

AVANCES

EN CIENCIAS E INGENIERIAS

Publicación Semestral de la Universidad San Francisco de Quito www.usfq.edu.ec
ISSN 1390-5384



 UNIVERSIDAD
SAN FRANCISCO

DICIEMBRE 2011
www.usfq.edu.ec/publicaciones/avances/

AVANCES

EN CIENCIAS E INGENIERÍAS

Editor

Cesar Zambrano, Ph.D.

Vice Decano del Colegio de Ciencias e Ingeniería

Co-Editor

Diego F. Cisneros-Heredia, M.Sc.

Coordinador de Comunicación y Difusión Científica

Consejo Editorial

Santiago Gangotena, Ph.D.
Canciller

Carlos Montúfar, Ph.D.
Presidente Académico

Ing. Fernando Romo, M.Sc.
*Decano del Colegio de
Ciencias e Ingeniería*

Stella de la Torre, Ph.D.
*Decana del Colegio de
Ciencias Biológicas y Ambientales*

Ximena Córdova, Ph.D.
*Vice Decana del Colegio de
Ciencias e Ingeniería*

María de Lourdes Torres, Ph.D.
*Vice Decana del Colegio de
Ciencias Biológicas y Ambientales*

Producción y Distribución

F. Javier Torres, Ph.D.

Editor de Producción

Julio Ibarra, M.Sc.

Coordinador de Distribución

Editores Asociados - USFQ

Carlos Montúfar, Ph.D.

Fernando Romo, M.Sc.

Stella de la Torre, Ph.D.

María de Lourdes Torres, Ph.D.

Ximena Córdova, Ph.D.

René Játiva, M.Sc.

F. Javier Torres, Ph.D.

Edison Bonifaz, Ph.D.

Fausto Pasmay, M.Sc.

Julio Ibarra, M.Sc.

Carlos Marín, Ph.D.

Darío Niebieskikwiat, Dr.

Alexis Hidrobo, Dr.

Carlos Valle, Ph.D.

Carlos Fabara, M.Sc.

Sonia Zapata, M.Sc.

Editores Asociados - Externos

Eric E. Dueno, Ph.D.

Bainbridge College

John G. Blake, Ph.D.

University of Florida

Bette A. Loiselle, Ph.D.

University of Florida

Theofilos Toulkeridis, Ph.D.

Escuela Politécnica del Ejército

Cesar Costa, Ph.D.

Escuela Politécnica Nacional

Marcelo Albuja, M.Sc.

Escuela Politécnica Nacional

Robert Cazar, M.Sc.

Escuela Superior Politécnica del Chimborazo

Carlos Ventura, Ph.D., P.E., P.Eng.

The University of British Columbia

Diseño e Impresión

G&R, USFQ

Web Master

Diego Cisneros-Heredia

Avances en Ciencias e Ingenierías es una publicación científica, multidisciplinaria, que publica trabajos originales producidos por investigadores de cualquier institución o país que deseen reportar resultados de alta calidad y relevancia en todas las áreas de las ciencias y las ingenierías, incluyendo trabajos en la interfase de varias disciplinas. Avances en Ciencias e Ingenierías tiene como propósito divulgar trabajos de investigación de importancia dirigidos a la comunidad científica local e internacional.

Guía para autores

Todos los manuscritos deben cumplir los lineamientos mínimos de esta guía, caso contrario serán devueltos a los autores para su corrección. Se recibirán manuscritos en formatos de Microsoft Word, OpenOffice Writer y LaTeX. No se aceptarán manuscritos enviados en formato PDF. Para manuscritos en LaTeX se debe seguir el estilo disponible en la página web de la revista (usfq.cls). Los manuscritos con más de 2000 palabras serán considerados como *Artículos* y deben tener: (a) Título, nombres de los autores, afiliación institucional y direcciones postales; (b) Resumen y Abstract; (c) Introducción; (d) Metodología; (e) Resultados y Discusión; (f) Agradecimientos; (g) Referencias bibliográficas; (h) Leyendas de figuras y tablas. Los manuscritos con menos de 2000 palabras serán considerados *Comunicaciones Breves* y deben tener: (a) Título, nombres de los autores, afiliación institucional y direcciones postales; (b) Resumen y Abstract; (c) Texto –sin divisiones adicionales– (d) Agradecimientos; (e) Referencias bibliográficas; (f) Leyendas de figuras y tablas. Las figuras no deben incluirse en el archivo del manuscrito. El texto y las tablas van en un mismo archivo, mientras que las figuras serán enviadas en archivos separados. Si las figuras o tablas han sido previamente usadas, es responsabilidad del autor el obtener el permiso necesario.

Formato del Manuscrito

- El manuscrito deberá ser escrito usando un tipo de letra *Times New Roman* con un tamaño de letra de 11 puntos y a espacio seguido. Los márgenes deben ser de 30 mm a la izquierda y 15 mm a la derecha.
- El título debe ser conciso y directo, indicando los elementos claves. Debe ser escrito con un tamaño de letra de 12 puntos, en negrillas, centrado y sólo la primera palabra debe ser mayúscula.
- La afiliación completa de cada investigador debe ir asociada con su nombre por medio de superíndices y colocarse separada por una línea debajo de los nombres con un tamaño de letra de 10 puntos. El autor para correspondencia debe ir claramente identificado por un asterisco y se debe incluir su correo electrónico.
- Todo artículo deberá incluir como mínimo un resumen detallado en español y un abstract detallado en inglés. Cada uno será redactado en un párrafo continuo y no debe superar las 300 palabras.
- La introducción debe ser concisa y detallada, revisando literatura relevante y actual, y presentando antecedentes del estudio, datos sobre su importancia, justificación y objetivos.
- La primera vez que una especie de ser vivo sea mencionada, debe siempre ir primero su nombre científico (en cursiva), luego del cual se puede mencionar el nombre común (con formato de nombre propio).
- Las referencias en el texto deben ir numeradas secuencialmente y se colocarán al final de la oración correspondiente dentro de un corchete, ejemplos: [10], [10,15,22], [12-20]
- Las abreviaciones deberán usarse lo menos posible y no deberán permitir ambigüedad alguna. El significado de todas las abreviaciones deberá ser indicado la primera vez que se use la abreviación.
- Las tablas y figuras deberán estar citadas con números arábigos en el orden que aparezcan en el texto; ejemplos: Tabla 1; Tablas 1-3; Figura 1; Figuras 1,4; Figuras 1-3
- Cada tabla o figura debe tener su propia leyenda explicativa, la cual debe ser corta y comprensible sin hacer referencia al texto y será colocada debajo de la tabla o figura respectiva.
- La lista de referencias debe titularse: Referencias Bibliográficas; y debe ordenarse de acuerdo al orden de aparición en el texto del manuscrito y su formato seguirá los ejemplos detallados en:
<http://www.usfq.edu.ec/Publicaciones/Avances/Paginas/ParaAutoresyrevisores.aspx>

Instrucciones para Figuras

Las figuras deben ser enviadas en alta resolución. Las fotografías en blanco y negro, fotografías a color y mapas y gráficos realizados en programas basados en raster (e.g. Photoshop, Gimp) deben ser enviadas en formato *.tiff de 1000 píxeles.

Envío del Manuscrito

Los manuscritos deben ser enviados al Editor, Cesar Zambrano, vía correo electrónico a la dirección: usfq-avances@usfq.edu.ec. Al enviar el manuscrito, los autores deben confirmar en su mensaje de envío que el manuscrito no ha sido publicado o sometido para publicación en otro sitio y que todos los autores han participado en el desarrollo del manuscrito, lo han leído y están de acuerdo con su envío.

Revisión del Manuscrito

Los manuscritos serán manejados por el Co-Editor y los Editores Asociados, quienes enviarán el manuscrito para evaluación por parte de revisores externos reconocidos (nacionales e internacionales) en cada área. Los autores del artículo pueden sugerir revisores apropiados (no ligados directamente al desarrollo del estudio reportado). Los principales criterios para la aceptación son originalidad, rigor científico, contexto, relevancia y seguimiento del estilo y formato requerido para la revista. Nuestro objetivo es indicar a los autores la decisión tomada en un tiempo máximo de ocho semanas luego del envío.

Pruebas de Imprenta y Publicación del Manuscrito

Las pruebas de imprenta serán enviadas al autor para correspondencia como un archivo PDF. Las pruebas revisadas y corregidas deben ser enviadas al Editor dentro de 15 días hábiles luego de su recepción. El autor para correspondencia recibirá vía correo electrónico un archivo PDF en alta definición de su artículo y 1 revista impresa para cada co-autor, entregada vía correo postal.

Avances en Ciencias e Ingenierías –ISSN 1390-5384–

Publicación semestral (Junio y Diciembre) de la Universidad San Francisco de Quito
Diego de Robles y Vía Interoceánica, Quito, Ecuador.
Telf. Ed. +593 2 297 1700 Ext. 1451 FAX +593 2 289 0070.
Email Comité Editorial: usfq-avances@usfq.edu.ec
<http://www.usfq.edu.ec/Publicaciones/Avances>

La Universidad San Francisco de Quito, a través de su revista Avances en Ciencias e Ingenierías se une a la celebración del año internacional de la Química 2011 al publicar este volumen especial que contiene artículos valiosos en varias ramas de la Química. El año internacional de la Química, 2011 es una iniciativa de la IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) y de la UNESCO (United Nations Educational, Scientific, and Cultural Organization) para conmemorar los 100 años del Premio Nobel otorgado a Marie Curie por su importante contribución científica al descubrir los elementos Radio y Polonio. Adicionalmente, esta apología internacional tiene como objetivos presentar a la Química como (i) una ciencia esencial para el desarrollo sustentable, (ii) un instrumento que cumple con los requerimientos para mejorar nuestra vida, (iii) un área de conocimiento cautivador de mentes jóvenes y adultas, y (iv) un campo de trabajo interdisciplinario y abundante donde mujeres y hombres pueden realizar contribuciones importantes para el avance de la ciencia. Por lo tanto, ponemos a su consideración este aporte académico que esperamos contribuya a incentivar el interés por la investigación en esta rama científica tan trascendental para el progreso de la humanidad.

Cesar Zambrano, Ph.D.
Editor-en-Jefe, Avances en Ciencias e Ingenierías
Universidad San Francisco de Quito

SECCIÓN A: CIENCIAS EXACTAS

- A1–A4 ■** **Optimization of a UV-Visible Spectrophotometer Response Using a Fractional Factorial Design**
Robert A. Cazar
Avances, 2011, Vol. 3, No. 2, Pags. A1-A4
-
- A5–A13 ■** **Development of Analytical Methods to Quantify Perfluorooctane Sulfonate and Related Compounds in the Environment**
Valeria Ochoa-Herrera, Jim A. Field and Reyes Sierra-Alvarez
Avances, 2011, Vol. 3, No. 2, Pags. A5-A13
-
- A14–A21 ■** **Cuantificación de cationes metálicos en agua con LIBS por deposición sobre una superficie de acero rayada con lápiz HB**
Diego Jijón, César Costa Vera
Avances, 2011, Vol. 3, No. 2, Pags. A14-A21
-
- A22–A29 ■** **Implementing a Quadrature NMR Spectrometer based on a passive RC splitter-combiner network**
Dennis Cazar Ramírez, Marco Villa
Avances, 2011, Vol. 3, No. 2, Pags. A22-A29
-
- A30–A34 ■** **Estudio computacional B3LYP de la interacción del hidrógeno molecular [H₂] con *rcce* R-Pyg[4]arenos [R = metil, flúor] funcionalizados con Li⁺**
Andrés S. Urbina, Andrea A. Saltos, F. Javier Torres
Avances, 2011, Vol. 3, No. 2, Pags. A30-A34
-
- A35–A45 ■** **ADN G-cuádruple: caracterización inicial de los mecanismos de formación de oligómeros por mecánica molecular**
Miguel Angel Méndez, Andrea C. Montero
Avances, 2011, Vol. 3, No. 2, Pags. A35-A45
-
- A46–A49 ■** **Isolation and identification of secondary metabolites from *Artemisia sodiroi* Hieron**
Talía Briceño, César M. Compadre, Paola Ordóñez
Avances, 2011, Vol. 3, No. 2, Pags. A46-A49
-
- A50–A55 ■** **Caracterización por Espectrometría de Masas MALDI de Cucurbit[n]uriles (n = 6,7,8)**
María Emilia Dueñas, Sebastián Manzano, Vanessa Jiménez, Cesar Zambrano, Cristian Santacruz, César Costa Vera
Avances, 2011, Vol. 3, No. 2, Pags. A50-A55
-

Optimization of a UV-Visible Spectrophotometer Response Using a Fractional Factorial Design

Robert A. Cazar^{1,2}

¹Facultad de Ciencias, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

Panamericana Sur, Km. 1.5, Riobamba, Ecuador

²Grupo Ecuatoriano para el Estudio Experimental y Teórico de Nanosistemas –GETNano–

Diego de Robles y Via Interoceánica, Universidad San Francisco de Quito

E-mail: robert.cazar@gmail.com

Editado por/Edited by: Farlos Fabara, M.Sc.

Recibido/Received: 10/10/2011. Aceptado/Accepted: 10/17/2011.

Publicado en línea/Published on Web: 12/20/2011. Impreso/Printed: 12/20/2011.

Abstract

Three operation parameters of a UV-visible spectrophotometer (scan speed, monochromator slit width, and sampling interval) were optimized utilizing a fractional factorial design. Four absorption spectra of holmium oxide were recorded in a portion of the visible region (560-610 nanometers) using different combinations of “high” and “low” levels for the parameters already mentioned. The combinations were provided by a 2^{3-1} design. From the results it is deduced that the highest quality spectrum is furnished by the following combination: high scan speed, narrow monochromator slit width (0.2 nm.) and small sampling interval (one data point per each 0.1 nanometer). This work illustrates the usefulness of fractional factorial design as an optimization tool in the analytical chemistry laboratory.

Keywords. UV-visible spectroscopy, fractional factorial design, optimization.

Resumen

Tres parámetros de operación de un espectrofotómetro UV-visible (velocidad de barrido, ancho de ranura del monocromador e intervalo de muestreo) fueron optimizados utilizando un diseño factorial fraccionado. Cuatro espectros de absorción de óxido de holmio fueron registrados en una porción de la región visible (560-610 nanómetros) usando diferentes combinaciones de niveles “altos” y “bajos” para los parámetros ya mencionados. Las combinaciones fueron provistas por un diseño 2^{3-1} . De los resultados se deduce que el espectro de más alta calidad es proporcionado por la siguiente combinación: alta velocidad de barrido, ancho de ranura del monocromador pequeño (0.2 nanómetros) e intervalo de muestreo pequeño (un punto por cada 0.1 nanómetro). Este trabajo ilustra la utilidad del diseño factorial fraccionado como una herramienta de optimización en el laboratorio de química analítica

Palabras Clave. Espectroscopía UV-visible, diseño factorial fraccionado, optimización

Introduction

UV/visible absorption spectroscopy is one of the most widely utilized techniques for quantitative and qualitative chemical analysis. This type of spectroscopy employs a spectrophotometer which records the different frequencies of UV/visible radiation absorbed by a species and translates these measurements into a graphic output known as absorption spectrum. Typically, a spectrophotometer has five basic components namely, a radiation source, a sample holder, a frequency selector or monochromator, a detector, and a read-out device.

The absorption spectrum quality critically depends on

some operation parameters which can be tuned by the experimenter [1]. For example, monochromator slit width can be reduced to improve spectrum resolution. A narrow slit width produces sharper, more defined peaks, however there is a limit beyond which further slit width reduction causes a significant decrease of radiant signal power making it difficult to measure. Hence, it is advisable to reduce the slit width only enough to obtain a spectrum with good resolution. The scan speed also affects spectrum quality. Slow scan speeds produce spectra with good level of detail; on the other hand, high scan speeds produce less detailed spectra. Sampling interval, that is, the number of points per wavelength unit

ISSN 1390-5384



recorded by the instrument is another parameter that influences spectrum quality. A small sampling interval leads to a detailed spectrum; the opposite is observed when a large sampling interval is used. Once the factors affecting the spectrum quality have been identified, the experimenter has to devise a set of experiments which will provide information about the combination of parameter settings that produce the optimal response. Because of its advantages, fractional factorial analysis is the most appropriate for such a purpose. In fact, fractional factorial analysis has proved to be a very useful tool for optimization of a variety of chemical systems [2, 3].

Methods

The optimal response of a process or analysis may be obtained from the proper combination of levels for the factors that influence such response. Experimental design methods provide strategies for systematically varying the values of these factors until the combination that guarantees the best result is found. They furnish the minimum number of experiments necessary for optimizing a system [4]. The experimental design methods most commonly used for optimizing chemical procedures are full factorial and fractional factorial designs.

In the simplest version of full factorial design, two levels known as “high” and “low” are attributed to each factor. The levels are selected by the experimenter based on his experience and knowledge of the process. The number of experiments to be performed is given by 2^n , with n being the amount of factors under study. This number provides all the possible combinations of levels for the factors. The low level is usually represented by a minus sign and the high level by a plus sign. For instance, a full factorial design for three factors (A, B and C) consists of the following eight experiments:

Experiment Number	A	B	C	Response
1	-	-	-	y_1
2	+	-	-	y_2
3	-	+	-	y_3
4	+	+	-	y_4
5	-	-	+	y_5
6	+	-	+	y_6
7	-	+	+	y_7
8	+	+	+	y_8

Table 1: A full factorial design with three factors.

This arrangement is called *experimental matrix* and it is constructed as follows: in the first column, one “-” and one “+” signs are alternated until the 2^n entries are completed. In the second column, two “-” and two “+” signs are alternated; and in the third, four “-” and four “+” signs are alternated [5]. In general, for column j ,

2^{j-1} “-” signs and 2^{j-1} “+” signs are alternated. Such procedure guarantees each experiment is a unique combination of levels. From the experimental matrix the following items can be calculated:

- The average response
- The main effects (effects of the original factors)
- The effects of multiple-factor interactions (synergy or antagonism effects among two, three or more factors)
- The effect of the interaction among all the factors under consideration.

In some occasions, the number of factors under study may be large and consequently the amount of experiments to perform in a full factorial design becomes too high. For instance, 6 factors require 64 experiments, which are already a lot either in the laboratory or at industrial level, 7 factors require 128 experiments, 8 factors require 256 experiments and so on. Full factorial designs require so many experiments because they evaluate the importance of not only the main effects but also the multiple-factor interactions [6]. In practical applications it is fairly uncommon that interaction effects of more than two factors affect the response. In fact, $n + 1$ experiments is the minimum requirement to evaluate the effect of n factors.

Fractional factorial designs take advantage of the generally correct assumption that interaction effects of order higher than two are negligible to drastically reduce the number of experiments to be carried out. In these designs the required number of experiments is given by 2^{n-p} where n is the number of factors and p is the “degree of fractioning” which can assume the values 1, 2, ..., $n - 1$. The experimental matrix for a 2^{3-1} fractional factorial design is as follows:

Experiment Number	A	B	C	Response
1	-	-	+	y_1
2	+	-	-	y_2
3	-	+	-	y_3
4	+	+	+	y_4

Table 2: A 2^{3-1} fractional factorial design.

For the first two factors (A and B) the signs “-” and “+” are alternated in identical way of a complete design, but for third factor (C) a sequence of signs corresponding to the interaction of the first two is used. It is inevitable to lose some information, but instead of eight experiments now only four are required to optimize the response.

Factor	-	+
Scan speed (X_1)	Low	High
Slit width (X_2)	0.2 nm	5 nm
Sampling interval (X_3)	0.1 nm	2 nm

Table 3: Levels for the factors under study

Experiment Number	X_1	X_2	X_3
1	-	-	+
2	+	-	-
3	-	+	-
4	+	+	+

Table 4: Experimental design used in this work

Results y Discussion

Holmium oxide was used as analite. This compound features an important number of sharp, stable absorption peaks in the region between 240 and 640 nanometers. Because of such characteristics, holmium oxide is a standard to validate the wavelength scale of a UV/visible spectrophotometer [7]. A 2^{3-1} fractional factorial design was applied using scan speed, monochromator slit width, and sampling interval as factors. Factor levels are included in Table 3.

The experimental matrix for the proposed design is presented in Table 4. The experiments were carried out in a Shimadzu 1201S UV/visible spectrophotometer. This is a programmable, single beam instrument which works in the spectral region between 220 and 1100 nanometers.

Figure 1 shows the spectra obtained from the four experiments generated by the design. Each spectrum was graded according to its quality in a scale from 0 to 100 and those values were utilized as the responses for the analysis. Table 5 presents such results.

Experiment Number	X_1	X_2	X_3	Response
1	-	-	+	75
2	+	-	-	95
3	-	+	-	90
4	+	+	+	70

Table 5: Experimental matrix including responses

Yates algorithm [8] was used to estimate the factor effects. The following values were obtained,

Average response:	82.5
X_1 effect:	0.0
X_2 effect:	-5.0
X_3 effect:	-20.0

Table 6: Main factor effects.

Because for this design interaction effects cannot be distinguished from main effects, the interpretation of the results is centered exclusively in the main factor effects. It is observed that the effect of changing the scan speed level from low to high while keeping constant the other factors does not alter the response. On the other hand,

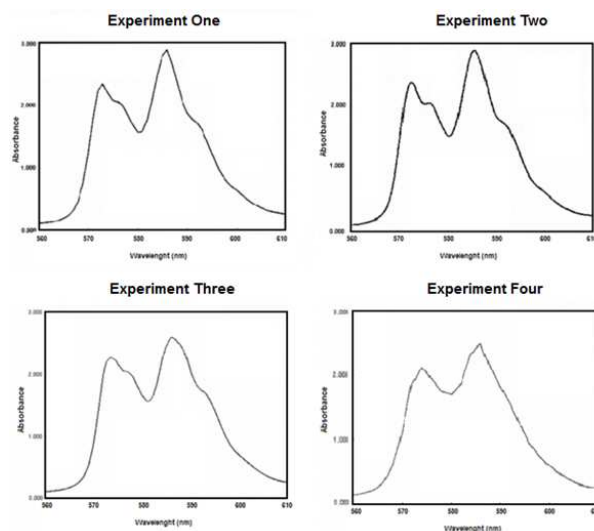


Figure 1: Spectra obtained performing the experiments generated by the fractional factorial design. The region between 560 and 610 nanometers was scanned.

the effect of changing the slit width level from low to high while keeping constant the other factors produce a 5 unit decrease in the response. Finally, the effect of changing the sampling interval level from low to high while keeping constant the other factors produces a 20 unit decrease in the response. These results suggest that in order to obtain the best response, the monochromator slit width and sampling interval should be kept at low levels to avoid a decrease in the response, while scan speed could assume either of its two levels because it has no effect on the response. From the available experiments, the only one that meets the conditions stated above is experiment number two (+, -, -). Therefore, this one was selected as the most appropriate combination of factor levels to obtain the best instrumental response.

Conclusions

A fractional factorial experimental design was applied to optimize the response of a UV/visible spectrophotometer. Three instrument operation parameters (scan speed, monochromator slit width, and sampling interval) were considered and a 2^{3-1} design was utilized. The combination of high scan speed, narrow monochromator slit width, and low sampling interval produces the optimal response. The work illustrates the usefulness of this type of experimental design for optimization purposes in the analytical chemistry laboratory.

References

- [1] Skoog, D., H.J. and Crouch, S. 2006. "Principles of Instrumental Analysis". Thomson Brooks-Cole: Belmont, USA.
- [2] Bouzidi, N., and Gozzi, C. 2008. "Experimental Design and Optimization: Application of a Grignard Reaction". *J. Chem. Ed.* 85, 1544-1548.

- [3] Bezerra, M., 2008. "Response Surface Methodology (RSM) as a Tool for Optimization in Analytical Chemistry". *Talanta*. 76, 965–977.
- [4] Montgomery, D., 2005. "Design and Analysis of Experiments".
- [5] Miller, J., and Miller, J.C. 2005. "Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry". *Pearson Prentice Hall: New York, USA*.
- [6] Gunst, R., and Mason, R. 2009. "Fractional Factorial Design". *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Statistics*. 1, 234–244.
- [7] Allen, D., 2007. "Holmium Oxide Glass Wavelength Standards". *Journal of Research of the National Institute of Standards and Technology*. 112, 303–306.
- [8] Wu, J., and Hamada, M. 2000. "Experiments: Planning, Analysis and Parameter Design Optimization".

Development of Analytical Methods to Quantify Perfluorooctane Sulfonate and Related Compounds in the Environment

Valeria Ochoa-Herrera^{1,2}, Jim A. Field² and Reyes Sierra-Alvarez²

¹Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales - COCIBA,

Universidad San Francisco de Quito, Diego de Robles y Vía Interoceánica S/N, Quito, Ecuador

²Department of Chemical and Environmental Engineering, University of Arizona,

Tucson, AZ 85721-0011, USA

*Autor principal/Corresponding author, e-mail: vochoa@usfq.edu.ec

Editado por/Edited by: C. Zambrano, Ph.D.

Recibido/Received: 10/24/2011. Aceptado/Accepted: 10/30/2011.

Publicado en línea/Published on Web: 12/20/2011. Impreso/Printed: 12/20/2011.

Abstract

Analytical techniques based on ¹⁹F NMR spectroscopy and HPLC-suppressed conductivity detection were developed to detect and quantify aqueous perfluorooctane sulfonate (PFOS), perfluorooctanoic acid (PFOA), and perfluorobutane sulfonate (PFBS). Chromatographic separation of the perfluoroalkyl surfactants (PFAS) was performed using a C¹⁸ reversed-phase column and a mobile phase consisting of a mixture of boric acid and acetonitrile. The detection limit for PFOS by ¹⁹F NMR was 3.6 mg L⁻¹. The detection limit for PFOS, PFOA and PFBS by HPLC-suppressed conductivity detection was 1 mg L⁻¹. The detection limits were shown to improve considerably if samples were pre-concentrated by solid-phase extraction. The detection limits for PFOS of pre-concentrated samples were 3.6 mg L⁻¹ and 10 µg L⁻¹ by ¹⁹F NMR and HPLC-suppressed conductivity detection, respectively. Comparison of these two methodologies showed that HPLC-suppressed conductivity detection should be preferred for routine quantification of these contaminants due to its simplicity, time efficiency, and accuracy. Conversely, ¹⁹F NMR can be used to characterize changes in the chemical structure of fluorinated compounds due to its inherent advantage of high specificity and no matrix interferences. The feasibility of utilizing total organic carbon (TOC) and chemical oxygen demand (COD) analysis for the quantitative detection of PFOS in aqueous samples was also investigated. Although, the TOC analysis provided reliable quantification of PFAS in aqueous samples, the non-specificity is a drawback of the technique. The dichromate-based COD method was found unsuitable for the analysis of PFOS due to the incomplete oxidation of the highly stable perfluorinated compound under the conditions evaluated.

Keywords. PFAS, PFOS, PFOA, PFBS, ¹⁹F NMR, HPLC, suppressed conductivity detector, TOC and COD.

Abstract

Métodos analíticos basados en ¹⁹F NMR y HPLC con detector de conductividad suprimida fueron desarrollados para detectar y cuantificar sulfonato de perfluorooctano (PFOS), ácido perfluorooctanoico (PFOA) y sulfonato de perfluorobutano (PFBS) en muestras ambientales. La separación de los surfactantes perfluorinados (PFAS) se realizó con una columna C¹⁸ de fase reversa y una fase móvil compuesta de ácido bórico y acetonitrilo. El límite de detección para PFOS con ¹⁹F NMR fue 3.6 mg L⁻¹, mientras que para PFAS con HPLC con detector de conductividad suprimida fue 1 mg L⁻¹. Los límites de detección mejoraron considerablemente si las muestras fueron pre-concentradas a través de una extracción en fase sólida (SPE) registrando valores para PFOS con ¹⁹F NMR y HPLC con detector de conductividad suprimida de 3.6 mg L⁻¹ y 10 µg L⁻¹, respectivamente. Esta última demostró ser la mejor técnica para análisis rutinario de cuantificación de contaminantes fluorinados debido a su simplicidad, rapidez y precisión. ¹⁹F NMR fue muy efectiva para detectar y caracterizar cambios en la estructura química de los compuestos fluorinados ya que es una técnica analítica altamente específica en la que la matriz ambiental no interfiere con el análisis. El análisis de carbono orgánico total (TOC) y la determinación de la demanda química de oxígeno (COD) para la cuantificación de PFOS en muestras acuosas también fueron estudiados. A pesar de que los análisis de TOC permitieron cuantificar exitosamente PFAS, la falta de especificidad de este método es una limitación considerable. Finalmente, el análisis de PFOS a través de la determinación de COD no fue posible debido a una oxidación incompleta de los altamente estables compuestos fluorinados bajo las condiciones de operación evaluadas.

Palabras Clave. PFAS, PFOS, PFOA, PFBS, ¹⁹F NMR, HPLC, detector de conductividad suprimida, TOC and COD.

