente se requiere una muestra que se halla incubado con la sonda fluorescente para compararla con las muestras de los fluoróforos por separado. Para la comparación del ϕ , en dos muestras de tejido branquial con diferentes

30 concentraciones de Hg^{2+} , se requiere la carga en la sonda manteniendo los parámetros fijos de los láseres y de las imágenes del donador y aceptor de forma individual. Se presentan las imágenes para el proceso de obtención de ϕ , en concentración de 0 y 100 $\mu\text{g/L}$ de Hg^{2+} en tejido branquial (Figura 14).

Los resultados que arroja el software de análisis del microscopio confocal para el rendimiento cuántico, se calculan a partir de la media de intensidad por color en el diagrama de calor presentado en la figura 14. El software calcula un valor de 33,2 % de ϕ , para la figura 14-B, es decir, para la muestra incubada con 100 $\mu\text{g/L}$ de Hg^{2+} . El cálculo del valor de ϕ , para la figura 14-D es de 72,87 %, en la muestra sin Hg^{2+} . El valor de R_0 calculado para el proceso FRET es de 5.6 nm, un valor ubicado en la media para la mayoría de las parejas de fluoróforos donador-aceptor.

- 10 Conclusión. Se realizó prueba de rendimiento cuántico de la sonda de detección de Hg^{+2} de la invención, mostrando que presenta un ϕ del 73 %, lo que se traduce en que es altamente eficiente la transferencia de energía fluorescente en el modo empleado para detección de Hg^{2+} en medio acuoso y con diferentes tipos de tejido. En la concentración de 100 $\mu\text{g/L}$ de Hg^{2+} , la eficiencia disminuye un valor de más del 50%, facilitando la deducción de que la sonda es susceptible de medir concentraciones más bajas con una respuesta detectable.

Ejemplo 5. Selección de muestra biológica

- 20 Para abordar la etapa de selección de la zona biológica de interés, se recolectan muestras de bagre (*Pseudoplatystoma tigrinum*) en el laboratorio de ictiología de la Pontificia Universidad Javeriana (PUJ). Las muestras se toman de un individuo macho de 28,5 cm de longitud y 1,23 Kg. Se hace extracción del tracto digestivo con corte longitudinal del ano a la boca y se define el sexo del pez con la extracción de las gónadas. Se disecciona el opérculo branquial para acceder más fácilmente al esófago y se extrae el tracto digestivo desde el esófago (cerca de la boca) hasta el ano. Se identifican, extraen y rotulan los órganos internos. Finalmente, se hacen cortes en los órganos en tamaños apropiados para el tipo de análisis requerido. La preservación de las muestras depende de la técnica de análisis que se utilice.

Utilizando los resultados de información del campo técnico, para las zonas biológicas reportadas como de mayor bioacumulación por exposición al Hg^{2+} , se

realiza la caracterización de cinco tipos de tejido en el pez muestreado: 1) Hígado, 2) Riñón, 3) Músculo, 4) Estómago y 5) Branquia.

Debido a la exposición de la muestra en medio natural, se considera el tejido externo del pez que tiene contacto directo con agua contaminada con Hg²⁺ (Branquia, Piel y Aleta) (Figura 15). Para las últimas pruebas se selecciona el tejido de branquia.

Se realiza una medición multiparamétrica (para metales) en inducción de plasma acoplado (ICPOS, norma FDA 21 CFR) y medición de absorción atómica para As (AAE-GH, NTC 4634). Se hace un proceso de digestión ácida (Norma HPR-FO-21), necesario para las dos técnicas propuestas de caracterización. La prueba realizada permite establecer niveles de concentración de metales en el tejido seleccionado para valorar posibles interferencias con la sonda de detección de Hg²⁺.