Introduction

Perfluoroalkyl sulfonates and perfluorocarboxylic acids such as perfluorooctane sulfonate (PFOS) and perfluorooctanoic acid (PFOA) have been the subject of numerous studies in recent years. These perfluorinated alkyl surfactants (PFAS) are of particular interest due to their tendency to bioaccumulate in higher organisms, persistence in the environment, and toxicity [1, 2, 3]. PFOS and PFOA have been detected in blood samples in various populations [4, 5], in wildlife throughout the world [6, 7, 8], and in aqueous and solid environmental matrices [9, 10].

Aqueous environments seem to be the primary sink for PFAS [11, 3] due to the relatively high solubility of these compounds (*i.e.*, 3.4 and 0.5 g L⁻¹ for PFOA and PFOS in pure water, respectively [12, 13]), their negligible vapor pressure (*i.e.*, 1.33 x 10⁻⁵ and 3.31 x 10⁻⁴ Pa at 20°C and 25°C for PFOA and PFOS, respectively), and moderate sorption to organic matter [14, 15]. Literature studies have reported significant PFAS concentrations in surface waters [16, 17, 18, 19, 20, 21, 22]. For instance, Skutlarek and coworkers [22] measured total PFAS concentrations as high as 4.385 ng L⁻¹ in the Mochne River at Heidberg, Germany. In the same study, PFOA and PFOS were detected at concentrations of 3.640 and 247 ng L⁻¹, respectively.

The analysis of perfluorinated surfactants in environmental samples has been primarily conducted by liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LC-MS) or tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) [23, 24, 25]. The accuracy and precision of these techniques make them very valuable for quantification of these pollutants. However, ion suppression due to matrix effects, sample contamination and elevated analysis cost limit the application of LC-MS or LC-MS/MS for routine analysis of environmental samples [26, 27]. Gas chromatography mass spectrometry (GC-MS) has also been employed for the analysis of PFAS [28, 25, 29]. The low volatility of the perfluoroalkane sulfonates requires the application of derivatization techniques to make them amenable to GC-MS analysis. Derivatization of PFOS compounds is problematic because esterified PFOS derivatives are not very stable [23, 30], and derivatization-reaction yields are often poor [31]. The derivatization-step makes this method time-consuming and not suitable for routine monitoring of non-volatile PFAS.

PFOS and related compounds have also been quantified by ¹⁹F NMR spectroscopy. Moody and colleagues [32] reported the quantification of PFOA and PFOS in surface water samples by means of this spectroscopy technique. Recently, two studies have been published on the quantification of isomers in technical PFOS by ¹⁹F NMR [33, 34].

The lack of reliable commercial standards limits the accurate analysis of PFAS in aqueous samples. Perfluoroalkyl sulfonyl-based chemicals commonly produced

by electrochemical fluorination processes (ECF) are often mixtures of linear and branched isomer compounds [35, 36]. Commercial PFOS samples from fine-chemical manufacturers labeled as > 98% pure have been shown to contain 20-30% branched PFOS isomers [34, 37, 38, 39]. The quality assurance of the analysis of perfluorinated surfactants might be improved by the use of commercially available ¹³C-labeled and deuterium-labeled standards [23, 25]. However, ¹³C-label standards are not optimal for all samples matrices, therefore careful selection of the internal standard for each type of matrix is required. In addition, traces of other PFAS can be found in these standards [25]. Currently, there are two mass-labeled standards for linear PFOS, ¹³C-PFOS and ¹⁸O₂-PFOS [40, 5].

The objective of this research is to develop analytical methods relying on ¹⁹F NMR spectroscopy and HPLC with suppressed conductivity detection to monitor PFOS and related compounds in aqueous environmental matrices. Quantification of perfluoroalkyl compounds was also investigated by means of TOC and COD analysis.

Materials and Methods

Chemicals

Perfluorooctane sulfonic acid potassium salt, PFOS (98% purity), and 1H,1H,2H,2H-tetrahydroperfluorooctane sulfonate, TH-PFOS (98%) were purchased from SynQuest Laboratories (Alachua, FL). Perfluorobutane sulfonic acid potassium salt, PFBS (98.2%), was kindly provided by the 3M Company (St. Paul, MN). Perfluorooctanoic acid, PFOA (96%), sodium fluoride (99%), chromium (III) acetylacetonate, Cr(acac)₃ (97%), and potassium hydrogen phthalate (99%) were obtained from Sigma - Aldrich (St. Louis, MO). 4'-(trifluoromethoxy)acetanilide, 4-TFMeAc (97%) was obtained from Matrix Scientific (Columbia, SC). Methanol-D₄ was purchased from Cambridge Isotope Laboratories (Andover, MA). HPLC-grade acetonitrile, methanol, sulfuric acid, and boric acid (99.5%) were purchased from Mallinckrodt Chemicals (Phillipsburg, NJ). All chemicals were used as received.

¹⁹F NMR quantification

The quantitative determination of PFOS by ¹⁹F NMR was performed by a method adapted from Moody *et al.* [32]. Samples were dissolved in 0.7 mL of 90% H₂O / 10% CD₃OD or in 90% CH₃OH / 10% CD₃OD containing 4 mg mL⁻¹ chromium acetylacetonate (Cr(acac)₃) and analyzed in 5-mm tubes. The internal standard, 4-TFMeAc, was present in all samples at a concentration of 140 mg L⁻¹, corresponding to a 1:1 molar 4-TFMeAc:PFOS ratio for the most concentrated PFOS sample. Samples containing PFOS and TH-PFOS in a 1:1 molar fluoride ratio (100 mg PFOS L⁻¹:112 mg TH-PFOS L⁻¹) were prepared as described above. Solid phase extraction (SPE) was conducted to preconcentrate analytes when required. SPE cartridges (3 mL, 500 mg

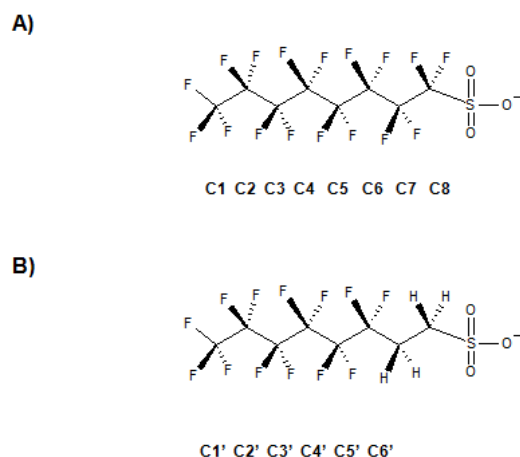


Figure 1: Molecular structure of perfluoroalkyl surfactants. A) PFOS and B) TH-PFOS.

ODS-C₁₈, Agilent Technologies, DE) mounted on a vacuum manifold were conditioned with 5 mL methanol, following by 5 mL of dionized water and then aqueous sample was loaded at 1 mL min⁻¹. SPE cartridges were rinsed with 5 mL of dionized water and then dried under vacuum for 3 h prior elution. Analytes were eluted with 5 mL methanol and collected in clean Nalgene flasks. Standard solutions spiked with known PFOS concentrations were extracted in parallel to determine recovery efficiencies as discussed later.

All ¹⁹F NMR spectra were acquired at 22°C on a Varian Unity-300 spectrometer operating at a ¹⁹F frequency of 282.208 MHz using a 5mm 4-nucleus (³¹P, ¹³C, ¹⁹F, ¹H) probe. Acquisition involved a relaxation delay of 1.44 s followed by a 90° pulse (16.2 μs) and a Hahn echo with an echo delay of 100 μs, with 16,384 complex data points and a spectral width of 33,333 Hz. The acquisition time for all samples was 32.5 min. A 10 Hz line broadening was applied before zero filling to 32,768 data points and Fourier transform. Baseline correction was performed using a 5th order polynomial, and chemical shifts were referenced to internal standard, 4-TFMeAc at -58.08 ppm [41].

HPLC-suppressed conductivity detection

PFOS and related compounds in aqueous samples were analyzed by a HPLC system with suppressed conductivity detector (ICS-3000 Ion Chromatography System, DIONEX, Sunnyvale, CA). The chromatograph was equipped with an autosampler (injection volume 100 μL), a pump, a degasser, a guard column (Acclaim Polar Advantage II, C₁₈, 4.3 mm i.d., 1 cm length) and a separation column (Acclaim Polar Advantage II, C₁₈, 4.6 mm i.d., 25 cm length) operating at 35°C. A mixture of 20 mM boric acid (pH 9.0) and 95% acetonitrile was used as the mobile phase at a flow rate of 1 mL min⁻¹. The amount of boric acid varied with linear gradient program starting with 75% (v/v) at time zero and decreasing to 45% (v/v) in 13.2 min. Blanks were continuously run to assure that the column was clean and

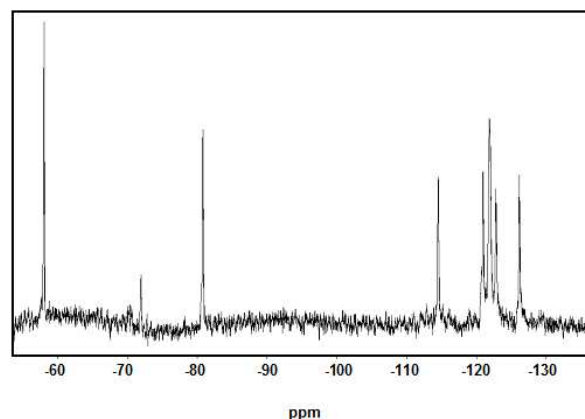


Figure 2: ¹⁹F NMR spectrum of an aqueous PFOS sample (31.5 mg L⁻¹) relative to the internal standard, 4-(trifluoromethoxy)acetanilide, 4-TFMeAc, (-58.08 ppm).

that traces of the analyte were not carried over between samples. Solid phase extraction (SPE) was conducted to preconcentrate analytes when required as described above. Standard solutions spiked with known PFOS concentrations were extracted in parallel to determine recovery efficiencies as discussed later.

TOC analysis

Measurements of PFOS and derivatives in aqueous solution were determined using a Total Organic Carbon analyzer (Shimadzu TOC-V CSH/CSN system, Columbia, MD). All samples, including blanks and standards, were acidified with HCl to pH 2.20-2.50 prior to analysis.

Results and Discussion

¹⁹F NMR assignments and quantification of PFOS

The chemical structures of PFOS and TH-PFOS including numerical labels of the carbon chains are depicted in Figure 1. ¹⁹F NMR is a very valuable technique for structural studies of fluorinated compounds. Figure 2 illustrates a typical ¹⁹F NMR spectrum of aqueous PFOS sample. The spectral window was restricted to -55 ppm to -135 ppm to improve the clarity of the spectrum. Chemical shifts were referenced to the internal standard 4-TFMeAc at -58.08 ppm [41]. Moody and coworkers incorrectly assigned the resonance at -72.0 ppm to 4-TFMeAc [32]. In this study, the mentioned resonance is observed even if 4-TFMeAc is not added, suggesting the presence of fluorinated PFOS impurities. These impurities have been identified as branched PFOS isomers as described by Ochoa-Herrera et al [38]. The peak at about -72 ppm is characteristic of the internal and terminal branched CF₃ of all PFOS isomers [33, 34]. Previous studies on ¹⁹F NMR spectroscopy of perfluorinated compounds have clearly identified some of the key peaks in the carbon-fluorine chain [42, 43]. The peak at -80.7 ppm has been assigned to the terminal CF₃ (C1), the peak at -113.1 ppm is shown to arise from fluorine atoms in C8 adjacent to the sulfonate group, and the peak at -125.6 ppm is characteristic of the CF₂ group

(C2) next to the terminal CF_3 [42]. The resonance peaks at -120 ppm, -121.2 ppm, and -122.1 ppm correspond to intermediate CF_2 moieties in carbons atoms C3 to C7.

The spectrum of TH-PFOS, a compound structurally related to PFOS (Figure 1B), was obtained to identify the intermediate CF_2 NMR signals of the perfluorinated compounds. The ^{19}F NMR spectra of aqueous solutions containing PFOS only and a mixture of PFOS:THPFOS in a 1:1 molar fluoride ratio are illustrated in Figure 3. For comparison purposes the spectral window was restricted to -77 ppm to -133 ppm.

As expected, the spectrum of the solution containing the mixture of PFOS and TH-PFOS is different from that of PFOS alone. The intensities of the peaks at -80.7 and -125.6 ppm assigned to the terminal CF_3 (C1) and the CF_2 (C7) moiety next to it, respectively, are higher in the PFOS:THPFOS solution spectrum as compared to the same peaks in the spectrum of the solution that only contains PFOS. These findings suggest that C1' and the C2' in the TH-PFOS molecule are chemically equivalent to the fluorine atoms in C1 and C2 in the PFOS molecule. These two peaks seem to appear in the same place for long chain perfluorinated compounds as suggested by Buchanan *et al.* (2005) [42].

In contrast, the intensities of the peaks assigned to the CF_2 moiety adjacent to the sulfonate group C8 (-113.1 ppm) and that at -120 ppm are reduced approximately by half in the spectrum of the mixture. The decrease in intensity suggests that the resonance at -120 ppm corresponds to the fluorine atoms in C7 in the PFOS molecule.

In the TH-PFOS molecule, the chemical environment of the fluorine atoms that are in the vicinity of the hydrogen atoms is different from that of fluorine atoms in PFOS, a compound that is fully fluorinated. Therefore, the two additional peaks present in the perfluorinated mixture at -112.9 and -122.8 ppm must correspond to fluorine atoms in C3' to C6' in the TH-PFOS compound. So, the peak at -113.4 ppm presumably arises from the CF_2 group (C6') next to the $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3^-$ group. Under the experimental conditions employed in this study, no further information can be obtained to identify the intermediate fluorine atoms in the PFOS structure.

As shown in Table 1, our ^{19}F NMR assignments are in good agreement with those reported by other research groups [33, 34].

The slight discrepancy with the NMR signals assigned by Arsenault and coworkers [33] can be attributed to the use of a different compound as the internal standard as well as experimental/instrumental errors. The signals referenced to hexafluorobenzene (-169 ppm) are slightly shifted upfield by 5 ppm, meaning that they were generated at higher external electric magnetic fields. Considering that the shifts were observed in all fluorine assignments, the differences are negligible.

Carbon #	Resonance (ppm)	Literature data (ppm)	
	Our work	Arsenault <i>et. al.</i> ^a	Vyas <i>et al.</i> ^b
C1	-80.7	-86.0	-82
C2	-125.6	-131.0	-127
C3	–	-127.4	-124
C4	–	-126.6	–
C5	–	-126.4	–
C6	–	-126.3	–
C7	-120	-125.0	-121
C8	-113.1	-117.8	-115

Literature data: ^a[33] and ^b[34].

Table 1: ^{19}F NMR assignments of the PFOS molecule.

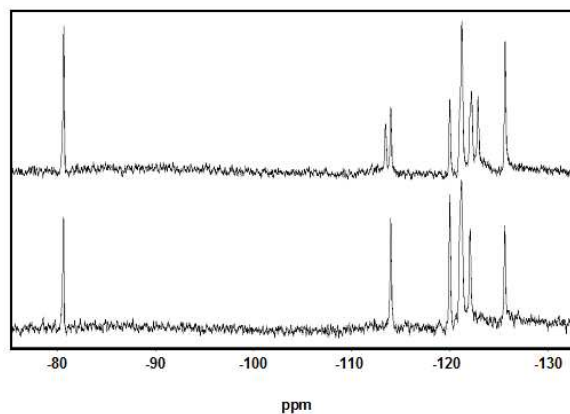


Figure 3: ^{19}F NMR spectra of aqueous solutions containing a mixture of PFOS and TH-PFOS in a 1:1 molar fluoride ratio (100 mg PFOS L^{-1} : 112 mg TH-PFOS L^{-1}) (upper panel) and PFOS only solution (100 mg L^{-1}) (lower panel).

^{19}F NMR quantification of PFOS in aqueous samples was conducted according to the protocol described in the *Materials and Methods* section. A known concentration of the internal standard, 4-TFMeAc, was added to all samples. Quantification was possible by integrating the area of the PFOS signal relative to the area of the internal standard. Although calibration curves were obtained for each PFOS peak in the ^{19}F NMR spectrum, the area of the largest peak, which corresponds to the terminal CF_3 , was used for quantification purposes (Figure 4). Linear calibration curves ($r^2 > 0.98$) using known PFOS concentrations ranging from 10 to 140 mg L^{-1} were employed.

The detection limit of ^{19}F NMR based on a signal-to-noise ratio of 3 was found to be 12.5 mg PFOS L^{-1} in aqueous samples. This limit could be significantly improved when a solvent of less polarity-polarizability character is employed. In samples concentrated by SPE procedures based on ODS- C_{18} cartridges using methanol as solvent, PFOS was detected at concentrations as low as 3.6 mg L^{-1} , which is 3.5-fold lower than the detection limit obtained in aqueous samples. This could be attributed to the interactions of the molecule with the solvent. Hence, since H_2O interactions with the fluorine atoms of PFOS are stronger than those with CH_3OH , a higher coupling between the ^{19}F nuclei spins will result in the aqueous solvent, producing an increased diversification of F atoms in the molecule and, thus, higher

detection limits [44]. The recovery efficiency of this procedure was $100.8\% \pm 5.4\%$ for triplicate aqueous samples of 100 mg L^{-1} of PFOS standard.

Quantification of PFOS by NMR spectroscopy was accurate and precise. However, the sensitivity of the technique is low and quantification of PFOS will generally require sample preconcentration, e.g., by SPE extraction. Nonetheless, alternative techniques such as LC-MS or LC-MS/MS also often require sample pretreatment by SPE because the concentrations of PFOS in environmental samples are generally in the low ppm range ($\mu\text{g L}^{-1}$) [45, 23, 24].

Moody *et al.* [32] reported higher detection limits than those obtained in this study by one order of magnitude, 0.25 mg L^{-1} for concentrated samples. However, the acquisition time used in our study was relatively short, 32.5 min, and the sensitivity of the F-NMR system used (a Varian Unity-300 spectrometer) was limited compared to that in the study conducted by Moody and coworkers.

^{19}F NMR spectroscopy is a valuable technique to provide structural information of perfluoroalkyl compounds due to its ability to respond to different electronic environments with changes in the chemical shift. Unfortunately, ^{19}F NMR cannot be used for routine monitoring of PFOS because data acquisition and data processing are very time-consuming compared to other analytical methods such as LC-MS and LC-MS/MS.

HPLC-suppressed conductivity detection

A HPLC method that relies on suppressed-conductivity ion chromatography has been developed to separate and detect aqueous PFOS and related perfluoroalkyl compounds in environmental samples. Chromatographic separation was conducted with a C_{18} reverse-phase column and a mobile phase consisting of a mixture of boric acid and acetonitrile with various mixing ratios.

Figure 5 shows a chromatogram obtained for a standard containing 25 mg L^{-1} commercial PFOS. Well-resolved peaks and reproducible results were achieved by this chromatography method. Moreover, various PFOS isomers were separated with this method. The peak at 9.9 min is assigned to the linear PFOS anion and the two little peaks eluting before the major peak at 9.3 and 9.5 min correspond to PFOS isomers. These isomers are structural isomers of PFOS which have the same molecular weight as PFOS but are branched perfluoroalkyl sulfonates [46, 38].

The purity of the PFOS salt was calculated by relating the area of the linear PFOS peak to the sum of the areas of all three peaks, assuming that the response factors for branched and linear isomers are equivalent. The latter assumption cannot be confirmed experimentally due to the lack of authentic isomer standards. Linear PFOS was found to be 75.4% pure [38]. Previous studies have reported the purity of PFOS commercial standards (labeled as $> 98\%$) in the range of 70 to 80% [39, 34, 37].

The quantitative determination of low-ppm concentration of aqueous PFOS was effectively conducted by

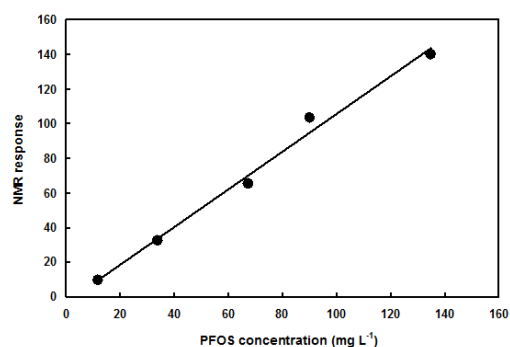


Figure 4: Calibration curve of aqueous PFOS based on the terminal CF_3 peak by ^{19}F NMR ($r^2 > 0.98$).

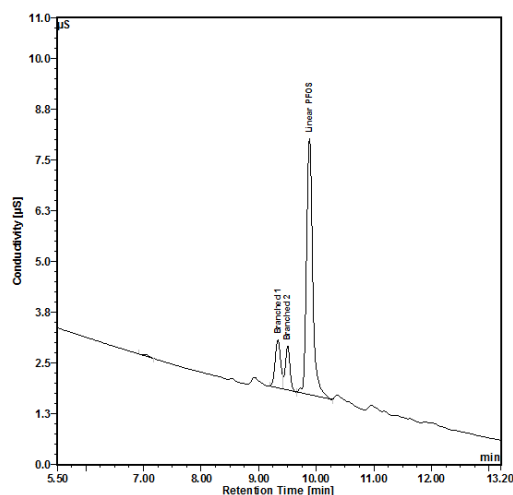


Figure 5: HPLC-suppressed conductivity detection chromatogram of aqueous PFOS (25 mg L^{-1}).

HPLC-suppressed conductivity detection as described in the *Materials and Methods* section. The total concentration of perfluorinated compounds in aqueous samples was obtained by linear calibration curves ($r^2 > 0.99$) using known concentrations of PFOS, PFBS and PFOA ranging from 0 to 150 mg L^{-1} . The detection limit of PFOS, PFBS and PFOA was 1 mg L^{-1} . A calibration curve for PFOS in aqueous samples is shown in Figure 6. These results are consistent with those obtained by Hori *et al.* [47] by conductimetric detection. A detection limit of 0.66 to $1.0 \text{ mg PFOS L}^{-1}$ was reported utilizing a ODS column and a methanol:phosphate gradient with linear calibration graphs up to $100 \text{ mg PFOS L}^{-1}$. The new detection limits for samples pre-concentrated by SPE using ODS- C_{18} cartridges and methanol as solvent increased significantly. PFOS was detected at concentrations as low as $10 \mu\text{g L}^{-1}$. Blanks samples spiked with known concentrations of PFOS (25 mg

L⁻¹) were extracted in parallel to determine the recovery efficiency which was 102% ± 9.4% for triplicate samples.

The use of a reverse-phase C₁₈ column provided good resolution for the perfluorinated alkyl substances. A mixture of PFBS, PFOA and PFOS in a 1:1:1 ratio was successfully separated as shown in Figure 7. Standard samples of each perfluorinated compound were run in parallel to identify their retention times. The peaks eluted based on number of carbons and molecular weight. PFBS, 4-carbon chain with a molecular weight of 299.08 g mol⁻¹, appeared first followed by PFOA, a 8-carbon chain compound with a molecular weight of 414.07 g mol⁻¹, and finally PFOS, 8-carbon compound with a molecular weight of 499.12 g mol⁻¹. The response factors determined for these perfluorinated compounds differed considerably. The response factor was calculated by dividing the area of analyte by its concentration. The response factors for PFBS, PFOA and linear PFOS were 0.104, 0.067, and 0.039, respectively.

HPLC based on suppressed conductivity detection is a simple, rapid and efficient method for the separation and detection of perfluorinated compounds. Since it does not require sample pretreatment, the analysis times are significantly reduced compared to those required in ¹⁹F NMR spectroscopy. Besides, this technique is less expensive and time consuming than LC-MS/MS. The good separation achieved by the reverse phase C₁₈ column allows detection of PFOS isomers and calculation of the purity of PFOS commercial standard. This chromatography method can be successfully utilized for monitoring PFAS on a routine basis in aqueous solutions. Moreover, the high sensitivity of the technique makes it appropriate for the determination and quantification of low-ppm amounts of perfluoroalkyl surfactants in real environmental samples. Detection of PFAS concentrations in the ppb-range is feasible if the samples are pre-concentrated by solid-phase extraction with cartridges based on ODS-C₁₈ columns.

Quantification of PFOS by TOC and COD analysis

The feasibility of utilizing TOC and COD analysis for the quantitative detection of PFOS in aqueous samples was also investigated in this study. Instrument calibration was performed using potassium hydrogen phthalate standards ranging from 0.40 to 25 mg TOC L⁻¹. The coefficient of determination (*r*²) for each calibration was > 0.99. Calibration lines obtained using potassium hydrogen phthalate and PFAS standards were nearly identical confirming the suitability of TOC measurements for PFAS quantification.

Figure 8 shows a calibration curve for PFOS in aqueous samples by total organic carbon (TOC) analysis. Linear calibration curves (*r*² > 0.99) using known concentrations of PFOS ranging from 0.5 to 19.2 mg TOC-PFOS L⁻¹, equivalent to 2.5 to 100.0 mg PFOS L⁻¹, were obtained. The detection limit was 2.5 mg PFOS L⁻¹

equivalent to 0.5 mg L⁻¹ of PFOS as TOC. A significant improve in the detection limit can be obtained by using a high-sensitivity catalyst; PFOS concentrations in the μg L⁻¹ range can be detected. Although the TOC analysis provides reliable quantification of PFOS in environmental samples, the lack of selectivity is a drawback of the

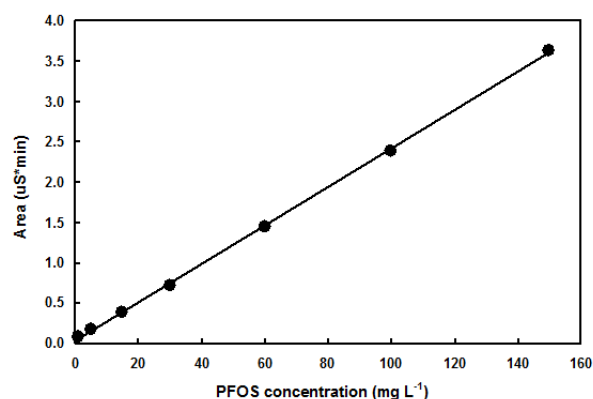


Figure 6: Calibration curve of aqueous PFOS by HPLC suppressed conductivity detection (*r*² > 0.99).

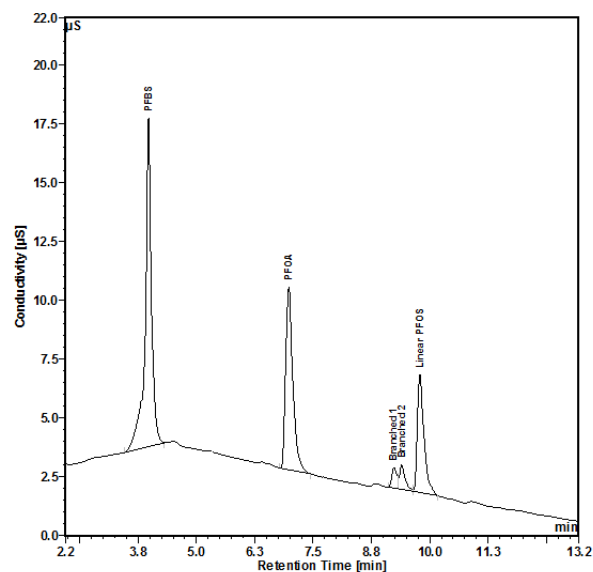


Figure 7: HPLC-suppressed conductivity detection chromatograph of an aqueous solution containing PFBS, PFOA, and PFOS (21 mg L⁻¹ each).

technique. The method is not compound specific since all organic carbons are detected. PFOS solutions containing 180 and 250 mg L⁻¹ were reacted with the dichromate solution for 2 h at 150°C according to the COD protocol described elsewhere [48]. Blank solutions lacking PFOS were also analyzed. No oxidation of PFOS was detected under these experimental conditions. The fact that the dichromate-based COD method was not suitable for the analysis of PFOS was likely due to the

well-known chemical stability of perfluorinated compounds. The strength of the carbon-fluorine bond is responsible for the recalcitrant nature of these pollutants [36]. This finding is surprising considering that dichromate is a strong oxidant and the COD assay is the standard method for the analysis of organic matter in wastewaters. However, highly persistent organic compounds such as benzene and pyridines are also not oxidized in the COD test [49].

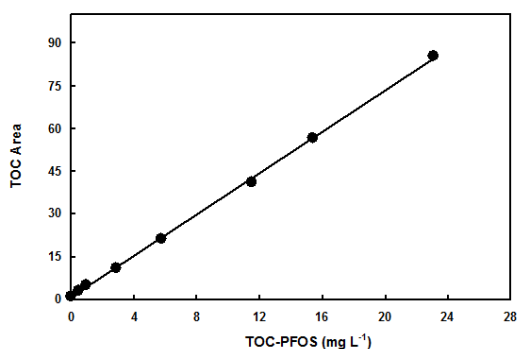


Figure 8: Calibration curve of aqueous PFOS by TOC analysis ($r^2 > 0.99$).