Se presenta la tabla 2, que muestra los resultados combinados para medición de metales por ICP-OS y AAE-GH:

Tabla 2. Medición de metales por ICP-OS y AAE-GH, muestras de tejido branquial

Elemento	Longitud de onda	Unidad	Conc M1	Conc M2
Ag	328.068	µg/kg	4.40	1.69
Al	257.510	µg/kg	3.33	1.25
B	249.773	µg/kg	2.03	1.27
Ba	230.424	µg/kg	3.51	0.96
Be	234.861	µg/kg	12.37	2.03
Cd	214.438	µg/kg	27.56	5.64
Co	238.892	µg/kg	5.12	0.99
Cr	267.716	µg/kg	7.90	0.64
Cu	324.754	µg/kg	1.97	0.58
Fe	238.204	µg/kg	1.83	0.90
Li	610.364	µg/kg	2.36	0.87
Mn	257.610	µg/kg	2.14	1.07
Ni	231.604	µg/kg	13.42	0.87

Pb	220.353	µg/kg	6.39	0.86
Zn	213.856	µg/kg	2.26	0.71
As (AAE-GH)	N. A	µg/kg	0.04	0.01

Los resultados muestran bajas concentraciones de metales en comparación con el resultado de Hg (112,43 µg/kg) para el mismo tejido caracterizado (branquia). El valor encontrado para Cd, es relativamente bajo comparado con el nivel de Hg, sin embargo, es superior a los límites recomendados por las autoridades ambientales para trazas de dicho metal en alimentos. Los datos presentados, muestran correspondencia con la problemática descrita sobre la contaminación por Hg en Colombia.

10 Ejemplo 6. Prueba de detección de mercurio

Se emplea Hg²⁺ standard, 1000 mg/L en agua. El solvente utilizado es agua desionizada. Las soluciones e incubaciones se preparan en viales de vidrio de 10 ml. La limpieza de los viales se realiza con agua desionizada, con ultrasonido a 60 °C durante 45 min y secado en mufla de alta temperatura a 100 °C por 12h.

El tejido branquial se disecciona para tener una masa estándar de 0,14 gr, por muestra. Posteriormente, las muestras se incuban en agua desionizada con concentraciones de Hg²⁺ (entre 0 y 10000 µg/L), a temperatura ambiente durante 4 horas.

En el proceso de incubación se evidencian alteraciones morfológicas y volumétricas para las tres concentraciones más altas de Hg²⁺ esta alteración y posible necrosis se explica en una publicación [13].

25

Se repite el procedimiento realizado para las pruebas en medio acuoso, la sonda fluorescente se prepara con una concentración de 100 µg/L y utilizando agua desionizada (Figura 16). Se hace incubación de las muestras, previamente lavadas con agua desionizada, con la sonda fluorescente en las mismas condiciones de laboratorio de la anterior incubación, realizada con Hg²⁺. Se evidencia cambio de color en función del aumento en la concentración de Hg²⁺,

30

se propone realizar una correlación entre los resultados obtenidos en las pruebas de medio acuoso y el análisis de microscopia de las muestras incubadas para determinar los parámetros de protocolo de uso y calibración de la sonda de detección en tejido branquial.

5

Se presenta una comparación de incubación de la sonda de detección en tejido branquial para Hg^{2+} de 0 y 1000 $\mu\text{g/L}$ respectivamente (Figura 17). Este resultado, permite proponer un método colorimétrico “de vial” para detección de Hg^{2+} .

10

La figura 18 evidencia la emisión fluorescente de la sonda de detección durante el proceso de incubación en muestras con variación de concentración de Hg^{2+} . Las imágenes permiten reconocer la variación de intensidad de fluorescencia en función de los valores de Hg^{2+} con los que son incubadas las muestras previamente.

15

La emisión fluorescente observada (Figura 18), permite validar una configuración de detección con “método de vial”, proponiendo la estandarización de parámetros de detección y calibración (longitud e intensidad de luz UV, transducción de señal fluorescente, etc.). Como se puede observar en los dos últimos viales presentados en la imagen (X1 y X2, Figura 18), el tipo de vidrio puede influir en la percepción de emisión fluorescente, situación que no sucede con lo observado con luz natural (Figura 16).