Conclusions

The detection and quantification of PFOS and related compounds in aqueous samples by two independent methodologies, *i.e.* ^{19}F NMR spectroscopy and HPLC-suppressed conductivity detection, was investigated. In terms of sensitivity and analysis time, the HPLC-suppressed conductivity detection method offers an advantage over ^{19}F NMR as a technique for the quantification of perfluorinated sulfonates and carboxylates. However, ^{19}F NMR spectroscopy is a powerful technique to gain information on the chemical environment of fluorine atoms in the perfluorinated chemicals. The presence of branched PFOS isomers in the PFOS commercial standard was confirmed by these two independent methods. Analysis of PFOS and derivatives can also be conducted by total organic carbon analyzer when no matrix interferences are present, *i.e.*, organic matter. The COD method was not suitable for the analysis of PFOS in aqueous environments; the compound was not oxidized under these conditions, confirming its well-known chemical stability.

Acknowledgments

We would like to thank the Semiconductor Research Corporation/Sematech Engineering Research Center for Environmentally Benign Semiconductor Manufacturing for financial support. We are thankful to Dr. Neil Jacobsen from the Department of Chemistry, University of Arizona, for his support with ^{19}F NMR analysis.

References

- [1] Houde, M., Martin, J. W., Letcher, R. J., Solomon, K. R., and Muir, D. C. G. 2006. "Biological monitoring of polyfluoroalkyl substances: A review". *Environmental Science & Technology*. 40(11), 3463–3473.
- [2] Lau, C., Anitole, K., Hodes, C., Lai, D., Pfahles-Hutchens, A., and Seed, J. 2007. "Perfluoroalkyl acids: A review of monitoring and toxicological findings". *Toxicological Sciences*. 99(2), 366–394.
- [3] Conder, J. M., Hoke, R. A., De Wolf, W., Russell, M. H., and Buck, R. C. 2008. "Are PFCA's bioaccumulative? a critical review and comparison with regulatory lipophilic compounds". *Environmental Science & Technology*. 42(4), 995–1003.
- [4] Kannan, K., Corsolini, S., Falandysz, J., Fillmann, G., Kumar, K. S., Loganathan, B. G., Mohd, M. A., Olivero, J., Van Wouwe, N., Yang, J. H., and Aldous, K. M. 2004. "Perfluorooctanesulfonate and related fluorochemicals in human blood from several countries". *Environmental Science & Technology*. 38(17), 4489–4495.
- [5] Butenhoff, J. L., Olsen, G. W., and Pfahles-Hutchens, A. 2006. "The applicability of biomonitoring data for perfluorooctanesulfonate to the environmental public health continuum". *Environmental Health Perspectives*. 114(11), 1776–1782.
- [6] Giesy, J. P., and Kannan, K. 2001. "Global distribution of perfluorooctane sulfonate in wildlife". *Environmental Science & Technology*. 35(7), 1339–1342.
- [7] Martin, J. W., Smithwick, M. M., Braune, B. M., Hoekstra, P. F., Muir, D. C. G., and Mabury, S. A. 2004. "Identification of long-chain perfluorinated acids in biota from the Canadian Arctic". *Environmental Science & Technology*. 38(2), 373–380.
- [8] Tao, L., Kannan, K., Kajiwara, N., Costa, M. M., Fillmann, G., Takahashi, S., and Tanabe, S. 2006. "Perfluorooctanesulfonate and related fluorochemicals in albatrosses, elephant seals, penguins, and Polar Skuas from the Southern Ocean". *Environmental Science & Technology*. 40(24), 7642–7648.
- [9] Higgins, C. P., Field, J. A., Criddle, C. S., and Luthy, R. G. 2005. "Quantitative determination of perfluorochemicals in sediments and domestic sludge". *Environmental Science & Technology*. 39(11), 3946–3956.
- [10] Senthilkumar, K., Ohi, E., Sajwan, K., Takasuga, T., and Kannan, K. 2007. "Perfluorinated compounds in river water, river sediment, market fish, and wildlife samples from Japan". *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 79(4), 427–431.
- [11] Prevedouros, K., Cousins, I. T., Buck, R. C., and Korzeniowski, S. H. 2006. "Sources, fate and transport of perfluorocarboxylates". *Environmental Science & Technology*. 40(1), 32–44.
- [12] EPA 2003a. "Preliminary Risk Assessment of the Developmental Toxicity Associated with Exposure to Perfluorooctanoic Acid and its Salts". Technical report. U.S. Environmental Protection Agency.
- [13] Brooke, D., Footitt, A., and Nwaogu, T. A. 2004. "Environmental risk evaluation report: Perfluorooctanesulphonate (PFOS)". *Environment Agency, Chemicals Assessment Section, Wallingford, UK*.

- [14] Ochoa-Herrera, V. and Sierra-Alvarez, R. 2008. "Removal of perfluorinated surfactants by sorption onto granular activated carbon, zeolite and sludge". *Chemosphere*. 72, 1588 – 1593.
- [15] Higgins, C. P., and Luthy, R. G. 2006. "Sorption of perfluorinated surfactants on sediments". *Environmental Science & Technology*. 40(23), 7251–7256.
- [16] Saito, N., Harada, K., Inoue, K., Sasaki, K., Yoshinaga, T., and Koizumi, A. 2004. "Perfluorooctanoate and perfluorooctane sulfonate concentrations in surface water in Japan". *Journal of Occupational Health*. 46(1), 49–59.
- [17] So, M. K., Taniyasu, S., Yamashita, N., Giesy, J. P., Zheng, J., Fang, Z., Im, S. H., and Lam, P. K. S. 2004. "Perfluorinated compounds in coastal waters of Hong Kong, South China, and Korea". *Environmental Science & Technology*. 38(15), 4056–4063.
- [18] Yamashita, N., Kannan, K., Taniyasu, S., Horii, Y., Petrick, G., and Gamo, T. 2005. "A global survey of perfluorinated acids in oceans." *Marine Pollution Bulletin*. 51(8-12), 658–668.
- [19] Loos, R., Wollgast, J., Huber, T., and Hanke, G. 2007. "Polar herbicides, pharmaceutical products, perfluorooctanesulfonate (PFOS), perfluorooctanoate (PFOA), and nonylphenol and its carboxylates and ethoxylates in surface and tap waters around Lake Maggiore in Northern Italy". *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 387(4), 1469–1478.
- [20] Konwick, B. J., Tomy, G. T., Ismail, N., Peterson, J. T., Fauver, R. J., Higginbotham, D., and Fisk, A. T. 2008. "Concentrations and patterns of perfluoroalkyl acids in Georgia, USA surface waters near and distant to a major use source". *Environmental Toxicology and Chemistry*. 27(10), 2011–2018.
- [21] Sinclair, E., Mayack, D. T., Roblee, K., Yamashita, N., and Kannan, K. 2006. "Occurrence of perfluoroalkyl surfactants in water, fish, and birds from New York State". *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 50(3), 398–410.
- [22] Skutlarek, D., Exner, M., and Farber, H. 2006. "Perfluorinated surfactants in surface and drinking water". *Environmental Science and Pollution Research*. 13(5), 299–307.
- [23] Villagrana, M., deAlda, M. L., and Barcelo, D. 2006. "Environmental analysis of fluorinated alkyl substances by liquid chromatography-(tandem) mass spectrometry: a review". *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 386(4), 953–972.
- [24] Richardson, S. D. 2008. "Environmental mass spectrometry: Emerging contaminants and current issues". *Analytical Chemistry*. 80(12), 4373–4402.
- [25] deVoogt, P. and Saez, M. 2006. "Analytical chemistry of perfluoroalkylated substances". *Trac-Trends in Analytical Chemistry*. 25(4), 326–342.
- [26] Hernandez, F., Sancho, J. V., and Pozo, O. J. 2005. "Critical review of the application of liquid chromatography/mass spectrometry to the determination of pesticide residues in biological samples". *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 382(4), 934–946.
- [27] Barcelo, D. and Petrovic, M. 2007. "Challenges and achievements of LC-MS in environmental analysis: 25 years on". *Trac-Trends in Analytical Chemistry*. 26(1), 2–11.
- [28] Martin, J. W., Muir, D. C. G., Moody, C. A., Ellis, D. A., Kwan, W. C., Solomon, K. R., and Mabury, S. A. 2002. "Collection of airborne fluorinated organics and analysis by gas chromatography/chemical ionization mass spectrometry". *Analytical Chemistry*. 74(3), 584–590.
- [29] Jahnke, A., Ahrens, L., Ebinghaus, R., Berger, U., Barber, J. L., and Temme, C. 2007. "An improved method for the analysis of volatile polyfluorinated alkyl substances in environmental air samples". *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 387(3), 965–975.
- [30] Moody, C. A. and Field, J. A. 2000. "Perfluorinated surfactants and the environmental implications of their use in fire-fighting foams". *Environmental Science & Technology*. 34(18), 3864–3870.
- [31] Langlois, I., Berger, U., Zencak, Z., and Oehme, M. 2007. "Mass spectral studies of perfluorooctane sulfonate derivatives separated by high-resolution gas chromatography". *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 21(22), 3547–3553.
- [32] Moody, C. A., Kwan, W. C., Martin, J. W., Muir, D. C. G., and Mabury, S. A. 2001. "Determination of perfluorinated surfactants in surface water samples by two independent analytical techniques: Liquid chromatography/tandem mass spectrometry and f-19 nmr". *Analytical Chemistry*. 73(10), 2200–2206.
- [33] Arsenault, G., McCrindle, R., Chittim, B., and McAlees, A. 2005. "Separation and fluorine nuclear magnetic resonance spectroscopy (¹⁹F-NMR) analysis of the individual branched isomers present in technical perfluorooctanesulfonic acid (PFOS)". *Organohalogen Compounds*. 67, 818 – 822.
- [34] Vyas, S. M., Kania-Korwel, I., and Lehmler, H. J. 2007. "Differences in the isomer composition of perfluorooctanesulfonyl (PFOS) derivatives". *Journal of Environmental Science and Health Part a-Toxic/Hazardous Substances & Environmental Engineering*. 42(3), 249–255.
- [35] 3M 1997. "Fluorochemical isomer distribution by ¹⁹F NMR spectroscopy". Technical report. U.S. Environmental Protection Agency Public Docket AR226-0564.
- [36] Kissa, E. 2001. "Fluorinated surfactants and repellants". *Marcel Dekker, Inc., New York*.
- [37] Arsenault, G., Chittim, B., McAlees, A., McCrindle, R., Riddell, N., and Yeo, B. 2008. "Some issues relating to the use of perfluoro octane sulfonate (PFOS) samples as reference standards". *Chemosphere*. 70(4), 616–625.
- [38] Ochoa-Herrera, V., Sierra-Alvarez, R., Somogyi, A., Jacobsen, N. E., Wysocki, V. H., and Field, J. A. 2008. "Reductive defluorination of perfluorooctane sulfonate". *Environmental Science & Technology*. 42(9), 3260–3264.
- [39] Martin, J. W., Kannan, K., Berger, U., De Voogt, P., Field, J., Franklin, J., Giesy, J. P., Harner, T., Muir, D. C. G., Scott, B., Kaiser, M., Jarnberg, U., Jones, K. C., Mabury, S. A., Schroeder, H., Simcik, M., Sottani, C., Van Bavel, B., Karrman, A., Lindstrom, G., and Van Leeuwen, S. 2004. "Analytical challenges hamper perfluoroalkyl research". *Environmental Science & Technology*. 38(13), 248A–255A.

- [40] Murakami, M. and Takada, H. 2008. "Perfluorinated surfactants (PFSS) in size-fractionated street in Tokyo". *Chemosphere*. 73, 1172 – 1177.
- [41] Tugnait, M., Lenz, E. M., Phillips, P., Hofmann, M., Spraul, M., Lindon, J. C., Nicholson, J. K., and Wilson, I. D. 2002. "The metabolism of 4-trifluoromethoxyaniline and [C-13]-4-trifluoromethoxyacetanilide in the rat: detection and identification of metabolites excreted in the urine by NMR and HPLC-NMR". *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 28(5), 875–885.
- [42] Buchanan, G. W., Munteanu, E., Dawson, B. A., and Hodgson, D. 2005. "Concerning the origin of F-19-F-19 NMR COSY and NOESY connections in the spectra of perfluorooctanoic acid, R-F-palmitic acid-F-13 and diethyl perfluorosuberate". *Magnetic Resonance in Chemistry*. 43(7), 528–534.
- [43] Takasaki, M., Kimura, K., Kawaguchi, K., Abe, A., and Katagiri, G. 2005. "Structural analysis of a perfluoro-sulfonate ionomer in solution by F-19 and C-13 NMR". *Macromolecules*. 38(14), 6031–6037.
- [44] Bruch, M. D. 1996. *NMR Spectroscopy Techniques*, CRC Press, Boca Raton, FL.
- [45] Hebert, G. N., Odom, M. A., Craig, P. S., Dick, D. L., and Strauss, S. H. 2002. "Method for the determination of sub-ppm concentrations of perfluoroalkylsulfonate anions in water". *Journal of Environmental Monitoring*. 4(1), 90–95.
- [46] Langlois, I. and Oehme, M. 2006. "Structural identification of isomers present in technical perfluorooctane sulfonate by tandem mass spectrometry". *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 20(5), 844–850.
- [47] Hori, H., Hayakawa, E., Yamashita, N., Taniyasu, S., Nakata, F., and Kobayashi, Y. 2004. "High-performance liquid chromatography with conductimetric detection of perfluorocarboxylic acids and perfluorosulfonates". *Chemosphere*. 57(4), 273–282.
- [48] APHA 2005. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, American Public Health Association, Washington, DC, 21st edition.
- [49] Mara, D. and Horan, N. J. 2003. *Handbook of Water and Wastewater Microbiology*, Academic Press.

Cuantificación de cationes metálicos en agua con LIBS por deposición sobre una superficie de acero rayada con lápiz HB

Diego Jijón^{1*} César Costa Vera^{1,2}

¹ Escuela Politécnica Nacional, Departamento de Física, Ladrón de Guevara E11-256, Apartado 17-12-866, Quito-Ecuador.

² Grupo Ecuatoriano para el Estudio Experimental y Teórico de Nanosistemas –GETNano–

Diego de Robles y Vía Interoceánica, Universidad San Francisco de Quito

*Autor principal/Corresponding author e-mail: judijival@hotmail.com

Editado por/Edited by: Robert Cazar, M.Sc.

Recibido/Received: 10/27/2011. Aceptado/Accepted: 11/03/2011.

Publicado en línea/Published on Web:12/20/2011. Impreso/Printed:12/20/2011.

Abstract

The use of laser-induced breakdown spectroscopy (LIBS) together with a pencil lead substrate for the quantitative analysis of salts dissolved in liquids provides is introduced as a very efficient and sensitive analytical method. In this work we have compared five substrates over which aqueous solutions of salts were left to dry, and then submitted for analysis with LIBS. The comparison was based in analytical parameters such as the sensitivity and linearity of each substrate. We found that from these, the surfaces of graphite and a steel surface scratched with pencil HB gave the best results. The concentration of the salt (cation) in the solution was made to correspond to the areas of specific peaks for each corresponding atom. In this work, we used a method introduced by Jijón *et al.* [1] for data handling. This spectra selection method produces better linearity in calibration curves and much smaller errors that translate into correlation coefficients closer to 1, in this work correlations index up to 0.98 were determined. We introduced an experimental setup with mirrors to study the self-absorption effect, showing in this work the lost of linearity in the peak areas at high concentrations. We observed an indentation in the center of the Cs and K peaks, and the lost of signal LIBS of the spectrum of each peak analyzed with mirrors. In the last part of this work, we applied the methodology for quantification introduced to quantification of arsenic dissolved in water, as a real life application for concentrations until 1000 ppm. The non linear calibration curve for the whole range in this case was fitted to an exponential function with 0.993 of correlation index. The detection limit calculated for the arsenic in water was 3.2 ppm and this result is very satisfactory compared with those reported on literature for LIBS.

Keywords. LIBS, quantitative analysis, LIBS quantification, liquid analysis.

Resumen

En este trabajo se introduce la aplicación de LIBS (Laser-induced Breakdown Spectroscopy) junto con un sustrato novedoso de acero rayado con lápiz HB para el análisis cuantitativo de sales disueltas en líquidos provistas como un método analítico eficiente y sensitivo. Para esto, se han comparado cinco sustratos sobre los cuales se dejaron secar soluciones en agua de sales, cuyos depósitos se analizaron posteriormente con LIBS. Las comparaciones se basaron en parámetros analíticos tales como sensibilidad y linealidad. Se encontró que de éstas, las superficies de grafito y la de acero rayado con lápiz HB dieron los mejores resultados. La concentración de la sal (catión) en la solución se hizo corresponder con áreas de picos específicos para cada átomo. En este trabajo se utilizó un método estadístico introducido por Jijón *et al.* [1] para el tratamiento de los datos. Este método de selección de espectros produce una mejor linealidad en las curvas de calibración y errores más pequeños lo que a su vez permite tener coeficientes de correlación más cercanos a uno, en este estudio estos coeficientes mejoraron sustancialmente hasta 0.98. Se introdujo un arreglo experimental hecho a base de espejos para estudiar el fenómeno de la auto-absorción, demostrando así, que este fenómeno modifica la linealidad de la intensidad y el área de los picos correspondientes cuando se tienen concentraciones elevadas de un catión dado. Esto pudo ser observado en los espectros de los picos de Cs y K saturados, comparados con y sin espejos del arreglo, donde la intensidad de los mismos disminuía al estar presente los espejos. Por último, la metodología propuesta en este trabajo se aplicó como un caso de la vida real, a arsénico disuelto en agua con concentraciones de hasta 1000 ppm. La curva correspondiente pudo ser ajustada a una función exponencial con un coeficiente de correlación de 0.993. El límite de detección calculado para el arsénico disuelto en agua fue de 3.2 ppm que es muy satisfactorio comparado con valores reportados en la literatura para LIBS.

Palabras Clave. LIBS, análisis cuantitativos, cuantificación en LIBS, análisis de líquidos.



Introducción

La técnica LIBS (Laser-induced Breakdown Spectroscopy, es decir, espectroscopía de ruptura o chispa producida por láser) se establecido en los últimos años como una herramienta muy útil para el análisis cualitativo y, en algunos casos, cuantitativo, de la composición química elemental de sustancias sólidas, líquidas y gaseosas. El análisis con LIBS provee información sobre la identidad y concentración de los átomos presentes en un compuesto [2, 3, 4, 5]. La técnica se basa en el uso de un pulso láser de alta intensidad enfocado para producir una chispa o plasma caliente en el punto de prueba. En este plasma las especies atómicas presentes emiten luz con características espectrales únicas. La intensidad de las líneas espectrales producidas permite en principio, determinar la concentración de las especies químicas correspondientes.

En LIBS el perfil espectral de la luz emitida por el plasma cambia desde su creación con el tiempo. Inicialmente, durante los primeros nanosegundos, el espectro corresponde básicamente a un fondo continuo de radiación incoherente de los electrones que librasen el plasma. En la medida en la que el plasma se enfría y los electrones e iones se recombinan formando especies atómicas neutras, el espectro empieza a mostrar las líneas espectrales correspondientes a estas especies atómicas. Por esta razón, para el análisis práctico, se requiere hacer una detección retardada y durante un intervalo de tiempo limitado (Time-gated detection, en inglés) de la luz emitida por el plasma para recoger la información espectral que interesa [4, 5]. Bajo estas condiciones, LIBS permite hacer mediciones en tiempo real de especies químicas múltiples, por ejemplo, de metales, en diferentes campos de aplicación [6, 7, 8, 9].

Algunas aplicaciones importantes de LIBS se han hecho para mediciones de elementos presentes en muestras líquidas [10, 11, 12, 13, 14, 15]. La identificación y cuantificación de elementos en muestras líquidas se complica principalmente debido a la reducción del umbral de ruptura (generación de la chispa), y por la alta densidad relativa existente dentro del seno del líquido que produce el ensanchamiento de las líneas espectrales. Esta alta densidad provoca así mismo, que los estados atómicos excitados de emisión se apaguen sin emitir luz, restringiendo al mismo tiempo, la emisión de luz a duraciones de en algunas decenas de nanosegundos solamente. La ablación generada por el láser en líquidos produce así mismo, salpicaduras, lo que hace muy difícil hacer mediciones a tiempo real de un líquido en un medio ambiente [16, 2, 17, 18, 19]. En algunos casos, las partículas eyectadas a una distancia suficiente de la superficie bajo irradiación puede causar la formación de varios plasmas independientes sobre la superficie, lo que obstruye parcial o totalmente la radiación del haz del láser incidente. Un fenómeno similar es la formación de un plasma en la atmósfera inmediatamente sobre la superficie, cuando se trabaja con intensidades

muy altas (laser beam Blooming, en inglés). Este fenómeno que puede llevar al desenfoque y dispersión de energía en la atmósfera [20].

Para evitar estos problemas se han introducido algunos métodos novedosos de análisis para líquidos. Una opción es el análisis de líquidos congelados usando técnicas de ablaciones láser a bajas temperaturas [21]. Otra aproximación exitosa ha sido el uso de superficies sobre las que el líquido bajo análisis se deposita y deja secar antes de proceder al análisis con LIBS. *Vander Wal et al.*, por ejemplo, han demostrado la posibilidad de analizar sales de nitratos o cloruros de metales disueltos en agua, usando un sustrato de grafito amorfo (discos de carbono) [22]. Este trabajo ha servido de motivación para la investigación que reportamos.

Una consideración importante con respecto a este método de análisis es si el depósito sólido que queda sobre la superficie que se analiza responde a la estequiometría inicial en la solución y a las tasas de concentraciones iniciales en mezclas. Al respecto, *Vander Wal et al.*, han demostrado que los sustratos de grafito al dejar secar sustancias líquidas sobre estos permiten una gran mejora de análisis en líquidos mediante LIBS. Una condición importante en estos casos es que la solución se deposite y seque formando una capa homogénea sobre la superficie y que la evaporación del solvente proceda de tal forma que no se segreguen los componentes iniciales de la mezcla. Un problema importante al momento de construir una curva de calibración en LIBS con el método de secado indicado es el efecto de auto-absorción que se da en el plasma cuando este se ha enfriado suficientemente y un gran número de átomos neutros desexcitados de las sustancias emisoras están presentes en la periferia y reabsorben la radiación emitida en el centro. Este efecto es especialmente notorio al analizar concentraciones cercanas a la saturación en la solución original [23, 24]. La auto-absorción provoca una pérdida no lineal de sensibilidad a altas concentraciones debido a la pérdida de fotones de la señal final. Evidencia de este fenómeno se ve en forma de una indentación en el centroide del pico de un elemento analizado en casos extremos [23, 24, 25].

Para extender la idea de *Vander Wal et al.*, en este trabajo se hace una comparación de varios sustratos potencialmente útiles como superficies analíticas. En particular se han probado policarbonato (de un disco compacto, o CD), una oblea de silicio, pastillas de carbono activado compactadas, grafito, y una superficie de acero rayada hasta su recubrimiento con un lápiz HB. La superficie de acero rayada con lápiz es opción analítica interesante, de bajo costo, fácil implementación y con buenas características analíticas como se demuestra luego. Así mismo, para la construcción de las curvas de calibración se ha utilizado un método estadístico que hace un tratamiento especial de los outliers para disminuir el error, que se ha reportado anteriormente por *Jijón D. et al* [1].

El estudio ha incluido el análisis por deposición de soluciones acuosas de 10 sales diferentes (NaCl , $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$, $\text{Sr}(\text{NO}_3)_2$, BaCl , CaCl_2 , InCl_3 , KCl , LiSO_4 , RbCl , CsCl). Aquí se presentan ejemplos de curvas de calibración para diferentes concentraciones analizadas con el tratamiento de outliers mencionado [1]. La excelente sensibilidad de la superficie rayada con lápiz se discute en cierto detalle. La mínima concentración detectada para todas las sales fue de 1 ppm, lo que establece una cota superior del límite de detección con este método para los cationes de las sales probadas. Todas las superficies comparadas mostraron una buena relación señal ruido hasta este valor de concentración.

Todas las mediciones de cuantificación se realizaron con un instrumento comercial y las curvas de calibración se construyeron en base a los espectros obtenidos.

Con el fin de investigar el fenómeno de auto-absorción y su efecto sobre la pérdida de sensibilidad indicada arriba, se construyó, adicionalmente, un setup experimental *ad hoc* en base de espejos y se estudiaron soluciones saturadas y no saturadas de CsCl y KCl . Los resultados permiten demostrar que el efecto de este fenómeno sobre la sensibilidad del método son en verdad no lineales.

Por último, aplicamos el método desarrollado en este trabajo para la construcción de una curva de calibración para una solución de la "vida real" de arsénico disuelto en agua.

Experimental

Instrumento para cuantificación

El equipo comercial usado en este trabajo fue un espectrómetro LIBS 2000+ de Ocean Optics Inc. (Dunedin, FL, USA), con un rango espectral de análisis que va de 200 nm a 1100 nm y una resolución que va de 0.1 nm en el ultravioleta hasta 0.3 nm en el infrarrojo. El sistema utiliza un láser Nd:YAG que emite hasta 250 mJ en cada pulso de 10 ns de duración, con una longitud de onda de 1064 nm. Los espectros se recogen con ayuda de un haz de siete fibras ópticas la luz de la chispa y la transportan hasta un arreglo de siete espectrómetros Czerny-Turner con detector CCD (de 4096 pixeles cada uno) que muestrean sucesivos intervalos espectrales sobre el rango espectral total.

Una cámara de video permite monitorizar la muestra y definir manualmente el lugar de incidencia del láser a voluntad. Una lente de 50 mm de distancia focal se usa tanto para el sistema de imagen, como para enfocar el láser sobre la muestra. Esta lente puede desplazarse verticalmente para enfocar.

La muestra se coloca sobre una plataforma deslizable mediante tornillos horizontalmente sobre el plano XY de la muestra.

El software utilizado para la colección y el análisis de datos es OOLIBS, y es provisto por el fabricante del instrumento. Un esquema del sistema LIBS utilizado se muestra en la Figura 1.

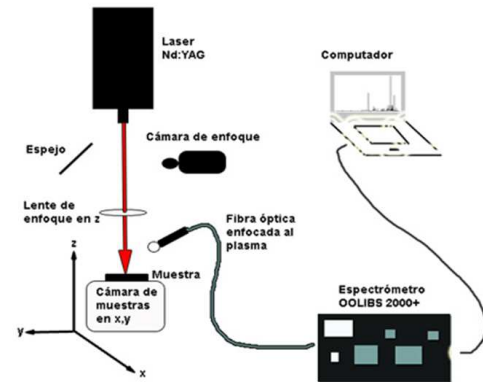


Figura 1: Esquema del instrumento usado donde se muestran las partes básicas.

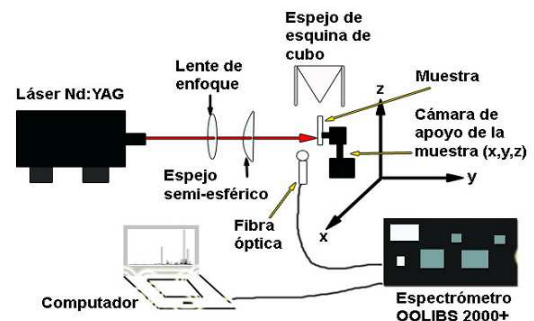


Figura 2: Esquema experimental para el experimento de auto-absorción

Instrumento para el estudio de la auto-absorción

Para estudiar la auto-absorción se construyó un arreglo experimental utilizando un espejo semiesférico y otro en forma de esquina de un cubo (conocido como retroreflector) para reflejar la luz de la chispa de vuelta al plasma. El sistema contó con un arreglo de desplazamiento micrométrico en las direcciones X-Y, y uno de menor precisión en la dirección z. Este esquema experimental se muestra en la Figura 2.

Sustratos y reactivos

Los sustratos que se compararon en este trabajo son: 1) policarbonato (en disco compacto, CD), 2) una oblea de silicio, 3) pastillas de carbono activado compactadas, 4) grafito, y 5) superficies de acero rayadas con lápiz HB. Para el análisis, sobre cada uno de los sustratos estudiados se depositó 1 μL de una solución acuosa de sales a concentraciones dadas, usando pipetas calibradas. Las superficies se limpiaron previamente con agua des-ionizada. Debido a los pobres resultados obtenidos inicialmente con la superficie de la oblea de silicio esta se lavó de forma especial en un segundo intento antes de depositar los líquidos. Para el lavado a profundidad se usó una solución 'piraña' (una mezcla equimolar de

agua oxigenada y ácido sulfúrico) y luego se culminó con un lavado con agua desionizada.

La superficie de acero se lavó con agua y luego se cubrió completamente con el rayado del lápiz, evitando dejar espacios sin cubrir. La limpieza de estos sustratos para subsecuentes mediciones se hizo puliendo con lija fina 1200 antes del lavado correspondiente.

Las sales incluidas en este estudio fueron provistas por Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) y fueron: Cloruro de Sodio, NaCl, Cloruro de Bario, BaCl, Cloruro de Calcio, CaCl₂, Nitrato de Cobre, Cu(NO₃)₂, Nitrato de Estroncio, Sr(NO₃)₂, Cloruro de Indio, InCl₃, Cloruro de Potasio, KCl, Sulfuro de Litio, LiSO₄, Cloruro de Rubidio, RbCl, y Cloruro de Cesio, CsCl. Las sales se disolvieron en agua des-ionizada en un rango de concentraciones de 1 a 100 ppm. En la Figura 3 se muestra un espectro típico LIBS obtenido para el cloruro de Bario (Ba). Los cationes se asociaron fácilmente con los picos espectrales correspondientes sugeridos por la librería presente en OOILIBS.

Para los experimentos el auto absorción, se trabajó con soluciones de KCl y CsCl, a dos concentraciones, una prácticamente saturada letra con un valor menor. En este caso su trabajo con energías por pulso entre 75 y 200 mJ. En cada caso, se adquirieron espectros sin espejos y espectros con los dos espejos, para su respectiva comparación.

Una solución base de arsénico disuelto en agua fue provista por el laboratorio de Aguas de la Escuela Politécnica Nacional en una concentraciones de 1000 ppm. Una curva de calibración para esta sustancia se construyó preparando soluciones diluidas en diferentes concentraciones. Para el análisis del arsénico solamente se detectó un pico asociado en 228.812 nm.

En primera instancia se compararon los sustratos en términos de sensibilidad y linealidad para cada uno, para lo cual se tomaron las áreas de los picos a analizar con sus respectivas concentraciones de cada uno. La Figura 4 muestra la variación observada para un pico de estroncio a 707.032 nm para la misma concentración en solución pero para diferentes sustratos. Se puede colegir que existe una mejor sensibilidad para sustratos como la superficie rayada con lápiz y el grafito, y una peor para pastillas compactadas.

Debido a que la superficie de acero rayada con lápiz mostró un desempeño excepcional en términos generales, se hicieron mediciones incluyendo más puntos analíticos y se extendió el rango de concentraciones hasta 1000 ppm para este sustrato con cuatro de las sales. En este caso se tomaron 5 espectros por punto para las sales LiSO₄, RbCl y BaCl₂, y solo 3 espectros para Sr(NO₃)₂. Los elementos de interés correspondientes fueron Li, Rb, Sr y Ba. Los picos espectrales correspondientes se reportan en la Tabla 1. Tanto los disparos únicos como los promedios de todos los disparos fueron registrados.

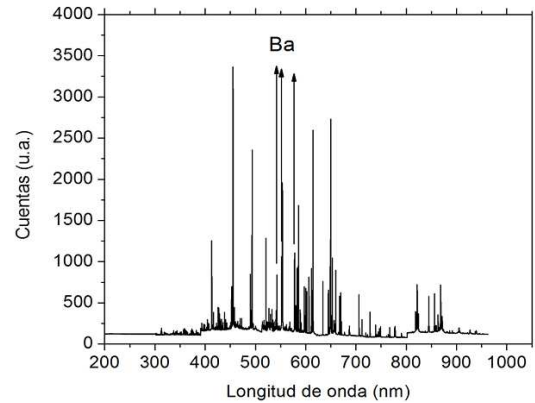


Figura 3: Espectro promediado de 4 disparos del láser de BaCl₂, con 62.5 mJ de intensidad del láser. Se resaltan tres picos espectrales de Bario

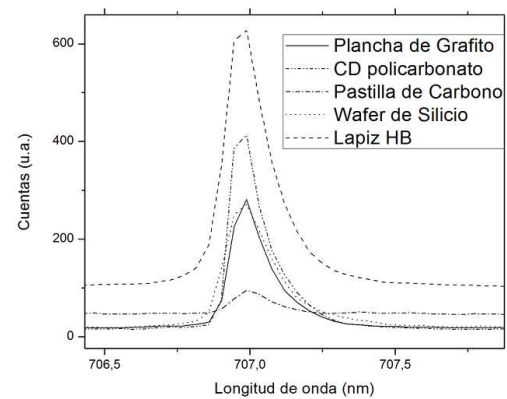


Figura 4: Intensidad del pico de estroncio (Sr) en 707.032 nm para los 5 diferentes sustratos analizados.

Las mediciones se repitieron tres veces para verificar la reproductibilidad y mejorar la estadísticas. El análisis final de los datos fue el promedio de todas las áreas correspondientes a los picos analizados.

La energía estimada por pulso dependiendo de la sal analizada estuvo en el rango de 62.5 a 87.5 mJ, según la escala del fabricante del láser. El láser no se enfocó exactamente en la superficie sino a aproximadamente 2 milímetros por debajo de la misma para evitar una penetración muy profunda del láser sobre la muestra.

Análisis de Datos

Las áreas de los picos fueron calculados con las herramientas disponibles en OOILIBS. De acuerdo con el fabricante, un pico es definido por un centroide y dos valores de longitud de onda (las alas) definidos a los lados de éste, que marcan los extremos del pico. Se traza una línea entre los puntos que definen las alas (longitud de onda e intensidad). La línea así trazada define el background local para el espectro, que sustraído del área total debajo del pico da el área efectiva correspondiente que se asigna al pico. Subsecuentemente se asocia esta área con la concentración de la especie química nominal.

La comparación de los valores de área asociadas con concentraciones diferentes permite construir una curva

Elementos	λ (nm)
Estroncio	460.73
	640.85
	650.40
	707.01
Litio	610.37
	670.79
	812.78
Bario	553.55
	652.73
	659.53
	705.99
Rubidio	728.03
	420.19
	780.03
	794.76

Tabla 1: Picos característicos de Li, Rb, Sr y Ba para el sustrato de acero rayado con lápiz HB

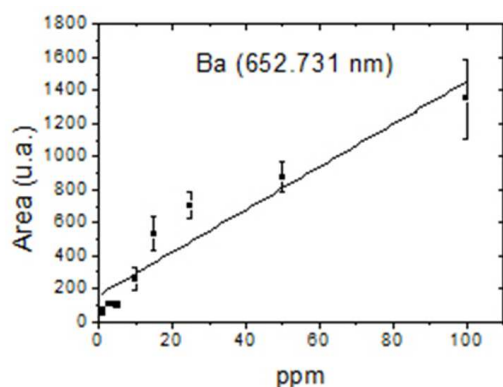


Figura 5: Curva de calibración obtenida utilizando el método de remoción de outliers para el Bario ($R=0.90$, $P=12.935$).

de calibración. Estas curvas son típicamente lineales para rangos restringidos de la concentración del analito. Para definir la expresión matemática de estas curvas se recurre a una regresión lineal, o no lineal, dependiendo del rango de concentraciones considerado.

Para el estudio del auto absorción, no se pudieron realizar mediciones cuantitativas. Sin embargo, el efecto de la concentración el catión que el agua sobre la forma diaria del pico correspondiente, se estudió cualitativamente.

Resultados

Comparación de sustratos

La comparación de sustratos analíticos se hizo en base a los parámetros de sensibilidad, linealidad (para el relativamente reducido rango de concentraciones considerado), límite de detección, reproducibilidad, y facilidad de preparación de la muestra.

Los sustratos de carbón activado compactado mostraron deficiencias analíticas muy importantes en todos los parámetros. Una razón para esto es la alta porosidad de este tipo de sustrato, lo que provoca la absorción de la solución en el interior de la pastilla con la consecuente la pobre respuesta superficial.

Así mismo, la oblea de silicio presentó problemas importantes debido a su alta hidrofobicidad inicial. Esta condición provocó que la solución de analito se esparza sobre un área muy grande, y consecuentemente que los depósitos cristalinos sean demasiado heterogéneos y difíciles de analizar. Esto afectó significativamente el desempeño analítico del sustrato para los parámetros indicados, especialmente la reproducibilidad. Se ha planteado la posibilidad de hacer la superficie de la oblea completamente hidrofóbica para garantizar la formación de spots homogéneos. Estos estudios están en progreso en nuestro laboratorio.

Los detalles de la comparación de los sustratos se presentan en el Anexo 1

Los resultados indicados muestran la gran ventaja analítica de dos sustratos: 1) la superficie de acero rayado con lápiz HB y, 2) la superficie de grafito, frente a los demás, particularmente en lo que se refiere a la linealidad y la sensibilidad. El segundo sustrato fue reportado por *Vander Wal et al.*, y fue la motivación para este trabajo. El primero se introduce por primera vez para LIBS aquí. Debe mencionarse, que el mismo sistema de acero rayado con lápiz HB ha sido también como un buen sistema para la preparación de muestras en la técnica de ionización llamada Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization (MALDI), muy utilizada en espectrometría de masas [26, 27, 22].

El sustrato de policarbonato (superficie de un CD) mostró un rendimiento aceptable, pero debajo del grafito y de la superficie rayada con lápiz HB.

La repetibilidad, sensibilidad y linealidad de este sustrato fueron cercanas en los tres mejores casos: grafito, policarbonato y superficie rayada con lápiz, pero la sensibilidad es el último caso fue algo mejor que las demás.

El método propuesto por *Jijón et al.* [1] se utilizó para construir las curvas de calibración finales para los elementos Li, Rb, Sr y Ba para el sustrato de acero rayado con lápiz HB. Un ejemplo de una curva de calibración típica construida con la aplicación de este método se muestra en la Figura 5. Esta corresponde al BaCl. La curva indicada muestra un comportamiento lineal aceptable, buena sensibilidad y bajo error relativo por punto. Un resumen de los resultados obtenidos para las cuatro sales antes indicadas sobre la superficie rayada con lápiz se aprecia en el Anexo 2.

Auto-absorción y su efecto en la cuantificación

El efecto no-lineal en la cuantificación debido al fenómeno de la auto-absorción puede ser demostrado con el setup mostrado la sección de la parte experimental de

este trabajo. Un ejemplo de un pico de cesio que muestra la característica típica del auto absorción se muestra en la Figura 6. Este espectro fue obtenido usando una energía por pulso de 200 mJ. La característica saliente del auto absorción es la indentación en la parte superior del pico. En general, en los experimentos realizados se pudo observar tanto la altura de los picos como su ancho y perfil, se modifican bajo condiciones de auto absorción. Se observó además que para valores de concentración del analito progresivamente más grandes, el efecto se incrementa correspondientemente, pero no de forma lineal. Esta situación afecta directamente a la cuantificación, ya que las áreas medidas para los picos obtenidos se afectan también no linealmente.

Aplicación del método para el arsénico disuelto en agua

El arsénico disuelto en agua tiene mucha relevancia en el tema de medio ambiente y salud pública. Existen algunas técnicas establecidas para cuantificar la concentración de este elemento en aguas de diferentes procedencias. Aun así, siempre es necesario explorar nuevas opciones y alternativas. En nuestro caso, LIBS es una elección atractiva debido a las ventajas propias de la técnica, especialmente a su rapidez de análisis. Gracias a que los resultados presentados en este artículo son un buen antecedente, se intentó usar la metodología para una muestra real de arsénico (valencia +3) en agua. El rango de concentraciones se extiende hasta 1000 ppm, lo cual mucho más allá del rango inicialmente probado con ayuda de este método. Por esta razón, se podría prever, te pido al efecto del auto absorción antes indicado, que la curva de calibración adquiriera características no lineales.

La curva de calibración obtenida para el arsénico se puede observar en la Figura 7. Para esta curva se logró un muy buen ajuste para una función de crecimiento exponencial concentración. A partir de estos resultados, es posible determinar formalmente el límite de detección de este elemento con esta técnica (ver referencias [3] y [28] para una explicación de cómo se realiza esto). El límite de detección calculado fue de 3.2 ppm, el cual se compara muy favorablemente frente a trabajos anteriores con LIBS (400 ppm) [29].

Conclusiones

En este trabajo se introduce una metodología robusta para cuantificar mediante LIBS la concentración de cationes metálicos disueltos en agua. Para el establecimiento de este método se ha estudiado los procesos físicos subyacentes a la técnica LIBS, se ha introducido un novedoso sustrato analítico, y se ha definido un procedimiento estadístico de análisis adecuado.

Se compararon cinco sustratos con posible valor analítico: policarbonato, grafito, carbón activado compactado, oblea de silicio, y la superficie de acero rayada con lápiz HB, para varios factores de rendimiento analítico.

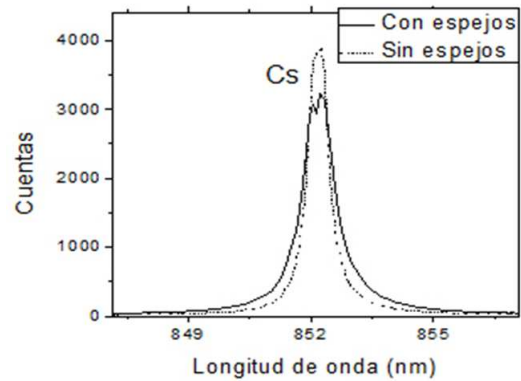


Figura 6: Auto-absorción en el pico de 850.11 nm para el Cs.

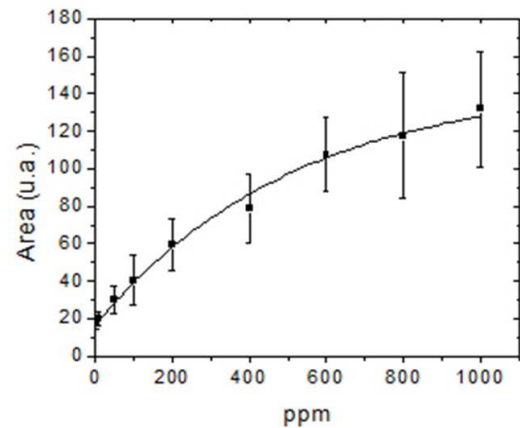


Figura 7: Curva de calibración para el As en el rango de concentraciones de 6 a 1000 ppm, donde se puede ver los efectos de la auto-absorción (R=0,993).

Estos factores incluyeron la linealidad, la sensibilidad, una cuota superior del límite de detección, la reproducción y ciudad, y la facilidad de preparación del sustrato. En términos generales los mejores sistemas resultaron ser el grafito, ya anteriormente reportado, y el nuevo sistema de acero rayado con lápiz HB.

La medición de las concentraciones para la construcción de las curvas de calibración requiere que se deposite una alícuota de la solución de detección sobre sustrato analítico y se deje secar. Los disparos de láser se tienen que hacer sobre los depósitos cristalinos resultantes. Los espectros deben ser adecuadamente promediados y procesados estadísticamente. Con esto se logran curvas de calibración satisfactoriamente lineales, con buena sensibilidad y relativo bajo límite de detección, para concentraciones de hasta 100 ppm.

Se determinó como el fenómeno de auto-absorción de la señal LIBS por el mismo plasma puede afectar el comportamiento matemático de las curvas de calibración que se pueden construir con LIBS para las concentraciones de los cationes analizados. Se concluye, que en general, para rangos de concentración relativamente grandes, este efecto hace que las curvas de calibración muestren características no-lineales.

Referencias

- [1] Jijón, D., and Costa, C. 2011. "Pencil Lead Scratches on Steel Surfaces as a Substrate for LIBS Analysis of Dissolved Salts in Liquids". *Journal of Physics: Conference Series*. 274(1), 1–9.
- [2] Cremers, D., and Radziemski, L. 1987. "Laser Plasmas for Chemical Analysis". *Industrial Applications of Lasers*. (5) 352–415.
- [3] Radziemski, L., and Cremers, D. 1989. "Spectrochemical Analysis Using Plasma Excitation". *Laser-induced Plasmas and Applications*. (Chap. 7), 295–326.
- [4] Yueh, F., Singh, J., and Zhang, H. 2000. "Elemental Analysis with Laser-Induced Breakdown Spectroscopy". *Encyclopedia of Analytical Chemistry*. 2066–2287.
- [5] Rusak, D., Castle, B., Smith, B., and Winefordner, J. 1997. "Fundamentals and Applications of Laser-induced Breakdown Spectroscopy". *Critical Reviews in Analytical Chemistry*. 27, 257–290.
- [6] Singh, J., Yueh, F., Zhang, H., and Cook, R. 1997. "Study of Laser induced Breakdown Spectroscopy as a Process Monitor and Control Tool for Hazardous Waste Remediation". *Process control and quality*. 10, 247–258.
- [7] Zhang, H., Yueh, F., and Singh, J. 1997. "Laser-Induced Breakdown Spectrometry as a Multimetal Continuous-Emission Monitor". *Appl. Opt.*. 38, 1459–1466.
- [8] Zhang, H., Yueh, F., and Singh, J. 2001. "Performance Evaluation of Laser-Induced Breakdown Spectroscopy as a Multi-Metal Continuous Emission Monitor". *J. Air and Waste Management Assoc.* 51, 681.
- [9] Singh, J., Zhang, H., and Yueh, F. 1996. "Plasma Arc Centrifugal Treatment Pact-6 Slip Stream Test Bed (SSTB) 100-Hour Duration Controlled Emission Demonstration (CED) Test". *DIAL Trip Report*. 96.
- [10] Wachter, J., and Cremers, D. 1987. "Determination of Uranium in Solution Using Laser-Induced Breakdown Spectrometry". *Appl. Spectrosc.* 41, 1042.
- [11] Ng, C., Ho, W., and Cheung, N. 1997. "Spectrochemical Analysis of Liquid Using Laser-Induced Plasma Emissions: Effect of Laser Wavelength on Plume Properties". *Appl. Spectrosc.* 51(7), 976–983.
- [12] Arca, G., Ciucci, A., Palleschi, V., Rastelli, S., and Tognoni, E. 1997. "Trace Element Analysis in Water by the Laser-Induced Breakdown Spectroscopy Technique". *Appl. Spectrosc.* 51, 1102–1105.
- [13] Nakamura, S., Ito, Y., Sone, K., Hiraga, H., and Kaneko, K. 1996. "Determination of an Iron Suspension in Water by Laser-Induced Breakdown Spectroscopy with Two Sequential Laser Pulses". *Anal. Chem.* 68, 2981–2986.
- [14] Ito, Y., Ueki, O., and Nakamura, S. 1995. "Determination of Colloidal Iron in Water by Laser-Induced Breakdown Spectroscopy". *Anal. Chimica Acta.* 299, 401–405.
- [15] Meggers, W. 1951. "The Spectroscopy of Technetium and Promethium". *Spectrochimica Acta.* 4, 317–326.
- [16] Cremers, D., Radziemski, L., and Loree, T. 1984. "Spectrochemical Analysis of Liquids Using the Laser Spark". *Appl. Spectrosc.* 38, 721.
- [17] Knopp, R., Scherbaum, F., and Kim, J. 1996. "Laser Induced Breakdown Spectrometry (LIBS) as an Analytical Tool for the Detection of Metal Ions in Aqueous Solution". *Fresenius' J. Anal. Chem.*. 355(1), 16–20.
- [18] Arca, G., Ciucci, A., Palleschi, V., Rastelli, S., and Tognoni, E. 1997. "Diagnostics of Trace Pollutants in Water by Laser Induced Breakdown Spectroscopy Technique". *Appl. Spectrosc.* 51, 1102–1105.
- [19] Berman, L. and Wolf, P. 1998. "Laser Induced Breakdown Spectroscopy of Liquids: Aqueous Solutions of Nickel and Chlorinated Hydrocarbons". *Appl. Spectrosc.* 52, 438.
- [20] Cremers, D. and Radziemski, L. 2006. "Handbook of Laser-Induced Breakdown Spectroscopy". *John Wiley & Sons Ltd. The Atrium*. 53–115.
- [21] Infracawan, M., Ichwan, Y., Suyanto, H., Suliyanti, M. M., Hedwig, R., Pardede, M., Kagawa, K., Lie, T. J., and Kurniawan, K. H. 2005. "Quantitative Analysis of Liquid by Quick Freezing into Ice Using Nd-YAG Laser-Induced Atmospheric Plasma". *PROC. ITB Eng. Science*. 37 B, No. 1, 49–65.
- [22] Wal., R. L. V., Ticich, T. M., West, J. R., and Household, P. A. 1999. "Trace Metal Detection by Laser-Induced Breakdown Spectroscopy". *Society for Applied Spectroscopy*. 53(10), 1226–1236.
- [23] Ctvrtníčková, T. 2008. "Analysis of Solid Materials by Means of Laser-Induced Breakdown Spectroscopy". *Masaryk University: Faculty of Science*. Doctoral Thesis, 38–39.
- [24] Lazic, V., Barbini, R., Colao, F., Fantoni, R., and Palucci, A. 2001. "Self-Absorption Model in Quantitative Laser Induced Breakdown Spectroscopy Measurements on Soils and Sediments". *Spectrochimica Acta Part B*. 56, 807–820.
- [25] Bekefi, G. 1976. "Principles of Laser Plasmas". *John Wiley & Sons Ltd*,
- [26] Black, C., Poile, C., Langley, J., and Herniman, J. 2006. "The Use of Pencil Lead as a Matrix and Calibrant for Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization". *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 20, 1053–1060.
- [27] Langley, J., Herniman, J., and Townell, M. 2007. "2B or not 2B, that is the Question: Further Investigations into the Use of Pencil as a Matrix for Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization". *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 21, 180–190.
- [28] Jijón, D. and Costa, C. 2011. "Estudio de los fenómenos físicos en LIBS y su Efecto en la Cuantificación de la Concentración de Cationes Metálicos Disueltos en Agua". *Diploma thesis, Fac. Ciencias, Escuela Politécnica Nacional*.
- [29] IARC. 2004. "Arsenic in Drinking-Water". *IARC Monographs Volume 84*, <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol84/mono84-6A.pdf>.

Anexo 1: Resultados obtenidos al analizar los diferentes substratos con los diferentes criterios de selección de sensibilidad y linealidad (R: coeficiente de correlación, A: Intensidad de la señal LIBS dividido para el background definido para la menor concentración (sensibilidad a bajas concentraciones), λ : longitud de onda). NO significa un pobre comportamiento lineal, y si el coeficiente de correlación es menor a 0.6 no se lo consideró lineal en este estudio.

Substrato	Sal	λ (nm)	Elemento	Linealidad	Sensibilidad	
				R	Pendiente	A en (3ppm)
Oblea de silicio	LiSO ₄	670.78	Li	0.527	NO	26.210
	Sr(NO ₃) ₂	640.85	Sr	0.512	NO	1.689
	CaCl ₂	643.91	Ca	0.985	4.483	1.225
	RbCl	780.027	Rb	-0.113	NO	12.197
Plancha de Grafito	LiSO ₄	670.78	Li	0.303	NO	19.724
	Sr(NO ₃) ₂	707.08	Sr	0.957	0.804	13.892
	CaCl ₂	643.91	Ca	0.934	0.975	1.449
	RbCl	780.027	Rb	NO	NO	NO
Policarbonato	LiSO ₄	670.78	Li	0.435	NO	60.667
	Sr(NO ₃) ₂	640.85	Sr	0.906	1.942	5.280
	CaCl ₂	643.91	Ca	0.829	1.742	2.552
	RbCl	780.027	Rb	0.753	5.994	12.735
Pastillas de carbón compactado	LiSO ₄	670.78	Li	NO	NO	NO
	Sr(NO ₃) ₂	640.85	Sr	0.656	0.749	1.435
	CaCl ₂	643.91	Ca	NO	NO	NO
	RbCl	780.027	Rb	NO	NO	NO
Lápiz HB	LiSO ₄	670.78	Li	0.768	17.532	5.667
	Sr(NO ₃) ₂	640.85	Sr	0.949	13.555	1.738
	BaCl ₂	552.88	Ca	0.515	NO	5.036
	RbCl	780.027	Rb	0.781	8.631	1.978

Anexo 2: Resultados de los ajustes correspondientes a las curvas de calibración para las sales indicadas, usando el esquema estadístico introducido.

	LiSO ₄ Li	Error	Sr(NO ₃) ₂ Sr	Error	BaCl ₂ Ba	Error	RbCl Rb	Error
Pico 1	610.365		460.733		553.548		420.883	
Corte	193.564	23.037	43.036	12.829	630.984	90.941	43.036	12.829
Pendiente	9.574	0.500	3.924	0.278	29.206	2.215	3.924	0.278
R	0.979		0.961		0.961		0.961	
Pico 2	670.790		640.847		652.731		780.027	
Corte	750.050	55.734	45.421	51.996	159.610	68.215	157.263	33.067
Pendiente	13.359	1.210	12.168	1.001	12.935	1.661	7.974	0.718
R	0.938		0.961		0.895		0.939	
Pico 3	812.780		650.4		659.533		794.76	
Corte	20.752	11.073	36.290	42.207	134.327	58.177	94.669	18.353
Pendiente	3.998	0.240	9.325	0.813	10.922	1.417	4.643	0.398
R	0.972		0.956		0.893		0.944	
Pico 4			707.01		705.994			
Corte			23.920	29.538	99.658	36.427		
Pendiente			6.084	0.569	7.896	0.887		
R			0.950		0.918			
Pico 5					728.030			
Corte					71.580	22.106		
Pendiente					4.460	0.538		
R					0.906			

Implementing a Quadrature NMR Spectrometer based on a passive RC splitter-combiner network

Dennis Cazar Ramírez^{1,2*}, Marco Villa³

¹Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Facultad de Ciencias
Panamericana Sur Km 1 1/2, Riobamba, Ecuador

²Grupo Ecuatoriano para el Estudio Experimental y Teórico de Nanosistemas –GETNano–
Diego de Robles y Via Interoceánica, Universidad San Francisco de Quito

³Università degli Studi di Bergamo, Facoltà di Ingegneria
Viale Marconi 5, 24044, Dalmine (BG), Italy

*Autor principal/Corresponding author, e-mail: dennis.cazar@gmail.com

Editado por/Edited by: Cesar Zambrano, Ph.D.

Recibido/Received:10/25/2011. Aceptado/Accepted:11/05/2011.

Publicado en línea/Published on Web:12/20/2011. Impreso/Printed:12/20/2011.

Abstract

The present article will explain in some details the requirements of modulators and demodulators using quadrature splitters and combiners, and discuss the target specifications for these devices. The architecture of a passive RC network, useable as a quadrature splitter/combiner is then introduced, the design choices are described, the results of simulations and tests are given. Then, we present a full characterization of some of our modulators and demodulators along with a tuning strategy which achieves an outstandingly accurate quadrature signal processing, and characterizes the error terms of the device at the same time.

Keywords. NMR Spectrometer, Quadrature Signal Processing.

Resumen

El presente artículo describe la arquitectura de un espectrómetro NMR en cuadratura, se identifican los componentes claves que marcan el límite entre los mundos analógico y digital. Se explican en detalle los requerimientos de un modulador y demodulador que usan splitters y combiners en cuadratura y se discuten las especificaciones necesarias para estos elementos. Se introduce la arquitectura de una red RC pasiva utilizada como splitter-combiner, se describen las decisiones tomadas en el diseño y se presentan los resultados de simulaciones y test. Para terminar se presenta una caracterización total de algunos moduladores y demoduladores junto con las estrategias de calibración las cuales alcanzan una altísima precisión en el proceso de señales en Cuadratura y caracterizan al mismo tiempo los errores del sistema.

Palabras Clave. Espectrómetro RMN, Proceso de Señales en Cuadratura.

Introduction

Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy is an analytical technique used by chemists to investigate the properties of organic molecules, though it is applicable to any kind of sample that contains nuclei possessing spin. In order to increase the performance of NMR spectrometers new signal processing techniques has been introduced over the years. Quadrature signal processing will be described below together with its application on NMR spectrometers

Conventional signal processing implements operations upon real-valued functions while quadrature signal pro-

cessing is best described by complex functions. Frequency conversion, filtering, modulation and demodulation are basic operations which may be performed with quadrature devices. Radio-frequency spectroscopies (in particular NMR) contributed significantly to development of quadrature techniques and devices which now find their main applications in telecommunication systems, such as mobiles phones and satellite communications. Quadrature signal processing is performed in digital and/or analog ways.

Digital processing can be made nearly ideal, but it is limited in the bandwidths (or frequencies) that it can cover [1]. The bandwidth/frequency limit in the analog



domain is in the 1010 Hz range (2 or 3 orders of magnitude above the typical digital limit), but usually, accuracy of analog quadrature devices is relatively poor, and their bandwidths are small fractions of central frequencies. As we will see later these limitations mostly arises from either the quadrature splitter or the combiner and, in the worst case, from both of them. The analog quadrature splitter generates the Hilbert pair of signals from a single signal in input; the combiner performs the reverse operation. Both of them are inherently narrow-band devices, to the difference of radio frequency components such as amplifiers, attenuators, 0° power splitters, adders, multipliers which are inherently broadband.