20

Se presenta la figura 19 que muestra las variaciones de color e intensidad en la emisión fluorescente de los tejidos con diferentes concentraciones de Hg^{2+} y la sonda de detección. Los resultados muestran una disminución de la intensidad en función del aumento de concentración de Hg^{2+} . Por tanto, se puede afirmar que la sonda de detección diseñada funciona tipo On – Off, para concentraciones de Hg^{2+} en tejido branquial.

30

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bradley, M. A., Barst, B. D. & Basu, N. A Review of Mercury Bioavailability in Humans and Fish. (2017). Doi:10.3390/ijerph14020169.
2. Moiseenko, T.I., Gashkina, N.A. Bioaccumulation of mercury in fish as indicator of water pollution (2016) *Geochemistry International*, 54 (6), pp. 485-493.
- 5 3. Burch, J. B., Wagner Robb, S., Puett, R., Cai, B., Wilkerson, R., Karmaus, W. Svendsen, E. (2014). Mercury in fish and adverse reproductive outcomes: Results from South Carolina. *International Journal of Health Geographics*, 13(1) doi:10.1186/1476-072X-13-30.
4. Hughner, R. S., Maher, J. K., & Childs, N. M. (2008). Review of food policy and consumer issues of mercury in fish. *Journal of the American College of Nutrition*, 27(2), 185-194.
- 10 5. Made, M., Yin, Y., Zhang, D. & Liu, J. Methods and recent advances in speciation analysis of mercury chemical species in environmental samples: a review. *Chem. Speciat. Bioavailab.*28, 1–15 (2016).
6. Black, F. J., Bokhutlo, T., Somoxa, A., Maethamako, M., Modisaemang, O., Kemosedile, T., Chimbari, M. (2011). The tropical 22oronta mercury anomaly: Lower than expected mercury concentrations in fish and human hair. *Science of the Total Environment*, 409(10), 1967-1975.
- 15 7. Bose-O'Reilly, S., Lettmeier, B., Matteucci Gothe, R., Beinhoff, C., Siebert, U., & Drasch, G. (2008). Mercury as a serious health hazard for children in gold mining areas. *Environmental Research*, 107(1), 89-97. Doi:10.1016/j.envres.2008.01.009.
- 20 8. Escudero LB, Olsina RA, Wuilloud RG. Polymer-supported ionic liquid solid phase extraction for trace inorganic and organic mercury determination in water samples by flow injection-cold vapor atomic absorption spectrometry. *Talanta*. 2013; 116:133–140.
9. David González-Morales, Asmilly Valencia, Astrid Díaz-Nuñez, Marcial Fuentes-Estrada, Oswaldo López-Santos, Olimpo García-Beltrán. Development of a Low-Cost UV-Vis Spectrophotometer and Its Application for the Detection of Mercuric Ions Assisted by Chemosensors. *Sensors*, 20, 906 (2020).
- 25 10. Nakoe, M. R., Ardian, Y., Ruhardi, A., Dwinugroho, F., Yudhastuti, R., Sulistyorini, L., Indriani, D. (2014). Risk assessment exposure of mercury (hg) at people who consuming nila fish (22orontalo22s niloticus) from limboto lake of 22orontalo province. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 5(5), 1420-1427129.
- 30 11. Toth, T., Kopernicka, M., Harangozo, L., Bobkova, A. & Bobko, M. Mercury and Nickel Contents in Fish Meat. 49, 23–28 (2016).
- 35 12. Chen, X., Zhang, W. -, Huang, W. -, Yang, X. -, & Geng, Y. -. (2018). Correlation analysis of total mercury and methyl mercury in marine fishes from two coastal regions in Guangdong. *Modern Food Science and Technology*, 34(7), 273-279 and 250.
- 40 13. Cordeiro, F. & Version, C. Determination of methylmercury in seafood by elemental mercury analysis: Standard operating procedure. (2013), European Commission, Joint Research, Centre Institute for Reference Materials and Measurement.