The broadband heterodyne NMR spectrometer

Figure 1 shows the conceptual scheme of the historic heterodyne NMR spectrometer. In the transmitter side (TX) the LO and IF signals are mixed and filtered to obtain the RF irradiation. In the receiver (RX), the response signal $RF' \sim RF$ is first translated into the IF band and then converted to baseband [2]. The baseband low pass filter has often a small width; we may record its response while sweeping the excitation (RF) or the response RF' by changing B° (continuous wave methods). If the excitation is a pulse of duration smaller than the inverse bandwidth of RF' , we have two possibilities: recording the integral response, when RF' is in the middle of the RF' band, or recording the entire spectrum, when we make sure that it lies entirely above ($RF' > RF$) or below ($RF' < RF$) the excitation; in the last case, the cutoff frequency of the baseband filter should be at least equal to the full width of spectrum.

The scheme is simple and essentially broadband. For example, with an $IF = 170$ MHz, and a LO variable in the 20-200 MHz interval, we may easily cover the transmitter range 1-150 MHz with a 150 MHz low pass filter having a stop band at 50 dB beginning around 190 MHz, and the 190-370 MHz range with a high pass filter having a 150-190 MHz transition region [3]. The requirement of a pure transmitted signal may appear not necessary since the resonant circuit of the probe acts as a filter.

However, if a broadband amplifier is used, substantial amounts of power may be reflected back, which may damage the amplifier or reduce its performance. Furthermore, some types of excitations, as homodecoupling, may require a spurious-free dynamic range as high as 100 dB in the RF' interval.

In the receiver side, the 170 MHz bandpass filter in the IF section may be few MHz wide while the final receiver bandwidth should be set by the adjustable baseband filter. The IF frequency is a forbidden one for the system; in spectrometers working with a fixed magnetic field, the IF is usually set between the frequencies of ^{31}P and ^{19}F where only the resonances of ^{203}Tl and ^{205}Tl occur [2].

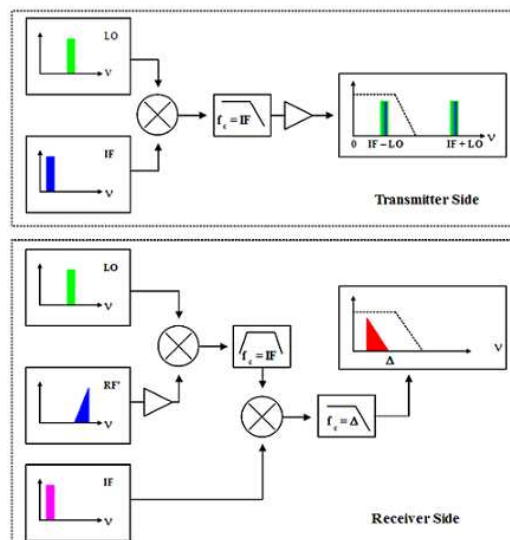


Figure 1: Block diagram of an Heterodyne NMR Spectrometer.

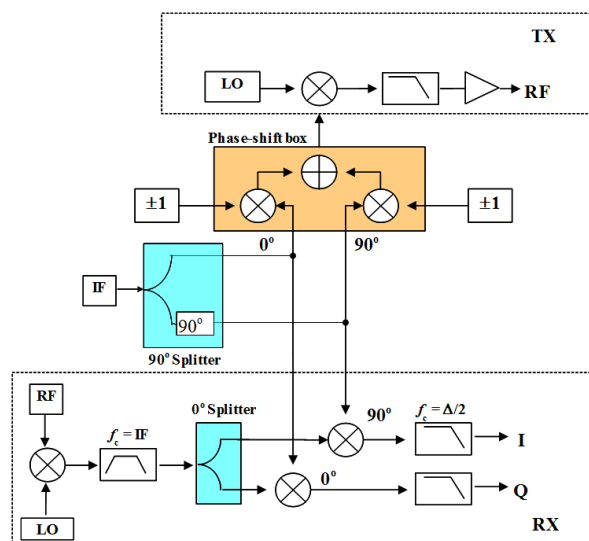


Figure 2: Block diagram of a quadrature NMR spectrometer.

The quadrature NMR spectrometer

Development of the NMR spectrometers over the past 30 years has spearheaded the introduction of quadrature techniques in the radiofrequency field. The classic scheme of a broadband spectrometer using these techniques in both the transmitter and receiver sides is a variation of the previous heterodyne spectrometer, (c.f. Figure 1).

The basic difference is a quadrature IF splitter which provides both the cosine and sine waves of the IF signal: $IF(0^\circ)$ and $IF(90^\circ)$. In the transmitter section, it is also shown a very simple phase-shift box, the so called quadrature modulator, which permits changing the phase of the excitation in steps of 90° . In the receiver section, after mixing with the LO and IF-filtering, the IF signal is equally split into two twins baseband converters, where it is mixed with $IF 0^\circ$ and $IF 90^\circ$ [4].

Relative to the previous design, the quadrature spec-

trometer has the following advantages:

- The phase of the excitation may be controlled in steps of 90° , a feature required by most NMR experiments.
- The excitation may be placed in the center of the spectrum.
- The baseband filters may be set to half the spectral bandwidth, to $\Delta/2$, rather than Δ , leading to a 3 dB gain in the signal-to-noise ratio (SNR). In fact, in the scheme of the heterodyne spectrometer, the noise comes from the $-\Delta$, $+\Delta$ band while the entire signal is within only half of that band. In this case, instead, band of the noise and band of the signal are matched.

The disadvantages of this scheme are:

- Due to non-idealities, if the splitter is not well trimmed, and the two baseband converters are not exactly the same, ghosts are generated, i.e. a replica with reduced intensity, of the spectrum mirrored in the opposite side relative to the zero frequency.
- Every DC offset in the DC-coupled receiver yields a zero frequency spike.

Both these defects may be reduced by trimming, or suppressed by phase cycling. The tunable lowpass filters was cumbersome to build and added significantly to noise distortion. Today they may be replaced by their digital counterparts [5].

Blending new digital and analog signal processing technologies

After the quadrature spectrometer was conceived, the evolution in cost and performance of the analog components, driven by the telecommunication market, has been spectacular. Four quadrants multipliers, based upon Gilbert cells, are replacing the hybrid balanced mixers; inexpensive active components simplify impedance matching. Rather than filtering out the unwanted sidebands, it is becoming more convenient to use a single sideband mixer as the HPMX2001 from Hewlett Packard [6] schematically shown in Figure 3.

The two LO inputs accept frequencies up to 1.2 GHz; the modulation IF inputs go up to 700 MHz and are DC coupled. The narrowband part is usually the quadrature LO splitter, which is typically optimized over less than an octave. On the other hand, it seems natural to attain phase and amplitude modulation of the output by controlling the IF signals with digital techniques. An implication is that the IF signals should be, at most, in the 10^7 Hz range to allow high dynamic range (12 bits or more) digital signal processing.

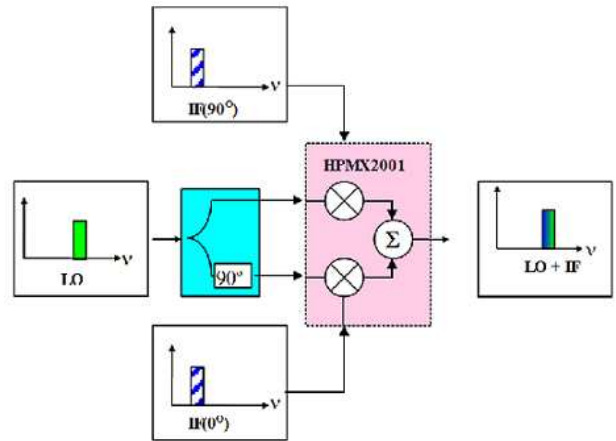


Figure 3: A transmitter scheme showing the Single Side Band Modulator (dashed box).

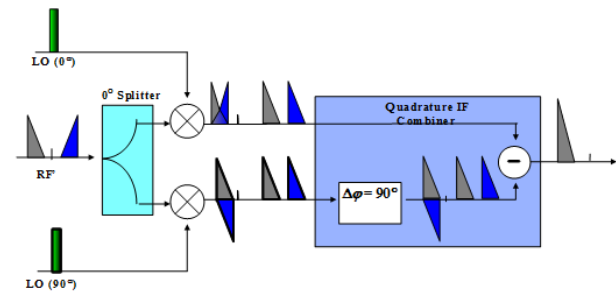


Figure 4: A band reject mixer, bold figures represent a 90° out of phase.

In the analog portion of the receiver, quadrature techniques should be used to suppress the unwanted sideband arising from the LO-RF conversion. In fact, if the received signal is near LO-IF, also the noise at LO+IF would be converted into the IF band by a conventional mixer. The scheme of the band reject mixer (c.f. Figure 4) which suppresses the unwanted band and its noise is shown [7]. Here, the critical component is the quadrature IF combiner, and its figure of merit is the attenuation of the forbidden band relative to the allowed one. Obviously, such an attenuation will depend also upon the accuracy of the quadrature LO splitter.

After a proper bandpass filter, the IF signal should be digitized. The design of the Nyquist filter before the AD converter is not critical. For example, assume a sampling frequency of 10 MHz and require a flat response within 0.5 dB up to 3.5 MHz with an attenuation > 70 dB above 6.5 MHz; a 9 stages Butterworth filter will be enough. The high pass interference filter is even less critical, and selection of this cut-off frequency is mostly a matter of taste.

The baseband quadrature conversion of the IF signal, $S(t)$, can be performed digitally by mixing the digitized signal s_n , with two sequences of number representing the *cosine* and *sine* of the IF frequency [5]. Subsequent digital filters and decimators (DFD) achieve the desired receiver bandwidth and enhance the dynamic

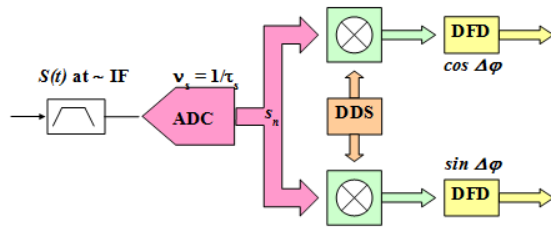


Figure 5: Block diagram of a Baseband quadrature converter.

range. The scheme of the digital quadrature detector is shown in Figure 5 [4].

A simple way to obtain the conversion is to set, $\Delta\psi = \pi/2$, which makes the multiplying numbers equal to ± 1 and 0. However, the full quadrature converter, including the quadrature Direct Digital Synthesizer (DDS), is now available as inexpensive single chips, which give an extra feature: user can choose the center frequency of conversion [8].

The Nyquist frequency of both data streams generated by sampling at 10 MHz is orders-of-magnitude larger than a typical high resolution spectrum. While the associated oversampling eases the design of the filter before the ADC and lowers the quantization noise floor (by spreading the quantization noise over a broader spectrum), it increases the requirements on the digital filter before the ADC and lowers the quantization noise floor (by spreading the quantization noise over a broader spectrum), it increases the requirements on the digital filter [9]. With an oversampling factor of 1000 and a 10^7 words/sec rate, we need about 10^{10} multiply & accumulate (MAC) operations per second to make a low-quality real-time Finite Impulse Response (FIR) filter. Since nowadays there is no way of accommodating the requirements of high quality narrowband filtering with a single-stage digital filter, more steps should be used. One of the possible configurations is the following:

- Averaging and decimating by m . The integrator should add at a $v_o = 10$ MHz rate, which is easily achievable even with discrete TTL circuits.
- FIR filtering the output of the integrator followed by decimation to the desired bandwidth. This decimation should be of the order of ten, or larger, in order to achieve an acceptable integrator response, in terms of flatness and aliasing noise, it's verified only when the cut-off frequency is about ten times smaller than the Nyquist frequency of the input streams.

The digital quadrature receiver has the following advantages over its analog counterpart:

- Since $S(t)$ is AC coupled, analog DC offsets do not matter, and digital offsets are easily handled.
- No ghosts are generated because the two digital channels are identical by design and IF signals are perfectly in quadrature.

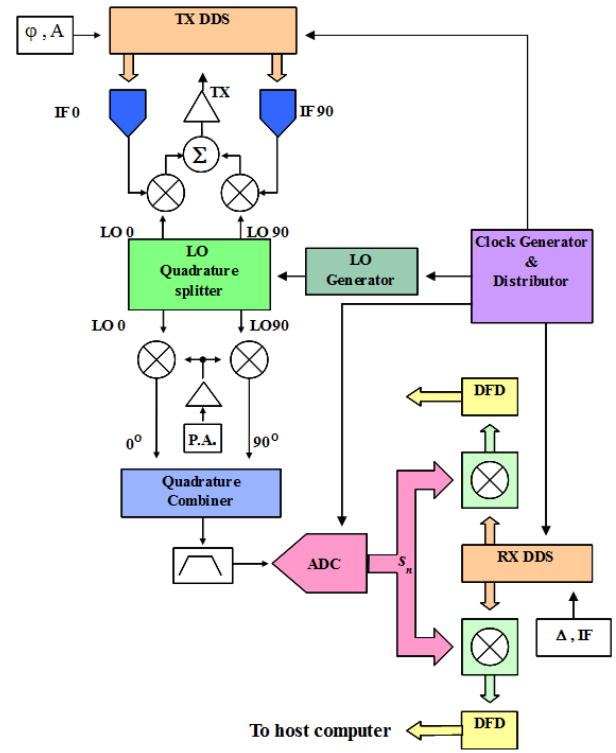


Figure 6: Block Diagram of a universal NMR transceiver.

- Quantization noise may, in principle, be reduced at will through oversampling, and the broadband nature of the fast ADC provides plenty of beneficial off band dithering noise; the digital system from the ADC on, may be made nearly ideal [10].

Requirements and basic architecture of a universal NMR transceiver

Figure 6 shows a block diagram of an universal transceiver. TX is the signal to the power amplifier, PA is the signal from the preamplifier at the beginning of the receiver chain. No filter has been made before TX: the requirement is that the single sideband modulator should be able to suppress carrier and forbidden sideband by at least 50 dB and that the spurious-free region around RF is at least IF wide. The LO generator should be a source with very low phase noise (e.g., -110 dB at 1 kHz), and the contribution of the clock to the ADC jitter should be negligible. The LO phase noise and clock jitter are the major sources of receiver noise.

In the receiver side, the combination of the LO splitter and quadrature combiner should suppress the unwanted sideband by more than 20 dB over the full LO range, and yield IF signals over more than a decade, from, say, 1 MHz to 30 MHz. The ADC should always work in the oversampling mode, with an input analog noise always larger than the least significant bit.

The DDS for digital baseband conversion has been represented separated from the one of the transmitter, while a superheterodyne spectrometer requires a unique IF source. One reason is that it is quite simple to synchronize

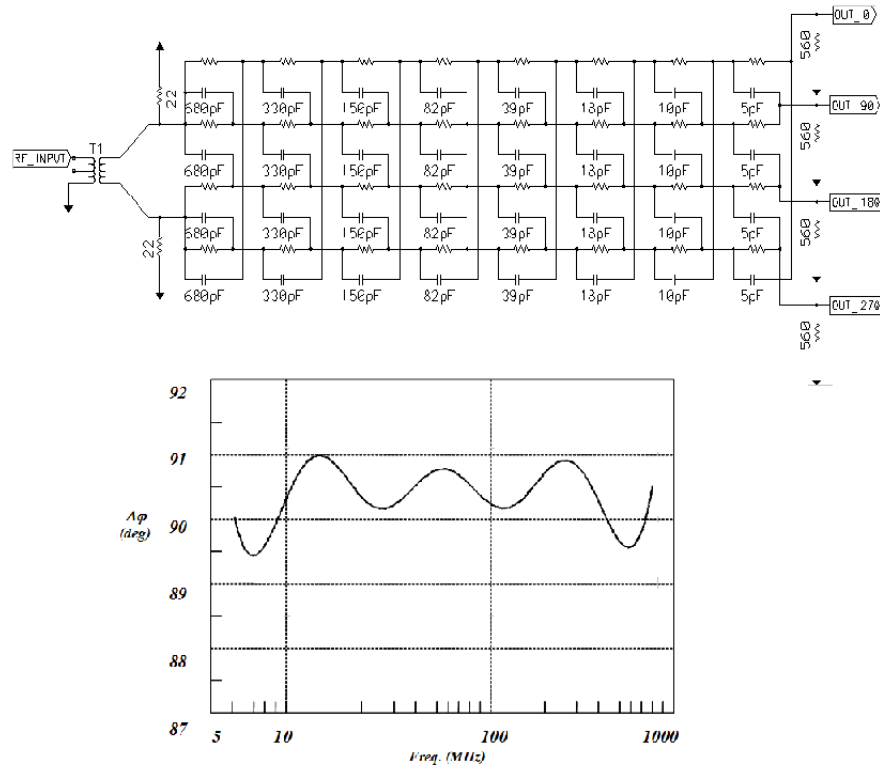


Figure 7: (a) Schematic of an 8-stages RC network, all $R = 50 \Omega$ and (b) Simulated response of the RC network (using Sigma Plot).

two digital oscillators, but quite difficult to bring many digital high speed signals from board to board.

Another reason is that the DDS often comes with the digital quadrature detector, and it may be desirable to irradiate at a different frequency relative to detection. Yet another reason is that a system with transmitter and receiver working simultaneously, rather than in time sharing, may be desirable, since it allows both continuous wave and pulse experiments to be performed.

The transceiver works with relatively low IF frequencies and has a “hole” near IF in the sense that the prescribed suppression of carriers and modulators may not be enough, for some applications, when LO-IF (i.e., the RF) is near IF.

Two possible schemes may be proposed:

- Fixed IF frequency of the receiver. By sampling at $\nu_0 = 4IF$ we have the possibility of integer down conversion (as hinted above), but we need a high resolution LO generator to fine tune the position of the center of the receiver. On the other hand, the transmitter DDS may be set independently, and the frequency of excitation may be changed within the Nyquist limit of this DDS. The “hole” near IF is unavoidable.
- Adjustable DDS frequencies in the receiver and the transmitter. In this case, a coarse LO generator with large steps (say, 1 MHz or 10 MHz) may

be used since the fine tuning of frequencies may be performed with the two DDS. The hole may be avoided (or shifted), and a broadband lock system may be implemented in this way.

Methodology

Besides the underlying control system, the only parts which are not commercially available in Figure 6 are the broadband LO quadrature splitter, working from IF + 1MHz to 1000 MHz, and the quadrature IF combiner, working from $IF_{min} - 1.5$ MHz to $IF_{max} + 1.5$ MHz. To obtain these broadband designs a specialized passive device has been studied, the so called RC network, which has been previously investigated by Halamek et al. [4]. The RC network consists of sections each consisting of a ring of four equal resistors and four equal capacitors. With n - sections having RC time constants organized according to a divide by two rule, roughly n octaves may be covered. Figure 7 (a) shows the schematics and Figure 7(b) the simulation of an eight sections RC network, which shows that the phase difference between the two outputs (0-180°) and (90-270°) is $90 \pm 1^\circ$ from 5 to 700 MHz.

Implementation of this design requires a careful consideration of line transmission and impedance matching effects. After many attempts with home-made impedance transformers, a commercial balun-transformer in the input (Minicircuits T 1-1) [11] has been adopted, which brings the 50 Ω impedance of the single ended LO input

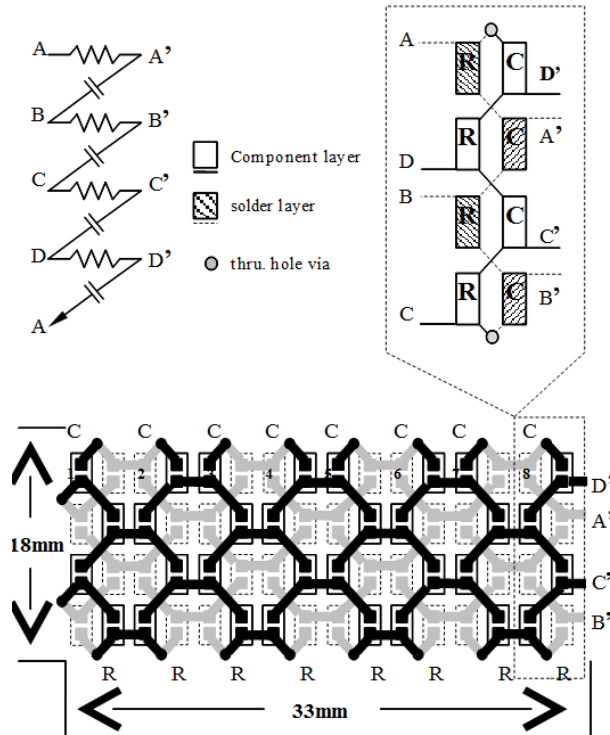


Figure 8: Physical Layout of the RC network

down to 12.5Ω for each of the bipolar inputs, in order to achieve a rough impedance matching at the highest frequencies of the band. The four outputs should ideally be connected with a high impedance source, which has been set equal to 500Ω in the simulation.

The physical layout is shown in Figure 8. A two layers PCB with connecting vias to tread the cycle of a section in a fully symmetrical way has been used. Furthermore, small surface-mounted R 's and C 's (0805 and 1206 size) has been used to achieve the smallest physical dimensions compatible with manual assembly. The requirements of the combiner are similar, but it should be used in the reverse way. Unfortunately, the simulation indicates that a typical 18 dB attenuation should be expected even with a 4 section $1/4$ octaves device. To limit such an attenuation, the RC combiner consists of only 4 sections with a nominal range 0.5-8 MHz (or 2-32 MHz).

Results and Discussion

Test performed on prototypes indicate that the RC splitter-combiner is a viable solution for building a truly broadband and universal NMR transceiver. However, it is mandatory to introduce trimming possibilities to improve the selectivity of the receiver in the bands where it is marginally acceptable. Furthermore, the RC network needs a long assembly time; it is also very difficult to identify a bad connection or a wrongly placed component.

A solution of the above mentioned issues is illustrated in Figure 9 (a). Each couple of outputs, $0 - 180^\circ$ and

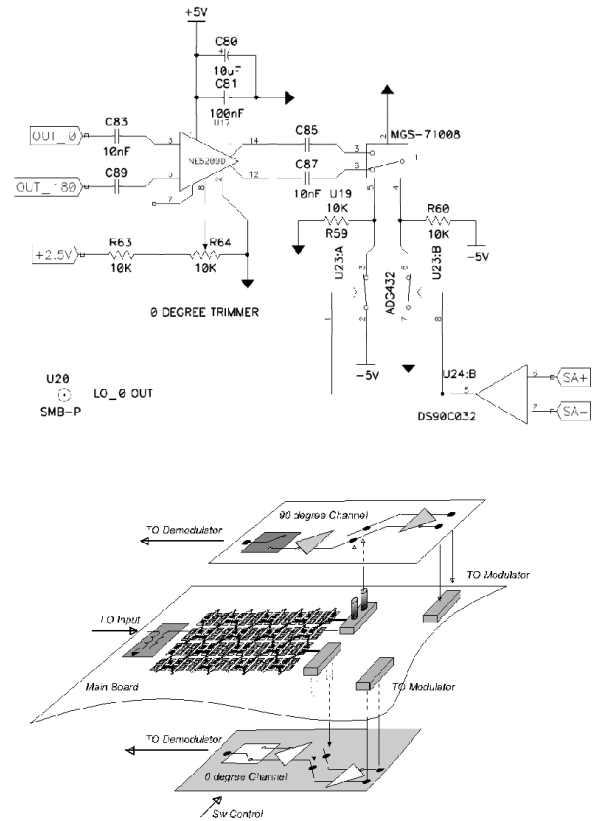


Figure 9: (a) Schematic of a variable amplifier based on NE529 (b) Physical and assembly layout.

$90 - 270^\circ$, of the RC network has been sent simultaneously to two variable differential amplifiers, the NE 5209, which has input impedances in the $k \Omega$ range.

A very special layout had to be chosen, with three PCB's piled one on top of the other to maintain the distances short and the traces symmetric to avoid transmission delay problems (c.f. Figure 9 (b)).

Figures 10 (a) and (b) give the amplitude and the phase errors of the splitter & modulator measured through the IF trimming parameters. This time the amplitude errors remain below 3% and the overall phase error is larger than 3° only above 500 MHz, as it may have been expected.

The lines which go to the receiver may be trimmed in amplitude and two absorptive switches allow to select various combinations of positive and negative LO signals. The main purpose of these switches is to allow selection of the upper or lower sideband by selecting which of the two channels (A or B) follows by 90° the other. Another purpose was to provide an alternative testing of the accuracy of the splitter by measuring the signal resulting by adding free induction signals acquired with the receiver LO phase-cycled with a 180° step.

The results of testing are shown in Figure 10(a), (b) and (c). Figure 11 shows the DC offset values needed to achieve the same amplitude of LO signals at the input

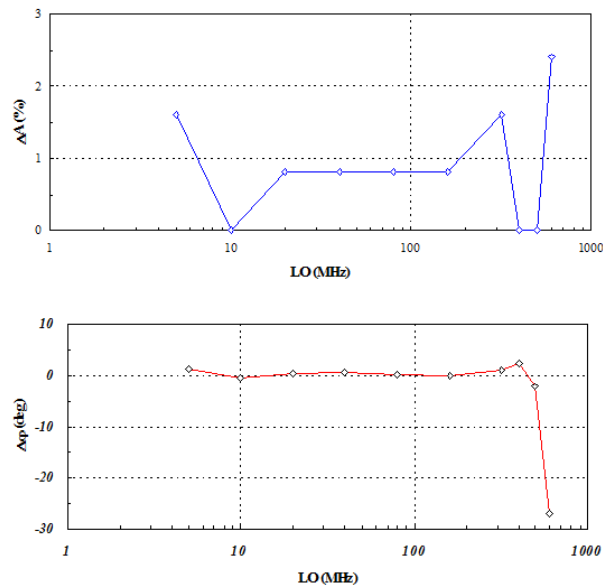


Figure 10: Amplitude (a) and Phase (b) as a function of frequency in RC network.

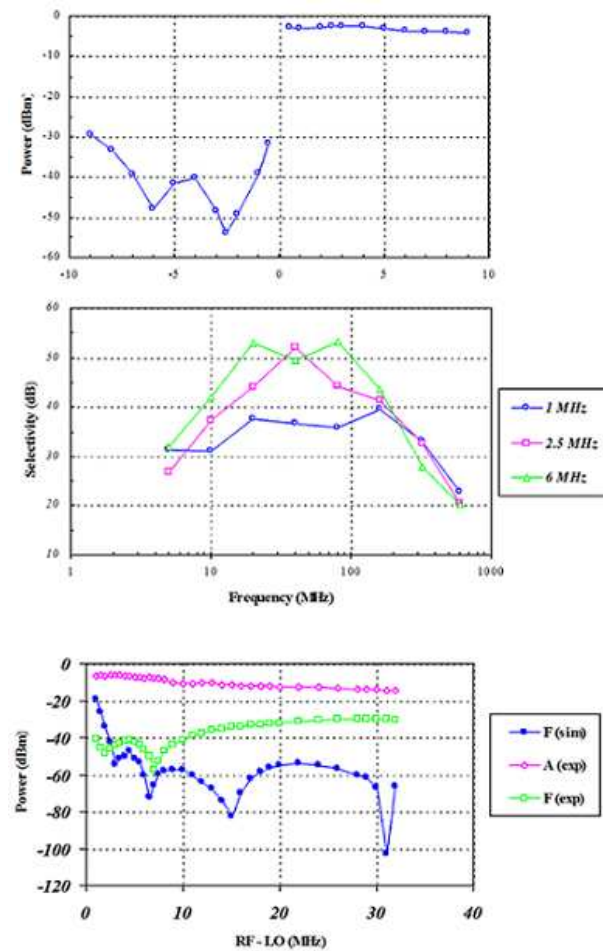


Figure 11: (a) Forbidden Band suppression and (b) selectivity of the receiver (c) Simulated versus experimental response.

of Single Side band Modulator; Figure 10 (b) shows selectivity using the same receiver circuit as below. Over most of the range, selectivity is above 30 dB and the response curve is essentially flat over the 0.5-9 MHz interval. As expected from the results obtained from the modulator section, amplitude trimming was minimal. The sideband switching behaved as expected.

Conclusions

This work demonstrates that a *Universal NMR transceiver* is possible thanks to a broadband RC splitter/combiner circuit. With some care, we have shown that this circuit may operate near 1 GHz, which we believe to be roughly the limit of a manually assembled, lumped elements version. Simple trimming procedures have been described which essentially cancel out the effects of imperfect quadrature processing, and lead to an accurate evaluation of these errors. Furthermore, the setting of these digitally controlled trimmers does not interfere with I&Q modulation, which may be programmed in the same way for all working frequencies.

We have shown that a quadrature modulator may achieve exceptional spectral purities over decades of working frequencies if appropriate trimming schemes are implemented. A consequence is that the quality of signal processing becomes essentially a function of the LO signal and the digital clock. In the case of NMR, LO signals with good coherence and exceptional phase noise specifications are needed. In fact, in the transmitter side, we may need to achieve a spurious free range larger than 100 dB over the entire spectrum of interest, which has typical width much smaller than our IF's (and does not include LO or forbidden sideband); in the receiver side, the LO phase noise contributes to the noise figure, and extremely "pure signals are needed.

References

- [1] Kung, S.Y., and Kailath, T. 1985. *VLSI and Modern Signal Processing*. Prentice Hall.
- [2] Stringfellow, T. 2001. Sensitivity in NMR. *NMR Facility Document*.
- [3] Halamek J., Kasal M. 1994. Signal Processing in Transceivers for NMR/MRI. *Review of Scientific Instruments*. 65. 1897–1902.
- [4] Halamek J., Kasal M. 1996. High-Resolution Digital Quadrature Detection. *Review of Scientific Instruments*. 67. 2123–2129.
- [5] *New Releases Data Book*. 1999. Maxim.
- [6] *Communications Components Designer's Guide*. 1998.
- [7] *The ARRL Handbook, American Radio Relay League, Sixty-Nine Edition*. 1992.
- [8] *Design-in Reference Manual, Analog Devices*. 2000.
- [9] Halamek J., Kasal M. 1997. Bandpass Signal Processing. *Radioengineering*. 6. 1–8.

- [10] Halamek J., Jurak P. 1997. Analog to Digital Converters and Dynamic Range. *Journal of Electrical Engineering*. 48. 183–189.
- [11] *RF/IF Designer's Handbook, Mini Circuits*. 1999.

Estudio computacional B3LYP de la interacción del hidrógeno molecular [H₂] con *rccc* R-Pyg[4]arenos [R = metil, flúor] funcionalizados con Li⁺

Andrés S. Urbina¹, Andrea A. Saltos¹, F. Javier Torres^{1,2*}

¹Colegio de Ciencias e Ingeniería - El Politécnico, Universidad San Francisco de Quito
Diego de Robles y Vía Interoceánica, Quito, Ecuador.

²Grupo Ecuatoriano para el Estudio Experimental y Teórico de Nanaosistemas –GETNano–
Diego de Robles y Vía Interoceánica, Universidad San Francisco de Quito.

*Autor principal/Corresponding author, e-mail: jtorres@usfq.edu.ec

Editado por/Edited by: Robert Cazar, M.Sc.

Recibido/Received: 11/15/2011. Aceptado/Accepted: 11/27/2011.

Publicado en línea/Published on Web: 12/20/2011. Impreso/Printed: 12/20/2011.

Abstract

The interaction of molecular hydrogen [H₂] with methyl- and fluoride-substituted *rccc* pyrogallol[4]arenes functionalized with Li⁺ cations [Li-R-Pyg[4]Ar] was theoretically studied by means of DFT quantum-mechanical calculations at the B3LYP/6-311G(d,p) level of theory. In a first stage of the study, the stability of the Li⁺ cation within the cavity of the R-Pyg[4]arenes was analyzed by inspecting the local environment of the adsorbed ion and the total density as well as the electrostatic potential maps of the complexes. In a subsequent stage of the work, the optimal position of a H₂ molecule in the cavity of the pure and lithium-functionalized R-Pyg[4]arenes was determined. Upon obtaining the equilibrium geometry, the BSSE-corrected binding energy of the various H₂/R-Pyg[4]Ar complexes was calculated. The results showed that the sorption capacity of R-Pyg[4]arenes is significantly improved by the presence of the Li⁺ cation within their cavity.

Keywords. Hydrogen storage, pyrogallol, DFT, sorption capacity.

Resumen

La interacción del hidrógeno molecular [H₂] con *rccc* metil- y fluor-pirogalol[a]arenos funcionalizados con cationes Li⁺ [Li-R-Pyg[4]Ar] fue estudiado teóricamente por medio de cálculos cuanto-mecánicos DFT al nivel de teoría B3LYP/6-311G(d,p). En una primera etapa de estudio, la estabilidad del catión Li⁺ dentro de la cavidad de los R-Pyg[4]arenos fue analizada inspeccionando el ambiente local del ion adsorbido y los mapas de densidad total de carga así como de potencial electrostático de los complejos. En una siguiente etapa de trabajo, se determinó la posición óptima del H₂ en la cavidad de los R-Pyg[4]arenos puros, y con litio. Una vez obtenida la geometría de equilibrio, la energía de amarre libre de ESFB fue calculada para varios complejos H₂/R-Pyg[4]Ar. Los resultados muestran que la capacidad de adsorción de los R-Pyg[4]arenos mejora de manera significativa por la presencia del catión Li⁺ dentro de su cavidad.

Palabras Clave. Almacenamiento de hidrógeno, pirogalol, DFT, capacidad de adsorción.

Introducción

Actualmente la mayor parte de la energía primaria utilizada a nivel mundial proviene de los combustibles fósiles, los cuales son recursos no renovables que se extraen de yacimientos que cuentan con reservas limitadas. Proyecciones recientes estiman que las reservas mundiales de petróleo y gas natural (*i.e.* principales combustibles fósiles) durarían 38 y 57 años, respectivamente, si se mantiene el ritmo de consumo energético actual [1]. A este hecho se tiene que agregar también el progresi-

vo aumento en el consumo de energía que se origina a causa del crecimiento poblacional y a la gran demanda energética que han venido mostrando los países en vías de desarrollo [2]. Hoy en día, la demanda de energía es de aproximadamente 5.13 x 10¹⁷ BTU, la cual se cree que aumentará en un 49 % para el año 2035 [3]. En este contexto, el desarrollo de fuentes de energías alternativas ha adquirido gran importancia, ya que en un futuro cercano deberán reemplazar a los combustibles fósiles en las diferentes actividades de la humanidad. Una de las opciones más prometedoras es la de trasladar la

economía mundial hacia el uso de hidrógeno molecular como vector energético [2]. La denominada “Economía del Hidrógeno” involucra tres pasos fundamentales: producción, almacenamiento y uso [3].

Observando que actualmente existen medios eficientes para la producción y uso de H_2 como vector energético. La transición a la economía del hidrógeno se encuentra frenada por las dificultades que se tiene actualmente con respecto al proceso de almacenamiento, el cual se ha convertido en un desafío tecnológico ya que el H_2 , en condiciones estándar de presión y temperatura, es un gas muy poco compresible [4].

En los últimos años, se han propuesto varias alternativas para el almacenamiento del hidrógeno molecular, siendo una de éstas la fisisorción o adsorción en sólidos microporosos [5]. A este respecto, numerosos materiales han sido investigados de forma experimental y teórica como por ejemplo: carbon activado [6], nano-estructuras de carbono [6], *metal-organic frameworks* (MOFs) [7], polímeros inorgánicos, zeolitas [8, 9, 10, 11], entre otros; pero hasta ahora no se ha encontrado ningún material que cumpla con las metas técnicas sugeridas por el departamento de energía de USA (*i.e.* tiempos rápidos de carga y descarga, temperatura y presión cercanas a las condiciones estándar) para usar eficientemente el H_2 en aplicaciones móviles o estacionarias [6]. En un reporte reciente [12], se ha determinado que para lograr un óptimo almacenamiento de H_2 , la energía de interacción que debe existir entre un material adsorbente y el H_2 a temperatura y presión estándar es de 15.1 kJ/mol [12], valor que aún no ha sido alcanzado para ningún material.

El presente trabajo tiene por objeto analizar mediante cálculos cuanto-mecánicos en modelos moleculares la interacción del H_2 con los *recc* pirogalol[4]arenos (R-Pyg[4]Ar) funcionalizados con cationes litio; para de esta manera evaluar su potencial como medio para almacenar H_2 .

Metodología

Modelos

Pese a que se conoce que los R-Pyg[4]Ar pueden adoptar varias conformaciones [13, 14, 15, 16] (*i.e.* *rctt*: estructura de silla o *recc*: estructura de copa), en el presente estudio teórico, se ha considerado solamente la conformación de copa *recc* debido a que su estructura ofrece el ambiente adecuado para la adsorción de moléculas de pequeñas y medianas dimensiones [16] (Figura 1). Adicional a esto, un reporte reciente ha sugerido que las propiedades electrónicas de estos compuestos se pueden controlar variando los grupos sustituyentes R en la base de su estructura [17, 18]. En términos generales, se ha observado que grupos R con carácter electro-donador generan pozos electrónicos en el interior de la copa de los *recc* R-Pyg[4]Ar, mientras que los grupos

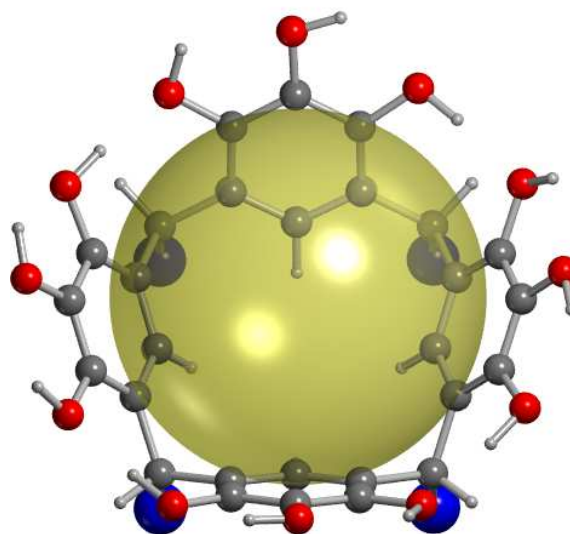


Figura 1: R-Pyg[4]Ar con conformación de copa *recc*. La esfera transparente de color amarillo representa el espacio libre dentro de la cavidad del macrociclo. Los átomos de carbono, oxígeno e hidrógeno de la estructura son representados con las esferas de color gris, rojo y blanco, respectivamente. Por claridad, los grupos sustituyentes R unidos al plano de la base de la copa son representados por las esferas de color azul.

R con carácter electro-aceptor vacían el interior de la cavidad [18]. Esta importante propiedad se puede aprovechar para funcionalizar los R-Pyg[4]Ar con cationes, los cuales poseen la cualidad de mejorar la capacidad de adsorción de H_2 como ha sido reportado en varios estudios realizados sobre zeolitas intercambiadas con metales alcalinos (*i.e.* Li^+ , Na^+ y K^+) [8, 9, 11]. En dichos estudios se ha concluido que el ion litio posee una mayor afinidad por el hidrógeno molecular en comparación a otros cationes monovalentes, especialmente en el caso $Li_2CHA-5/1$ [10] en donde el catión Li^+ se encuentra expuesto.

Tomando en cuenta lo mencionado, la presente investigación teórica se enfoca en el análisis de las propiedades de adsorción del metil- y del F-Pyg[4]Ar tanto funcionalizados con Li^+ (**1** y **2**) como puros (**3** y **4**). Considerando estos cuatro sistemas, se pretende evaluar el efecto de los grupos electro-donadores y electro-aceptores sobre la estabilidad del ion en el interior de los macrociclos, y consecuentemente, sobre su capacidad de adsorción de hidrógeno molecular.

Para la construcción de los modelos moleculares del metil- y del F-Pyg[4]Ar, se empleó como punto de partida los datos de difracción de rayos X reportados para el decil-Pyg[4]Ar el cual cristaliza en conformación de copa *recc* como ha sido reportado por Dueno et. al. [19]. En la macromolécula obtenida a partir de la celda unitaria del cristal, se reemplazaron los sustituyentes decil por los grupos metil y flúor para obtener el Me-Pyg[4]Ar y el F-Pyg[4]Ar, respectivamente. En una primera fase del estudio, se realizó la optimización geométrica de los modelos considerando que ambas macromoléculas pertenecen al grupo punto de simetría C_4 . Una

Compuesto	$d_{\text{Li}-\text{C}'_s}$	α	EA ^c
Li-Me-Pyg[4]Ar	2.664, 2.663, 2.553, 2.664	46.77	314.2
Li-F-Pyg[4]Ar	2.612, 2.612, 2.612, 2.612	44.80	288.1

Tabla 1: Distancias entre el Li^+ y los átomos de carbono ($d_{\text{Li}-\text{C}'_s}$) enlazados a los grupos sustituyentes de los *recc* R-Pyg[4]Ar y ángulos diedro (α) del catión con respecto al plano de la base en cada compuesto. La energía de interacción corregida con respecto al ESFB (EI^c) entre el catión y cada R-Pyg[4]Ar es también reportada. Las distancias están reportadas en Å, los ángulos en grados y las energías en kJ/mol.

vez determinada la estructura de equilibrio de cada compuesto, se añadió el catión Li^+ dentro de la cavidad en el centro del plano correspondiente a la base de la estructura de copa (Figura 1); y posteriormente, se determinó la posición óptima del catión mediante un nuevo proceso de optimización geométrica. Las propiedades electrónicas y la estabilidad del catión en el interior del Me-Pyg[4]Ar y del F-Pyg[4]Ar fueron investigadas en las geometrías resultantes.

En una siguiente fase de la investigación, se procedió al análisis de la interacción de H_2 con los compuestos **1-4**. La molécula de hidrógeno fue colocada perpendicular al eje de simetría de las macromoléculas cerca de la base de la estructura de copa. Posteriormente, la posición del H_2 fue relajada hasta su geometría óptima dentro de la cavidad de los compuestos **1-4**, y en la geometría resultante se llevó a cabo el cálculo de la energía de amarre empleando la siguiente expresión[20]:

$$EA_{[\text{H}_2-\text{Pyg}]} = E_{[\text{H}_2]} + E_{[\text{Pyg}]} - E_{[\text{H}_2-\text{Pyg}]} \quad (1)$$

donde el primer término de la parte derecha de la ecuación se refiere a la energía del hidrógeno molecular, el segundo a la energía de cada compuesto **1-4**, y el tercero a la energía del complejo $\text{H}_2/\text{Li-R-Pyg[4]Ar}$ o $\text{H}_2/\text{R-Pyg[4]Ar}$. Las energías de amarre calculadas a través de la Ecn. 1 fueron posteriormente corregidas restándose el error causado por la superposición de funciones base (ESFB) [21], mediante el método Boys-Bernardi [22]. Los valores de energía corregidos se denotarán como EA^c.

Métodos

Los cálculos de optimización geométrica y de punto simple de energía fueron realizados con el programa Gaussian09 [23] empleando el funcional B3LYP (*i.e.*, Becke 3-parameter hybrid exchange functionals and Lee-Yang-Parr correlation functionals) junto a las funciones base 6-311G(d,p) [24] como nivel de teoría. Los modelos moleculares fueron construidos usando el programa MOLDRAW [25] y posteriormente fueron refinados con el software GaussView5. Los mapas de densidad electrónica y potencial electrostático de los Li-R-Pyg[4]Ar fueron generados a partir de sus funciones de onda por medio de la aplicación cubegen[23] asociada a Gaussian09. Posteriormente, los mapas de densidad y potencial de fueron visualizados con GaussView5.

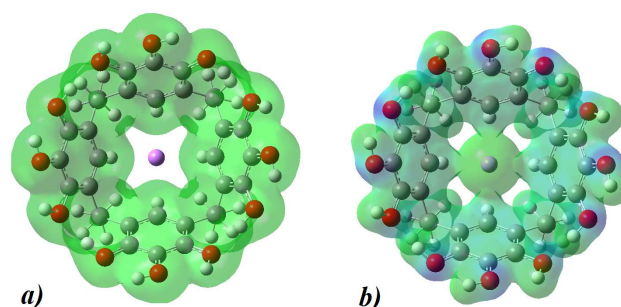


Figura 2: Mapas de densidad electrónica (a) y potencial electrostático (b) del Li-Me-Pyg[4]Ar, obtenidos usando isovalores de 0.008 a.u. y 0.2 a.u., respectivamente.

Resultados y Discusión

Estructura de los Li-R-Pyg[4]Ar

En la Tabla 1 se resumen los datos geométricos correspondientes al ambiente geométrico en el cual se encuentra el catión Li^+ en los compuestos **1** y **2**. Como se puede observar, para el complejo **1** la distancia promedio entre los átomos de carbono enlazados a los grupos sustituyentes R y el Li^+ es de $\sim 2.66\text{Å}$, mientras que para **2** la distancia promedio es $\sim 2.61\text{Å}$. La diferencia de 0.05Å entre las distancias medidas para cada caso se debe a los distintos ambientes electrostáticos en los que se encuentra el catión en cada macromolécula. En el Me-Pyg[4]Ar, se observa que el Li^+ se encuentra alejado de la base de la estructura de copa ($\alpha = 47^\circ$) debido a que la cavidad del compuesto contiene un pozo de electrones (*i.e.*, efecto de los grupos metilo [18]) el cual estabiliza al catión sin que éste pase a formar parte de la macromolécula. Por el contrario en el caso del F-Pyg[4]Ar, el catión Li^+ se acomoda de mejor manera en la base del compuesto ($\alpha = 45^\circ$) debido a que gran parte de la carga del macrociclo (*i.e.*, densidad electrónica) se localiza en los átomos de flúor, los cuales son muy electronegativos. Esta observación es importante considerando que la capacidad para interactuar con hidrógeno molecular que posee un catión monovalente presente en un determinado material depende en gran medida de que tan expuesto se encuentra dentro de su estructura, como se ha concluido para la zeolita CHA intercambiada con metales alcalinos en varios estudios teóricos [10, 11]. Siguiendo esta idea, se esperaría entonces que el catión Li^+ al encontrarse más expuesto dentro del Me-Pyg[4]Ar, interactúe muy fuertemente con el H_2 en comparación al Li^+ presente en el interior del F-Pyg[4]Ar.

Antes de proseguir al estudio de la interacción del H_2 con los compuestos **1-4**, se debe analizar la estabilidad del Li^+ presente dentro del metil- y del F-Pyg[4]Ar mediante el cálculo de la energía de amarre entre el catión y cada macromolécula. Los valores correspondientes a la energía de amarre (EA^c) están reportados en la Tabla 1. Como se puede apreciar para ambos compuestos (**1** y **2**), la interacción entre el Li^+ y los R-Pyg[4]Ar es favorable con valores calculados de ~ 314 kJ/mol y ~ 288

Complejo	D_{H_2-Ref}	EA^c
1	2.07	8.72
2	2.07	8.06
3	2.71	-1.58
4	3.09	-1.09

Tabla 2: Distancias medidas desde los puntos de referencia hasta la molécula H_2 para los complejos estudiados. Las distancias están reportadas en Å y las energías en kJ/mol.

kJ/mol, respectivamente. En el caso particular del compuesto **1** se puede observar que existe una interacción mayor en comparación al compuesto **2**, lo que señala una mayor estabilidad del Li^+ en el interior del Me-Pyg[4]Ar, hecho que se observa también al analizar los mapas de densidad y potencial electrostático de este compuesto. En la Figuras 2a y 2b, los mapas de densidad electrónica y potencial electrostático, respectivamente, muestran como la carga negativa en la base de la copa Me-Pyg[4]Ar estabiliza al catión Li^+ a la vez que lo deja expuesto (Figura 2a) permitiendo que el mismo no pierda su capacidad polarizante (Figura 2b).

Interacción del H_2 con R-Pyg[4]Ar y Li-R-Pyg[4]Ar

En la Tabla 2 se resumen los datos referentes a la posición resultante del H_2 en los compuestos **1-4** después del proceso de optimización geométrica en cada caso. La posición del H_2 fue determinada midiendo la distancia desde un punto de referencia en la cavidad de cada uno de las estructuras hasta el centro de masa de la molécula (D_{H_2-Ref}). Para los compuestos funcionalizados con Li^+ , el punto de referencia establecido fue la posición del catión; mientras que para los compuestos puros, se tomó como referencia la posición virtual en donde se encontraría el Li^+ .

Como se puede observar, para el compuesto **1** la distancia D_{H_2-Ref} es $\sim 2.07\text{Å}$, mientras que para **3** ésta distancia es $\sim 2.71\text{Å}$. De la misma manera para **2** dicha distancia es de $\sim 2.07\text{Å}$, mientras que para **4** es $\sim 3.09\text{Å}$. Es evidente entonces, una disminución en las distancias para en los complejos **1** y **2**, lo que indica una mejor absorción de los R-Pyg[4]Ar cuando el átomo de litio está presente.

La anterior deducción es además sustentada por los valores de las energías de amarre corregidas por el ESFB (EA^c) obtenidas para los complejos **1-4**. Como está reportado en la Tabla 2, la energía de amarre para el compuesto **1** es 8.72 kJ/mol y para el compuesto **2** es 8.06 kJ/mol; en cambio, para los complejos **3** y **4** las energías obtenidas fueron -1.58 y -1.09 kJ/mol, respectivamente. Estos resultados muestran que en los R-Pyg[4]Ar puros la molécula de hidrógeno siente una fuerza repulsiva que empuja la molécula fuera de la cavidad; mientras que en el caso de los macrociclos funcionalizados con el catión Li^+ los valores positivos sugieren un estado estable de enlace lo que a su vez se traduce en una mejora en la capacidad de adsorción de los compuestos. Es importante mencionar también que estos resultados están en perfecta concordancia con investigaciones

teóricas anteriores [8, 9, 10, 11] en donde se demuestra que el H_2 interactúa de manera significativa con cationes *casi libres* presentes en la estructura de materiales microporosos ya que estos poseen una mayor capacidad polarizante (Figura 2b).

Conclusiones

En el presente artículo se estudió la interacción del H_2 dentro de los Li-R-pyg[4]arenos con sustituyentes metil y flúor, mediante cálculos cuanto-mecánicos a un nivel de teoría B3LYP/6-311G(d,p). Los resultados muestran que la energía de amarre entre el H_2 y los R-Pyg[4]Ar incrementa cuando las macromoléculas se encuentran funcionalizadas con el catión Li^+ . Se ha observado además que la capacidad de polarización del catión disminuye en presencia de sustituyentes con mayor electro-negatividad, por lo que el catión Li^+ interactúa fuertemente con H_2 cuando se encuentra en el interior de un R-Pyg[4]Ar con sustituyentes electrodonadores como el grupo metil. Analizando las energías de amarre de 8.72 y 8.06 kJ/mol obtenidas para los complejos $H_2/Li-Me-Pyg[4]Ar$ y $H_2/Li-F-Pyg[4]Ar$, respectivamente, se puede concluir que estos macrocompuestos funcionalizados con cationes tienen un gran potencial para ser usados como medio para adsorber hidrógeno molecular en comparación a otros materiales previamente estudiados como las zeolitas [9, 10] debido a que los valores calculados de EA^c se acercan al límite de 15.1 kJ/mol establecido como óptimo para aplicaciones móviles y estacionarias.

Agradecimientos

Los autores agradecen a la Universidad San Francisco de Quito por financiar el presente estudio a través del programa *Chancellor Grants 2011*. FJT agradece de forma especial a la Corporación Ecuatoriana para el Desarrollo del Internet Avanzado (CEDIA) por el cofinanciamiento de este trabajo y por haber apoyado a la creación del Grupo Ecuatoriano para el Estudio Experimental y Teórico de Nanosistemas (GETNano) gracias a los recursos financieros y logísticos brindados en el marco de las convocatorias CEPRA2 y CEPRA4.

Referencias

- [1] Conti, J., Doman, L., Smith, K., and Mayne, L. 2010. "International Energy Outlook 2010." *U.S.E.I. Administration*.
- [2] Turner, J. 2001. "A Relizable Renewable Energy Future." *Science*. 414, 332-337.
- [3] Barreto, L., Makihira, A., and Riahi, K. 2003. "The Hydrogen Economy in the 21st Century: A Sustainable Development Scenario." *Int. J. Hydrogen Energ.* 28, 267-284.
- [4] Crabtree, G., Dresselhaus, M., and Buchanan, M. 2004. "The Hydrogen Economy." *Phys. Today*. 57, 39-44.

- [5] Zuttel, A. 2004. "Hydrogen Storage Methods." *Naturwissenschaften*. 91, 157–172.
- [6] Annemikie, W., and Van derBerg, A. 2008. "Materials for Hydrogen Storage: Current Research Trends and Perspectives." *Chem. Commun.* 668–681.
- [7] Zhou, L. 2005. "Problems and Progress in Hydrogen Storage Methods." *Renew. Sust. Energ. Rev.* 9, 395–408.
- [8] Torres, F. J., Civalleri, B., Terentyev, A., Ugliengo, P., and Pisani, C. 2005. "Theoretical Study of Molecular Hydrogen Adsorption in Mg-Exchanged Chabazite." *J. Chem. Phys. C* 111, 2505–2513.
- [9] Torres, F. J., Terentyev, A., and Ugliengo, P. 2006. "Ab Initio Investigation of the Interaction of H₂ with Lithium Exchanged Low-Silica Chabazites." *Journal of Physics: Conf. Series*. 117, 012012(8).
- [10] Torres, F. J., Civalleri, B., Ricchiardi, G., and Zecchina, A. 2007. "Interaction of H₂ with Alkali- Metal-Exchanged Zeolites: A Quantum Mechanical Study." *J. Phys. Chem. B*. 111, 2505–2513.
- [11] Torres, F., Vitillo, J. G., Civalleri, B., Ricchiardi, G., and Zecchina, A. 2007. "Interaction of H₂ with Alkali- Metal-Exchanged Zeolites: A Quantum Mechanical Study." *J. Chem. Phys. C*. 111, 2505–2513.
- [12] Bhatia, S. 2006. "Optimum Conditions for Adsorptive Storage." *Langmuir*. 22, 1688–1700.
- [13] Liam, C., Palmer, R., and Jr, J. 2005. "Hydrocarbon Binding Inside a Hexameric Pyrogallol[4]arene Capsule." *Org. Lett.* 7, 787–789.
- [14] Shivanyuk, A., Friese, J., Döring, S., and Jr, J. 2003. "Solvent-stabilized Molecular Capsules." *J. Org. Chem.* 68, 6489–6496.
- [15] Shivanyuk, A., Far, A., and Jr, J. 2002. "Rigid Tetranitroresorcinarenes." *Org. Lett.* 9, 1555–1558.
- [16] Gutsche, D., Zouhair, A., Böhmer, V., Harrowfield, J., Vicens, J., and Eds, M. 2001. "Synthesis of Calixarenes and Thiocalixarenes." *Springer Netherlands*. 25, 155–181.
- [17] Zambrano, C. H., Manzano, C. A., Saltos, A., Dueno, E., and Zeller, M. 2010. "Síntesis de 2,8,14,20-Tetra-n-Butilpirogallol[4]areno y Estudio Computacional Conformacional." *Avances en Ciencias e Ingenierías*. 2, A22–A29.
- [18] Manzano, S., Dueno, E. E., Zambrano, C. H., and Torres, F. J. "Theoretical Evidence of Electronic Tuning within the Cavity of *rccc* Pyrogallol[4]arenes." *Chem. Phys. Lett.* Submitted for publication.
- [19] Dueno, E., Zambrano, C., W., S., and J.P., K. 2005. 2,8,14,20-Tetradecylpyrogallol[4]arene. *Unpublished Results*.
- [20] Wormer, P. Theory and applications of computational chemistry the first forty years In K.Kim In C.E. Dykstra, G. Frenking and (ed.) G.E> Scuseria, (ed.), Forty Years of AB Initio Calculations on Intermolecular Forces., pp. 1047–1091.
- [21] Kestner, N. 1968. "he-he Interaction in the SCFMO Approximation." *J. Chem. Phys.* 48, 252–257.
- [22] Boys, F. and Bernardi, F. 1970. "The Calculation of Small Molecular Interactions by the Differences of Separate Total Energies, Some Procedures with Reduces Errors." *Mol. Phys.* 110, 553–566.
- [23] Frisch, M., G. W., Schlegel, H. B., Scuseria, G. E., Robb, M. A., Cheeseman, J. R., Scalmani, G., Barone, V. Mennucci, B. P. G. A., Nakatsuji, H., Caricato, M., Li, X., Hratchian, H. P., Izmaylov, A. F., Bloino, J., Zheng, G., Sonnenberg, J. L., Hada, M., Ehara, M. Toyota, K., Fukuda, R., Hasegawa, J., Ishida, M., Nakajima, T., Honda, Y., Kitao, O., Nakai, H., Vreven, T., Montgomery, J. J. A., Peralta, J. E., Ogliaro, F., Bearpark, M., Heyd, J. J., Brothers, E., Kudin, K. N. Staroverov, V. N., Kobayashi, R., Normand, J., Raghavachari, K., Rendell, A., Burant, J. C., Iyengar, S. S., Tomasi, J., Cossi, M. Rega, N., Millam, N. J., Klene, M., Knox, J. E., Cross, J. B., Bakken, V., Adamo, C., Jaramillo, J., Gomperts, R. Stratmann, R. E., Yazyev, O., Austin, A. J., Cammi, R. Pomelli, C., Ochterski, J. W., Martin, R. L., Morokuma, K., Zakrzewski, V. G. Voth, G. A., Salvador, P., Dannenberg, J. J., Dapprich, S., Daniels, A. D., Farkas, Foresman, J. B. Ortiz, J. V., Cioslowski, J., and Fox, D. J. 2011. Gaussian 09, revision A1. *Gaussian, Inc. Wallingford CT*.
- [24] Becke, A. 1993. Density-Functional Thermochemistry.III.The Role of Exact Exchange. *J. Chem. Phys.* 98, 5648–5652.
- [25] Ugliengo, P., Borzani, G., and Viterbo, Z. 2011. *Moldraw: Molecular Graphics on a Personal Computer*.

ADN G-cuádruple: caracterización inicial de los mecanismos de formación de oligómeros por mecánica molecular

Miguel Angel Méndez^{1,2*} Andrea C. Montero^{1,2}

¹ Universidad San Francisco de Quito, Colegio de Ciencias de la Salud,
Diego de Robles y Vía Interoceánica, Quito, Ecuador.

² Grupo Ecuatoriano para el Estudio Experimental y Teórico de Nanosistemas –GETNano–
Diego de Robles y Vía Interoceánica, Universidad San Francisco de Quito.
E-mail: mmendez@usfq.edu.ec

Editado por/Edited by: F. Javier Torres, Ph.D.

Recibido/Received: 11/15/2011. Aceptado/Accepted: 11/29/2011.

Publicado en línea/Published on Web: 12/20/2011. Impreso/Printed: 12/20/2011.

Abstract

The fabrication of nanostructures based on DNA as a material to build systems capable of complex functions is a frontier in continuous exploration. In this article it is reported the detailed characterization at atomic level of G-quadruplex units in order to obtain a better comprehension on how these units can self assemble into interlocked G-quadruplexes. The method used is modeling with molecular mechanics. Previously we reported the construction of interlocked G-quadruplexes by a thermal cyclic procedure (similar in implementation as the ones used in the cycling steps in a PCR protocol) parting from the sequence 5'-TGGG-3'. Based on our experimental data reported previously, models were built for the structures, and minimization and analyses via molecular mechanics was carried out in order to understand the factors that determine the more stable structures. It was found that the identity of the 5' and 3' ends of the oligonucleotides is of the uppermost importance in the stability of the DNA assemblies in this study. Furthermore, the presence of cations in the regions of the molecule where the degree of steric hindrance allows more room for the cations could play a significant role in the dynamics of conformation of the supramolecule at those sites and possibly limiting or capping the self assembly of the structure. In summary, the results allow a better comprehension of the system at a molecular scale with the finality of developing more efficient procedures for the controlled fabrication of nanostructures based on G-quadruplex DNA.

Keywords. Self-assembly, interlocked G-quadruplex, molecular mechanics, DNA, G-quadruplex oligomers.

Resumen

La fabricación de nanoestructuras usando ADN como material para construir sistemas capaces de realizar funciones complejas es una frontera en continua exploración. En este artículo se reporta la caracterización detallada a nivel atómico de unidades de G-cuádruple para obtener una mejor comprensión de cómo estas unidades se pueden auto ensamblar en oligómeros tipo G-cuádruple entrelazado (interlocked G-quadruplexes). Para esto se utilizaron métodos de modelación con mecánica molecular. Previamente reportamos la construcción de G-cuádruple entrelazados por un procedimiento térmico cíclico (similar en implementación al usado para el ciclado de un protocolo de PCR) partiendo de la secuencia 5'-TGGG-3'. Basados en nuestros datos experimentales reportados anteriormente se construyeron modelos para las estructuras y se minimizaron y analizaron vía mecánica molecular para entender los factores que determinan la estructura más estable. Se encontró que la identidad de los extremos 5' y 3' de los oligonucleótidos es de importancia fundamental en la estabilidad de los ensambles de ADN en el estudio. Además, los cationes en las regiones donde el grado de impedimento estérico permite más espacio para los mismos, pueden jugar un rol significativo en la dinámica de la conformación de la supramolécula en esos sitios, posiblemente limitando el auto ensamblaje de la estructura. En resumen, los resultados permiten mejorar la comprensión de este sistema a escala molecular permitiendo desarrollar procedimientos más eficientes para el control de la fabricación de nanoestructuras basadas en DNA G-cuádruple.

Palabras Clave. Auto ensamblaje, G-cuádruple entrelazado, mecánica molecular, ADN, oligómeros de G-cuádruple.

Introducción

La fabricación de nanoestructuras usando como material DNA para llevar a cabo funciones complejas en sistemas biológicos y ambientales es una frontera en exploración [1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12]. El éxito de estas aplicaciones depende en la comprensión a nivel práctico de los mecanismos subyacentes que guían el autoensamblaje de estos sistemas. [4, 6, 7] En este trabajo se reporta la caracterización de oligómeros de ADN que contienen entre cuatro a diez cadenas cuya secuencia es rica en guaninas lo que les permite que se autoensamblen a través de la mediación de enlaces de hidrógeno tipo hogsteen; como también se reportan principios que gobiernan este ensamblaje que se pueden generalizar o adaptar para el mejor diseño y fabricación de nanoaplicaciones basadas en ADN y otras biomoléculas.

El ADN G-cuádruple es una molécula de ADN donde participan guaninas (G), que pueden estar en la misma cadena o en distintas cadenas, para formar una estructura estabilizada por enlaces de hidrógeno con cuatro Gs en un mismo plano, una tétrada (Ver Figura 1). Una molécula de ADN G-cuádruple tiene al menos dos de estos planos o tétradas apilados consecutivamente uno sobre el otro. La estructura además de ser estabilizada por los puentes de hidrógeno es estabilizada por cationes como sodio, o potasio que se encuentran alineados con el espacio en el centro de las cuatro guaninas (una especie de canal rodeado de cuatro átomos de oxígeno, uno por cada guanina) y aproximadamente centrado con respecto al eje longitudinal de la molécula entre dos tétradas consecutivas de ADN G-cuádruple.[13]

En la literatura se ha reportado la fabricación de varias nanoestructuras basadas en ADN G-cuádruple.[2] Uno de los posibles mecanismos de construcción es el auto apilamiento de unidades de G-cuádruple para formar estructuras aproximadamente cilíndricas y helicoidales. Se ha observado que oligonucleótidos (especialmente a

altas concentraciones) con varias guaninas consecutivas en su secuencia forman superestructuras donde múltiples bloques de G-cuádruple se auto apilan, ya sea de forma que un bloque se apila sobre el otro, o donde una de las cadenas del G-cuádruple se desalinea o desplaza un “peldaño” dejando una o más guaninas expuestas, permitiéndole ahora a esta subunidad interactuar con la subsiguiente unidad de G-cuádruple.[14, 15, 16] Se ha reportado que la secuencia 5'-GGGT-3'(G3T) forma una estructura denominada G-cuádruple entrelazado [17] (Ver Figura 2); esta nueva estructura se caracterizó en base a resonancia magnética nuclear y espectroscopia de diroísmo circular.[17] El G-cuádruple entrelazado se forma cuando al oligonucleótido G3T se lo somete a un procesamiento térmico que incluye varios ciclos de incremento y decremento lento y controlado de la temperatura para mover el equilibrio de estructuras favorables (i.e. el monómero de G-cuádruple) a nuevas estructuras que son cinéticamente estables (tal como la estructura G-cuádruple entrelazado). Este sistema es de interés porque demuestra un método reproducible y altamente flexible, usando control térmico, para la formación de una especie dimérica de G-cuádruple. La exploración de sistemas cuyo ensamblaje se pueda guiar por un delicado control de la temperatura permitirá generalizar y ampliar el uso del ADN como material base para nanoestructuras parte de biosensores, nano máquinas y otras aplicaciones.[4] Aquí se reporta el análisis detallado de la estructura de oligómeros de ADN obtenidos usando la secuencia 5'-TGGG-3' (TG3) utilizando un protocolo similar al usado para formar los G-cuádruple entrelazados reportados para la secuencia G3T. [17] Además, se realizó, utilizando mecánica molecular, una exploración de la estabilidad de distintas estructuras tanto para la secuencia G3T como TG3 con el fin de obtener una descripción a nivel atómico de estas estructuras que permita entender el mecanismo de formación de estos oligómeros y poner una base teórica para mejorar el diseño de nanoestructuras basadas en bloques de construcción de ADN y biomoléculas en general.

Métodos

A través un procedimiento térmico cíclico se consiguió que una secuencia de ADN se autoensamblará en un monómero de G-cuádruple paralelo o en un oligómero [14]. El proceso térmico causa una serie de pasos de desnaturalización y renaturalización gradual y controlada de un oligonucleótido de ADN que contiene varias guaninas en la secuencia con la finalidad de que forme estructuras que contengan elementos de G-cuádruple [14]. Este proceso permitió ensamblar a partir de bloques discretos de G-cuádruple, oligómeros de G-cuádruple de forma controlada. Este proceso constituye un nuevo principio de construcción utilizando ADN para la fabricación programada de nanoestructuras. La serie de experimentos aquí descritos tiene como objetivo realizar una primera caracterización a nivel atómico de este sistema

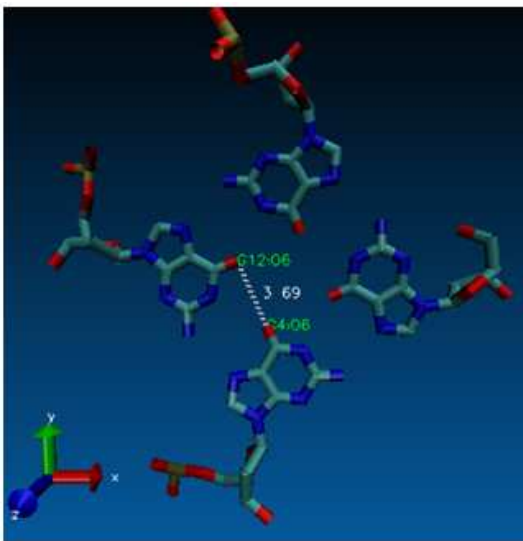


Figura 1: Tétrada G:G:G:G.

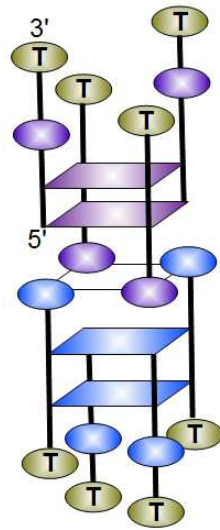


Figura 2: Estructura de G-cuádruple entrelazado de la secuencia 5'-GGGT-3' (G3T).

modelo analizando varias de estas estructuras de autoensamblaje para obtener principios que se puedan aplicar al diseño y fabricación de nanomateriales basados en ADN y otras biomoléculas.

Secuencias y preparación de monómeros de G-cuádruple y oligómeros

Las estructuras aquí analizadas por mecánica molecular forman estructuras de G-cuádruple entrelazado y de otros oligómeros cuya estructura es desconocida [14]. (Figura 3). G3T forma un G-cuádruple entrelazado pero la estructura formada por TG3 no ha sido investigada.

Preparación del modelo.

Se prepararon modelos de G-cuádruple para 5'-TGGG-3' y 5'-TGGG-3', así como de un posible estructura para el oligómero de 5'-TGGG-3'. Estos modelos fueron preparados utilizando VMD (Visual Molecular Dynamics) para Windows versión 1.9 (Universidad de Illinois-Urbana Champagne) en una laptop personal. Se utilizaron también como parámetros iniciales para los nucleótidos los disponibles en el paquete de 3DNA 2.0 para Windows (Xiang-Jun Lu y Wilma K. Olson) [18]. Se utilizó la base de guanina para B-DNA incluidas en el paquete de 3DNA como punto de inicio. Utilizando VMD se rotaron las moléculas aproximadamente 90 grados entre sí quedando alineadas en un mismo plano y reacomodadas de tal forma que ensamblen el patrón de puentes de hidrógeno tipo Hoogsteen característico de G-cuádruple. (Figura 1) Luego se aseguró que queden a una distancia correspondiente a las distancias de referencia publicadas en estructuras conteniendo tétradas G:G:G:G [19, 20]. Se utilizó la misma estrategia para la tétrada T:T:T:T [21]. Los G-cuádruple G3T y TG3 se construyeron superponiendo las tétradas con una separación entre planos de 3.4 Å y un ángulo de rotación entre planos de 36°. A este primer modelo se lo introduce en una caja de agua de dimensiones que tengan al

menos 12 Å de distancia entre un átomo de la molécula y cualquier cara de la caja. Una vez construida la caja de agua, se procede a añadir los contra iones (potasio). Los cationes fueron añadidos siguiendo el protocolo de autoionización incluido en VMD.

Minimización

Las moléculas fueron sometidas a minimización en una serie de etapas. En la primera etapa se minimizó el agua (y cationes, potasio) alrededor de la molécula dejando fijos los átomos del ADN por un total de 3000 pasos. Segundo, en algunos casos se dejaron fijos todos los átomos excepto los del esqueleto para asegurar que los extremos 5' y 3' entre las distintas tétradas estuvieran correctamente alineadas y enlazadas, y se minimizaron por al menos 3000 pasos. Finalmente, se levantó la restricción de movimiento a todos los átomos del sistema, minimizando todo por 15000 pasos. Esto se realizó utilizando NAMD Scalable Molecular Dynamics 2.8 (Universidad de Illinois- Urbana Champagne) para Linux instalado en un clúster de 12 procesadores (Linux distribución Rocks 5.4.3 (viper)). Se utilizó un campo de fuerza CHARMM como está implementado en NAMD 2.8. Se implementó el método de electrostática periódica de sistema completo con el algoritmo Particle Mesh Ewald. Los archivos de topología y parámetros de CHARMM *top_all27_prot_lipid_na.inp* y *par_all27_prot_lipid_na.inp* que se utilizaron se pueden encontrar en: <http://code.google.com>

Resultados

Arquitectura topológica

La determinación de la estructura tridimensional de todas las especies formadas por las secuencias estudiadas aquí está fuera del alcance de este estudio pero constituye un trabajo en progreso a ser reportado en el mediano plazo. Para la construcción de los modelos de la estructura del oligómero 5'-TGGG-3' (TG3) nos basamos en resultados experimentales que reportamos previamente. [14] Brevemente, los datos de diroísmo circular de TG3 indican que tanto el monómero (G-cuádruple) como el oligómero son G-cuádruple paralelos [14]. Los mismos resultados se obtuvieron para el monómero y el G-cuádruple entrelazado de la secuencia 5'-GGGT-3' cuyo espectro de diroísmo circular no había sido reportado antes. Para el caso de nuestra secuencia TG3, electroforesis de gel de poliacrilamida confirmó la formación de tanto el monómero como el oligómero [14]. Basados en la movilidad de la banda del oligómero de TG3, que tiene un desplazamiento más lento que la banda correspondiente al G-cuádruple entrelazado (de 8 cadenas), postulamos que la estructura consta de entre 9 a 11 cadenas. Aquí reportamos un modelo de la estructura conteniendo 10 cadenas que parece ser el número más consistente con la movilidad de las bandas observadas. (Figura 9) Basados en estos resultados experimentales construimos modelos que cumplieran con los siguientes

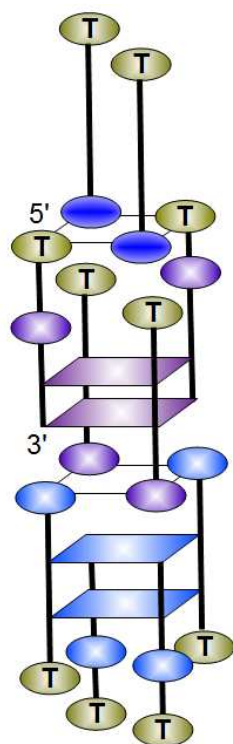


Figura 3: Modelo de posible estructura del oligómero de TG3. TGTG tétrada antes de la minimización.

requisitos a) la estructura dentro de los “monómero” debía ser de un G-cuádruple paralelo, es decir que todas las cuatro cadenas están orientadas en la misma dirección 5’ a 3’. b) El modelo del oligómero debía incorporar diez cadenas de TG3. c) Los pisos de G-cuádruple debían tener estructura similar a estructuras reportadas previamente por resonancia magnética nuclear o cristalografía de rayos x con respecto a distancia y orientación de los residuos de guanina en el mismo piso de G-cuádruple. d) para los pisos de cuartetos no convencionales (GGTT) se buscaron estructuras previamente publicadas para usarlas como referencia [22, 23, 24, 25].

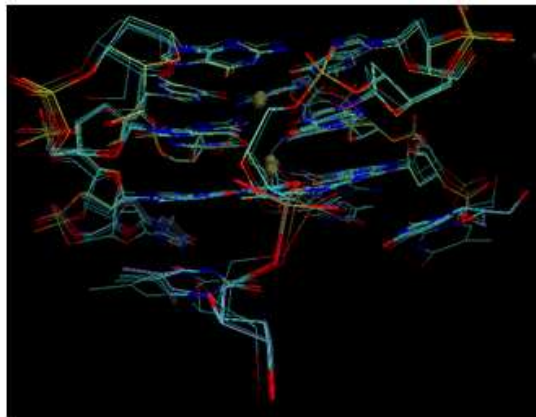
El G-cuádruple entrelazado (Figura 3) tiene cuatro cadenas orientadas 5’ a 3’ y las otras cuatro en la orientación opuesta. Las secuencias en estudio forman diferentes estructuras dependiendo del tratamiento térmico a la que el oligonucleótido fue sometido. Hay dos especies discretas que se forman. A las soluciones conteniendo estas estructuras se las sometió a análisis utilizando dicroísmo circular, una técnica que nos puede dar información sobre la orientación de las cadenas de DNA (paralelas o antiparalelas); así como también si hay diferencias en la estructura tridimensional al comparar dos moléculas de DNA (por ejemplo si es un dúplex o una estructura de G-cuádruple) [26, 27, 28]. La espectroscopia de dicroísmo circular mostró claramente un espectro característico de estructuras de G-cuádruple para todas las secuencias en presencia de potasio (ion necesario para estabilizar estructuras de G-cuádruple) [14]. Observamos que el espectro fue característico de

un G-cuádruple paralelo en todos los casos, [14] aún para el G-cuádruple entrelazado que como se indicó antes tiene una sección con las cadenas orientadas en dirección opuesta. (Figura 3) Por esta observación llegamos a la conclusión que el espectro de dicroísmo circular solo cambia cuando dentro de una sección “G-cuádruple” tenemos cadenas antiparalelas; pero no se observa cambio, en cuanto a los máximos y mínimos característicos de una estructura paralela en el espectro, cuando son distintas secciones de la misma molécula las que están orientadas en direcciones opuestas. Basados en esta conclusión, todos nuestros modelos fueron construidos como G-cuádruple “paralelo” pero sin descartar la posibilidad de incluir segmentos enteros de G-cuádruple que corren en dirección opuesta con respecto a otro segmento. (Figura 4, Figura 5)

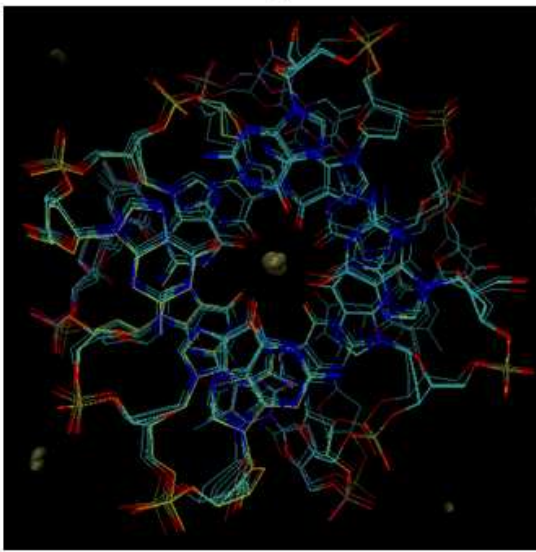
En cuanto a la estructura inicial para cuartetos (cuatro bases en un mismo piso unidas por alguna clase de puentes de hidrógeno) se usaron como modelos iniciales modelos plausibles construidos manualmente cuando las disposiciones estructurales necesarias no habían sido reportadas antes. Por ejemplo, una de las disposiciones (GTGT) al no existir una estructura publicada tuvo que ser construida de novo por lo que se prestó especial atención al producto de la minimización para obtener la disposición más estable. (Figura 6)

Cationes y solvente

Se ha reportado que la presencia de cationes es esencial para estabilizar las estructuras de G-cuádruple. En nuestros modelos se colocaron iones de K⁺ manualmente en el canal central, que es donde se ha reportado la localización de estos iones, en estudios basados en Resonancia Magnética Nuclear de estructuras de G-cuádruple [29, 30, 31]. En nuestros modelos se observan cómo esferas doradas. (Figura 4 y Figura 5) Durante la minimización los iones se movieron ligeramente de su posición pero en general permanecieron en el centro del canal consistente con las observaciones experimentales. Estos iones son indispensables para la estabilidad de la molécula, modelaciones sin el ion central causaban que la estructura se abra y desestabilice de manera importante. Los modelos de ADN fueron introducidos en una caja de agua (TIP3) de dimensiones tales que al menos existe una distancia de 12 Å entre cualquier átomo de las estructuras y el extremo de la caja de agua. (Figura 7) NAMD, el software de dinámica molecular utilizado en este estudio, realiza una simulación periódica donde la caja de agua y su contenido es la unidad que se repite en todo el espacio. El tamaño de la caja de agua garantiza que no exista interacción entre las estructuras de ADN, y que durante la simulación la molécula no se salga de la caja de solvente. Este sistema fue neutralizado con iones de potasio (K⁺) utilizando la herramienta de autoionización de VMD. (Figura 7) La molécula de DNA es rica en cargas negativas debido a los fosfatos del esqueleto por lo que es de gran importancia la adición de cationes para estabilizar el sistema.



(a)

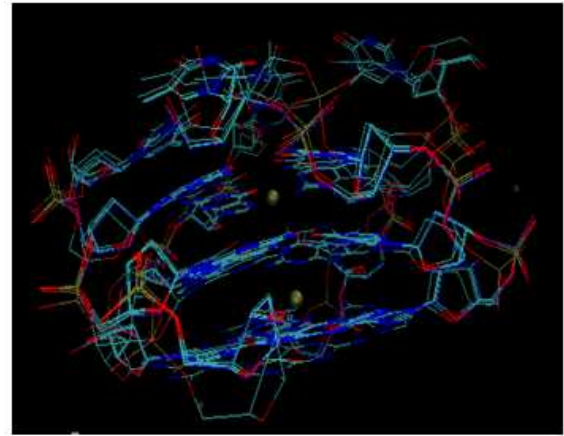


(b)

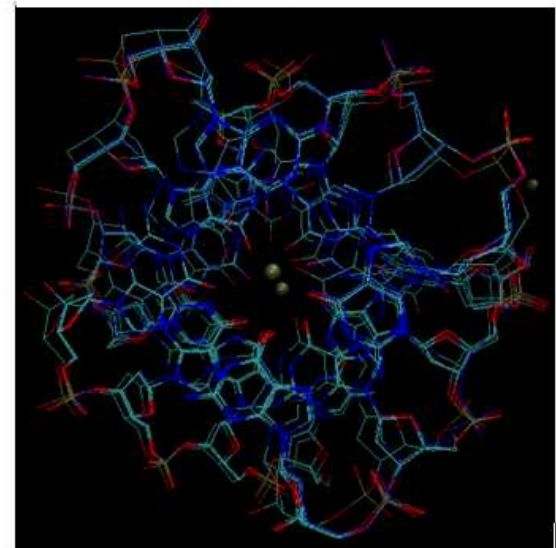
Figura 4: Superposición de estructuras del monómero G-cuádruple de G3T, se muestra una estructura cada 1500 pasos de minimización. Vista lateral (a) y vista superior (b). Los átomos de hidrogeno no se muestran para facilitar la visualización. Los residuos de la estructura final se muestran de color distinto al estándar cian (carbonos) y azul (nitrógenos). Regiones donde se pueden distinguir mayor numero de estructuras no perfectamente superpuestas indica regiones que se acomodaron más durante la minimización .

Minimizaciones

Todas las minimizaciones se realizaron por un total de 15000 pasos que se determinó era suficiente para que la estructura alcanzara el equilibrio. Para determinar si la molécula alcanzó el equilibrio se analizaron varios criterios como el RMSD (root media square displacement), RSMF (root media square fluctuation), y el desplazamiento total tanto de la molécula completa de ADN, cómo de los residuos individuales (los nucleótidos que conforman cada una de las cadenas que se ensamblan en las nanoestructuras) (Figura 8). En ambos casos se busca observar que ya no existan cambios significativos en estos parámetros al incrementar los pasos de minimización. En las matrices en las que se codifican los valores para estos parámetros con colores se observa que ya no



(a)



(b)

Figura 5: Superposición de estructuras del monómero G-cuádruple de TG3, se muestra una estructura cada 1500 pasos de minimización. Vista lateral (a) y vista superior (b). Los átomos de hidrogeno no se muestran para facilitar la visualización. Solo la posición final de los iones de potasio (esferas) se muestran. La estructura final se muestra de un color purpura. Regiones donde se pueden distinguir mayor numero de estructuras no perfectamente superpuestas indica regiones que se acomodaron más durante la minimización.

existen cambios al final de la minimización. El sistema de G3T(monomérico) tiene un total de 9306 átomos incluyendo las moléculas de solvente. La energía total del sistema luego de una minimización de 15000 pasos es de -43844.5697 Kcal/mol (esta energía no es una energía absoluta del sistema y por lo tanto sólo se puede utilizar con fines de comparación con sistemas equivalentes). En comparación el sistema de TG3 monomérico que tiene un total de 9306 átomos, tiene una energía total luego de 15000 pasos de -41074.1647 Kcal/mol. Esto indica que el monómero de TG3 es menos estable que G3T, esto coincide con las observaciones experimentales de que TG3 monomérico se forma en menor proporción que TG3 y prefiere en lugar del monómero

formar el oligómero [14]. TG3 es una especie que no se forma en cantidades significativas de G-cuádruple monomérico, pero forma lo que nosotros sospechamos es un G-cuádruple entrelazado bajo las condiciones apropiadas.

También se minimizó un modelo para el oligómero de TG3 que tiene como peculiaridad que, a diferencia del G-cuádruple entrelazado, tiene dos cadenas que quedan sobresaliendo de la estructura. (Figura 2 y Figura 3) Es-

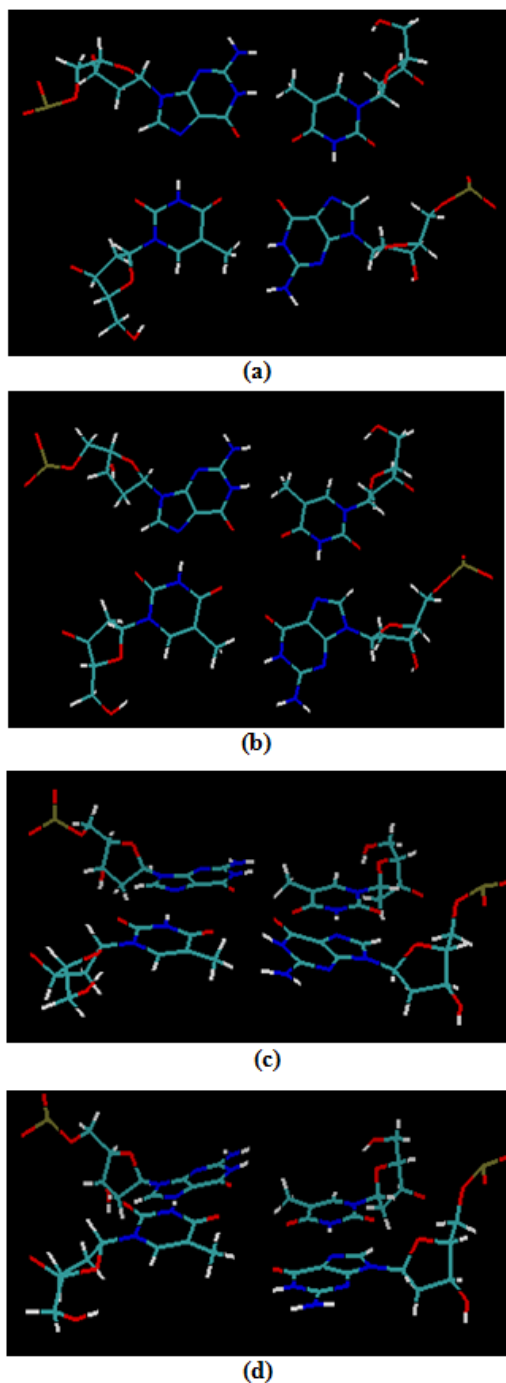
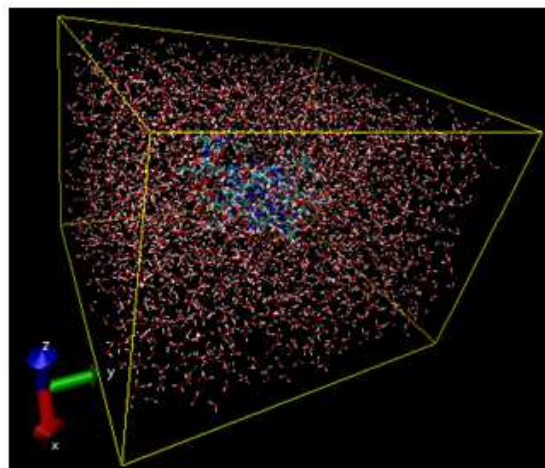
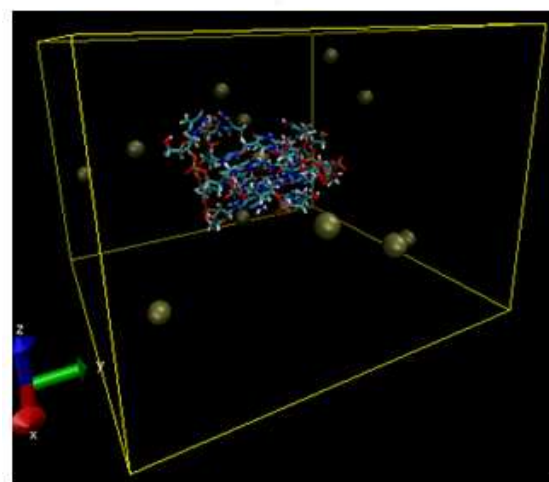


Figura 6: Vista superior de la tétada GTGT antes (a) y después de 15000 pasos de minimización (b). Vista lateral de la tétada GTGT antes (c) y después de 15000 pasos de minimización (d).



(a)

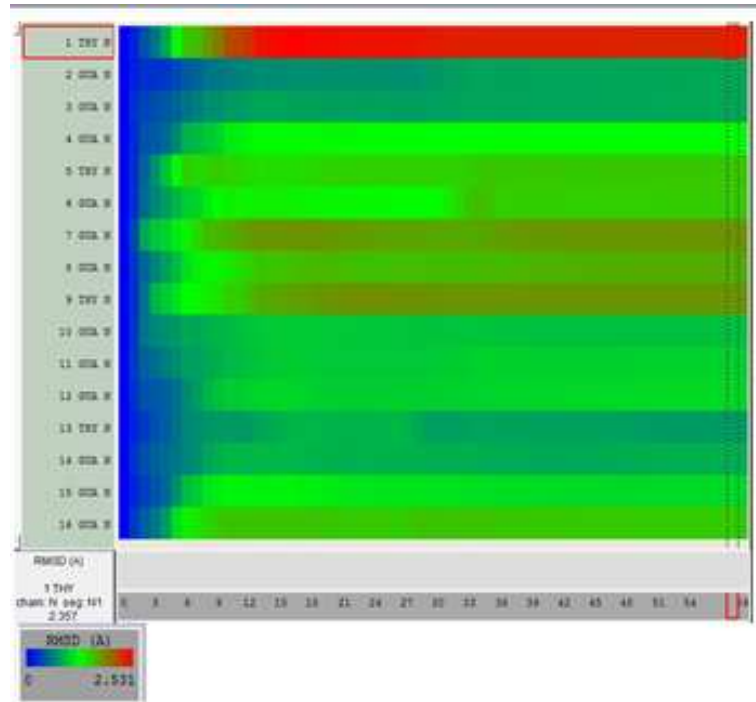


(b)

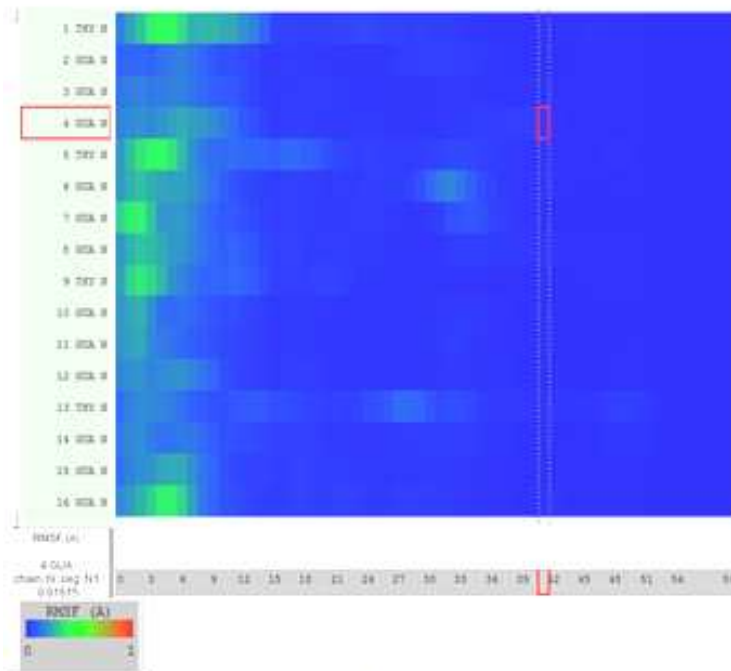
Figura 7: (a) Molécula de 5'-TGGG-3' (TG3) G-cuádruple en una caja de agua. (b) las moléculas de agua están ocultas para facilitar visualizar la ubicación del G-cuádruple y de los átomos de potasio. Obsérvese que están presentes tanto en el interior de la estructura como en el exterior.

to se reconcilia con las observaciones del gel de electroforesis donde este oligómero se desplaza ligeramente más despacio que el G-cuádruple entrelazado. Estas dos cadenas en principio deberían ser mucho más móviles porque no están formando parte de un motivo tan estructurado como el de G-cuádruple. Sin embargo esto no es lo que se observa en los resultados de la minimización reflejando que hay otros factores mucho más importantes a este nivel de teoría.

En realidad tan sólo dos de los residuos que presentan mayor reacomodación ($RMSD > 1.8$) representados con los colores marrón y rojo están en las dos cadenas que sobresalen en el dímero y tan sólo una de las timinas terminales está representada. (Figura 9) Las regiones donde hay mayor reacomodación corresponden a las zonas donde dos cadenas (con respecto al eje longitudinal de la hélice de ADN) se encuentran o en otras palabras el sitio entre donde una cadena inicia y la otra termina.



(a)

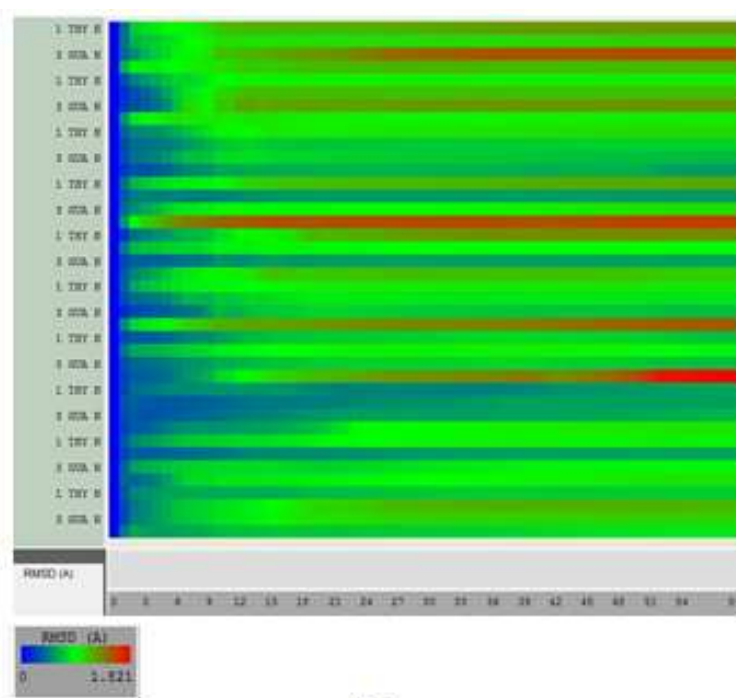


(b)

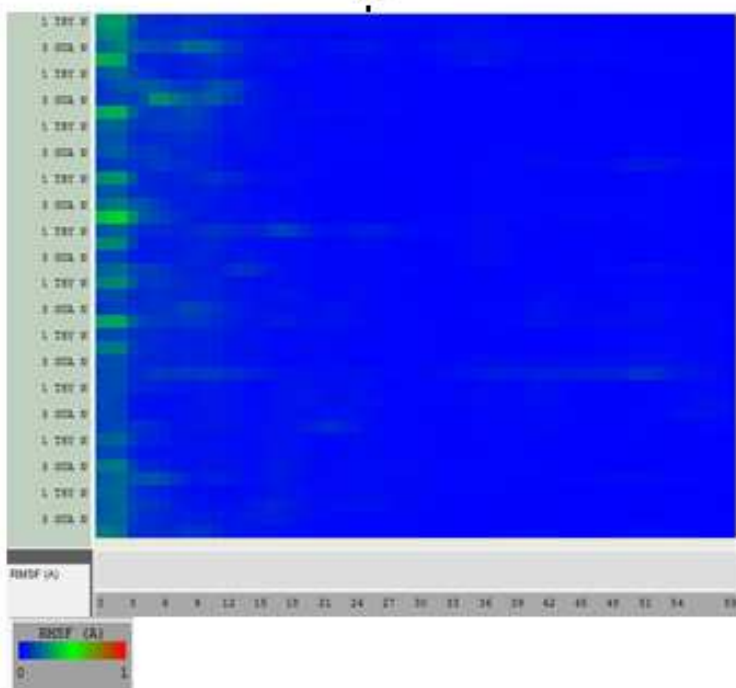
Figura 8: Resultados de la minimización del monómero G-cuádruple de G3T. (a) Root media square displacement (RMSD) de cada residuo con respecto a los pasos de minimización. (b) Root media square fluctuation (RMSF) Eje y corresponde al residuo dentro de la estructura y el eje x corresponde al número del marco de la minimización (1 marco = 250 pasos de minimización). Esta estructura se minimizo por un total de 15000 pasos. Ausencia de cambio de color en los marcos finales indica que la estructura ya no está cambiando y ha llegado a un mínimo .

Esto se podría explicar por dos razones principales. La primera que la geometría inicial de estas regiones estaba arbitrariamente más alejada del mínimo. Estas regiones sin embargo se implementaron de tal forma que exista una continuidad en la hélice del ADN y se modelaron

siguiendo los mismos parámetros que los residuos “internos” y tendrían mucho menos movilidad o espacio para reacomodarse que las bases en las cadenas sobresalientes. Por tanto esta razón por sí sola no explica la observación. La segunda perspectiva es que precisamente



(a)



(b)

Figura 9: Resultados de la minimización de un modelo para el oligómero de G-cuádruple de TG3. (a) Root media square displacement (RMSD) de cada residuo con respecto a los pasos de minimización. (b) Root media square fluctuation (RMSF) Eje y corresponde al residuo dentro de la estructura y el eje x corresponde al número del marco de la minimización (1 marco = 250 pasos de minimización). Esta estructura se minimizó por un total de 15000 pasos. Ausencia de cambio de color en los marcos finales indica que la estructura ya no está cambiando y ha llegado a un mínimo.

estos residuos, por estar más restringidos por la presencia de residuos vecinos y siendo que estas regiones de interface vienen a representar puntos de corte en la continuidad de lo que en ADN B normal sería una cadena continua, requieren reacomodarse más para adaptarse a

este ambiente. Por tanto a este nivel de teoría, dónde estamos examinando la estabilidad intrínseca de la molécula y no su respuesta a factores externos concluimos que las repulsiones de tipo estérico y electrostático intramolecular e intermolecular (con la cadena inmedia-

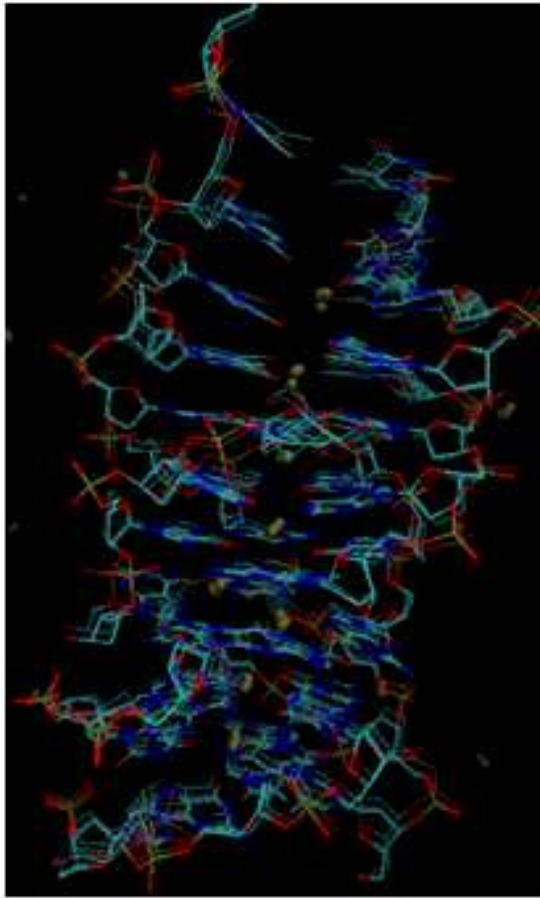


Figura 10: Superposición de estructuras del modelo para el oligómero de TG3, se muestra una estructura cada 1500 pasos de minimización. Los átomos de hidrogeno no se muestran para facilitar la visualización. Esferas representan iones de potasio.

tamente adyacente) son las fuerzas que determinan la estabilidad de una configuración dada. Por tanto, estos resultados no están en contradicción con observaciones experimentales dónde se ve por ejemplo que los pares de bases más externos presentan mayor movilidad o son los más propensos a “abrirse transitoriamente” [32]. Otro aspecto muy interesante en este modelo de oligómero es el rol del catión. Si se presta especial atención al átomo de potasio colocado exactamente encima de lo que sería la última tétrada GTGT y a la región de las dos cadenas sobresalientes (modelo en Figura 3); se observa que la estructura minimizada se distorsiona para formar una triada GGT. (Figura 11). Esto se debe en parte a que los oxígenos de las guaninas 2 y 3 (contadas desde el extremo 5' correspondiente a la T) en las cadenas sobresalientes (en azul y rojo en la Figura 11) se orientaron apuntando hacia el potasio, causando una reacomodación de toda esa región que se podría resumir en que las cadenas marcadas en rojo y gris se desplazaron el equivalente al espacio de una base hacia abajo (a lo largo del eje longitudinal de la hélice de ADN). Como consecuencia se forman dos triadas GGT. La primera está marcada por la guanina en cian en la Figura 11 y la segunda esta inmediatamente debajo. Este mecanismo tendría un papel fundamental en el autoensamblaje

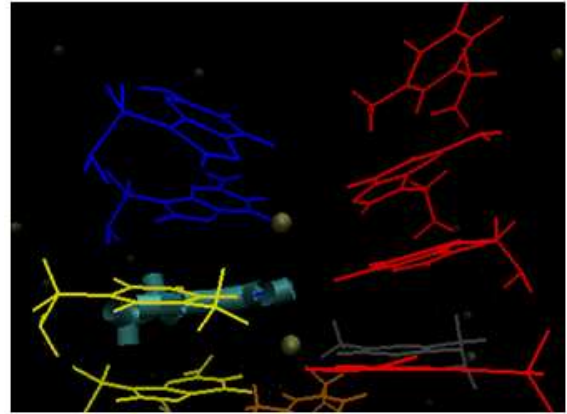


Figura 11: Triada G:G:T (la G esta de color cian y en representación de enlace). Inmediatamente abajo se observa otra triada G:G:T con la contribución de una T (en amarillo) que al inicio de la minimización correspondía a la tétrada G:T:G:T inmediatamente inferior. Cada cadena está representada de un color distinto y parte del esqueleto está omitido para facilitar la visualización.

del sistema porque este catión podría estabilizar conformaciones que limiten la “polimerización” o que el autoensamblaje continúe. Sin embargo, aún se requiere avanzar con el análisis donde el siguiente paso a seguir es repetir la minimización sin este potasio y realizar las simulaciones de dinámica molecular para ver si este potasio se mantiene en este sitio o durante la simulación se pierde hacia el solvente. El rol del catión en este caso es un claro ejemplo de cuanto los cationes pueden influenciar en la estructura dinámica del ADN especialmente en este tipo de regiones más expuestas al solvente.

Conclusiones

El estudio a nivel atómico de estructuras que se autoensamblan cómo estos oligómeros de G-cuádruple aporta a la comprensión sobre la importancia del rol que juegan los cationes en la solución en la estabilidad de la molécula, así como también qué información importante sobre la estabilidad de la conformación se puede obtener a partir de una minimización donde podemos separar el efecto de factores externos que se introducen durante dinámica molecular. En este caso, las regiones de transición entre una cadena y otra representan los sitios donde mayor reacomodación con respecto a una estructura B-ideal es necesaria. Por tanto, la identidad de las bases terminales (extremos 5'y 3') son de esencial importancia para el producto final de autoensamblaje. Esto explica por qué dos secuencias tan similares como son 5'-GGGT-3' y 5'-TGGG-3' producen dos clases distintas de oligómeros bajo idénticas condiciones y tratamiento. Esta observación es de suma importancia porque significa que se puede introducir un nuevo nivel de control en el autoensamblaje de ADN al controlar la identidad de las bases a extremos 5'y 3' e incluso introducir nucleótidos modificados en estos extremos para obtener mayor variedad en el ensamblaje de nanoestructuras basadas en ADN. Finalmente, también estos resultados tienen implicación directa en el rol de

la introducción de fluoróforos para seguir la estructura de nanoestructuras de ADN a través de técnicas como fluorescence resonance electron transfer (FRET) donde la introducción del fluoróforo podría de manera fundamental cambiar el comportamiento del autoensamblaje del sistema. Este estudio constituye una primera parte de un más profundo entendimiento a nivel atómico de los procesos de autoensamblaje de ADN G-cuádruple. Los modelos minimizados aquí reportados serán usados como estructuras iniciales para simulaciones de dinámica molecular donde se incluirá el efecto del solvente e iones, y que permitirán adicionalmente estudiar cómo el tratamiento térmico afecta la estabilidad relativa de estas estructuras. (Manuscrito en preparación)

Agradecimientos

Los investigadores quieren agradecer a las siguientes personas: Bernardo Gutiérrez, Gabriela Méndez, Francisco Yanqui, Ana Samaniego y Denisse Vallejo quienes trabajaron en parte del proyecto, la mayoría de su trabajo será reportado en subsecuentes publicaciones. También se agradece a la Corporación Ecuatoriana para el Desarrollo del Internet Avanzado (CEDIA) quién parcialmente financia al grupo GETNano (Grupo Ecuatoriano para el Estudio Experimental y Teórico de Nanosistemas) sin cuyo soporte, y apoyo, este trabajo no habría sido posible. Se agradece especialmente a F. Javier Torres, director del grupo de Química Computacional y Teórica de la USFQ (QCT-USFQ) por todo el apoyo logístico, revisión y discusión del proyecto. A Veronika A. Szalai investigador principal del laboratorio donde todos los experimentos fueron hechos y cuyos resultados fueron usados para este estudio teórico

Referencias

- [1] Seeman, N. 2007. An overview of structural DNA nanotechnology. *Molecular Biotechnology*. 37 (3), 246-257.
- [2] Dutta, K.; Fujimoto, T. 2010. Development of New Functional Nanostructures Consisting of Both DNA Duplex and Quadruplex. *Chem. Commun.* 46 (41), 7772-7774.
- [3] Pal, S.; Deng, Z. 2010. DNA-Origami-Directed Self-Assembly of Discrete Silver-Nanoparticle Architectures. *Angewandte Chemie International Edition*. 49 (15), 2700-2704.
- [4] Sadhasivam, S.; Yun, K. 2010. DNA Self-Assembly: Prospectus and Its Future Application. *Journal of Materials Science*. 45 (10), 2543-2552.
- [5] Wilner, O. I.; Henning, A. 2010. Covalently Linked DNA Nanotubes. *10 (4)*, 1458-1465.
- [6] Andersen, E. S.; Dong, M. 2009. Self-Assembly of a Nanoscale DNA Box with a Controllable Lid. *Nature*. 459 (7243), 73-76.
- [7] Dietz, H.; Douglas, S. 2009. Folding DNA into Twisted and Curved Nanoscale Shapes. *Science*. 325 (5941), 725-730.
- [8] Ke, Y.; Sharma, J. 2009. Scaffolded DNA Origami of a DNA Tetrahedron Molecular Container. *Nano Letters*. 9 (6), 2445-2447.
- [9] Pisano, S.; Varra, M. 2008. Superstructural Self-Assembly of the G-quadruplex Structure Formed by the Homopurine Strand in a DNA Tract of Human Telomerase Gene Promoter. *Biophys. Chem.* 136 (2-3), 159-163.
- [10] Bath, J.; Turberfield, A.J. 2007. DNA Nanomachines. *Nature Nanotechnology*. 2 (5), 275-284.
- [11] Lin, C.; Liu, Y. 2006. DNA Tile Based Self-assembly: Building Complex Nanoarchitectures. *ChemPhysChem*. 7 (8), 1641-1647.
- [12] Niemeyer, C. M.; Simon, U. 2005. DNA-Based Assembly of Metal Nanoparticles. *European Journal of Inorganic Chemistry* 2005 (18), 3641-3655.
- [13] Bates, P.; Mergny, J. 2007. Quartets in G-major. The First International Meeting on Quadruplex DNA. *In EMBO Rep, England*. Vol. 8, pp 1003-10.
- [14] Mendez, M. A.; Szalai, V.A. 2009. Fluorescence of Unmodified Oligonucleotides: A Tool to Probe G-quadruplex DNA Structure. *Biopolymers*. 91 (10), 841-850.
- [15] Miyoshi, D.; Karimata, H. 2007. Artificial G-wire Switches with 2,2'-Bipyridine Units Responsive to Divalent Metal Ions. *J. Am. Chem. Soc.* 129, 5919 - 5925.
- [16] Alberti, P.; Bourdoncle, A. 2006. DNA Nanomachines and Nanostructures Involving Quadruplexes. *Org. Biomol. Chem.* 4, 3383-3391.
- [17] Krishnan-Ghosh, Y.; Liu, D. 2004. Formation of an Interlocked Quadruplex Dimer by D(GGGT). *J Am Chem Soc.* 126, 11009-11016.
- [18] Lu, X.-J.; Olson, W.K. 2008. 3dna: A Versatile, Integrated Software System for the Analysis, Rebuilding and Visualization of Three-Dimensional Nucleic-Acid Structures. *3 (7)*, 1213-1227.
- [19] Parkinson, G. N.; Lee, M. 2002. Crystal Structure of Parallel Quadruplexes from Human Telomeric DNA. *Nature*. 417, 876-880.
- [20] Haider, S.; Parkinson, G. 2002. Crystal Structure of the Potassium Form of an Oxytricha Nova G-quadruplex. *J. Mol. Biol.* 320, 189-200.
- [21] Lim, K. W.; Alberti, P. 2009. Sequence Variant (CTAGGG)_n in the Human Telomere Favors a G-quadruplex Structure containing a G:C:G:C Tetrad. *Nucleic Acids Research*. 37 (18), 6239-6248.
- [22] Viladoms, J.; Escaja, N. 2010. Self-Association of Cyclic Oligonucleotides through G:T:G:T Minor Groove Tetrads. *Tetrahedron Young Investigator Award 2010: Professor Seeberger, Tetrahedron*. 2010, 18 (11), 4067-4073.
- [23] Webba daSilva, M. 2003. Association of DNA Quadruplexes through G:C:G:C Tetrads. Solution Structure of D(GCGGTGGAT). *Biochemistry*. 42 (49), 14356-14365.
- [24] Escaja, N.; Pedroso, E. 2000. Dimeric Solution Structure of Two Cyclic Octamers: Four-stranded DNA Structures Stabilized by A:T:A:T and G:C:G:C Tetrads. *J. Am. Chem. Soc.* 122, 12732-12742.
- [25] Gu, J.; Leszczynski, J. 2000. Structures and Properties of the Planar G:C:G:C Tetrads: Ab initio HF and DFT Studies. *J. Phys. Chem. A*. 104, 7353-7358.

- [26] Gray, D. M.; Wen, J. 2007. Measured and Calculated CD Spectra of G-quartets Stacked with the Same or Opposite Polarities. *Chirality*.
- [27] Nagatoishi, S.; Tanaka, Y. 2007. Circular Dichroism Spectra Demonstrate Formation of the Thrombin-binding DNA Aptamer G-quadruplex under Stabilizing-Cation-Deficient Conditions. *Biochem Biophys Res Commun.* 352 (3), 812-7.
- [28] Fasman, G. D. 1996. Circular Dichroism and the Conformational Analysis of Biomolecules. *Plenum Press: New York.* p ix, 738 p.
- [29] Hud, N. V.; Schultze, P. 1999. Binding Sites and Dynamics of Ammonium Ions in a Telomere Repeat DNA Quadruplex. *J. Mol. Biol.* 285, 233-243.
- [30] Hud, N. V.; Schultze, P. 1998. Ammonium Ion as an NMR Probe for Monovalent Cation Coordination Sites of DNA Quadruplexes. *Journal of the American Chemical Society.* 120 (25), 6403-6404..
- [31] vanMourik, T.; Dingley, A.J. 2005. Characterization of the Monovalent Ion Position and Hydrogen-bond Network in Guanine Quartets by DFT Calculations of NMR Parameters. *Chemistry.* 11 (20), 6064-79.
- [32] Andreatta, D.; Sen, S. 2006. Ultrafast Dynamics in DNA: "Fraying" at the End of the Helix. *128 (21), 6885-6892.*

Isolation and identification of secondary metabolites from *Artemisia sodiroi* Hieron

Talía Briceño¹ César M. Compadre^{1,2} Paola Ordóñez^{1,2*} Omar Malagón¹

¹Instituto de Química Aplicada, Universidad Técnica particular de Loja,
San Cayetano Alto s/n, Loja, Ecuador

²Department of Pharmaceutical Sciences, University of Arkansas for Medical Sciences,
Little Rock, AR 72205, United States
E-mail: peordonezx@utpl.edu.ec

Editado por/Edited by: Carlos Fabara, M.Sc.

Recibido/Received: 12/09/2011. Aceptado/Accepted: 12/11/2011.

Publicado en línea/Published on Web: 12/20/2011. Impreso/Printed: 12/20/2011.

Abstract

Artemisia sodiroi Hieron (Asteraceae), commonly known as “Ajenjo”, is used in traditional medicine in Southern Ecuador for the treatment of inflammations, stomachaches, hepatic pains, fever, kidney problems, headaches, cough and by women to regulate their menstrual cycle. In this paper we report a phytochemical screening of the aerial parts of *A. sodiroi*, which led the identification of five known secondary metabolites, 24-methylenecycloartanol, stigmaterol, sitosterol, sabinyl acetate, and methyl-L-inositol, their structure were elucidated by spectroscopic methods including GC/MS, ¹H NMR and ¹³C NMR.

Keywords. *Artemisia sodiroi*, phytochemicals, 24-methylenecycloartanol, stigmaterol, sitosterol, sabinyl acetate, methyl-inositol.

Abstract

Artemisia sodiroi Hieron (Asteraceae), comúnmente conocido como “Ajenjo”, se utiliza en la medicina tradicional en el sur de Ecuador para el tratamiento de inflamaciones, dolores de estómago, dolores hepáticos, fiebre, problemas renales, dolores de cabeza, tos y se utiliza por las mujeres para regular su ciclo menstrual. En este trabajo se presenta un tamizaje fitoquímico de las partes aéreas de *A. sodiroi*, lo que condujo a la identificación de cinco metabolitos secundarios conocidos, 24 - metylenecicloartanol, estigmaterol, sitosterol, el acetato de sabinyl, y metil-L-inositol, su estructura fueron determinadas por métodos espectroscópicos como GC / MS, ¹H NMR y ¹³C NMR.

Palabras Clave. *Artemisia sodiroi*, fitoquímico, 24-methylenecycloartanol, stigmaterol, sitosterol, sabinyl acetate, methyl-inositol.

Introduction

The use of plants to treat and cure diseases is an ancestral practice, however the systematic study of plants for identified their chemicals constituents is still in progress.

Asteraceae family have yield several important compounds described as the active principles of medicinal plants used in traditional medicine. In the *Artemisia* genus of this family the most studied species are: *A. annua* employed in medicine against malaria, and source of antimalarial compound, artemisinin; *A. apiaceae* and *A. araratic* have been reported to contain flavonoids [1], and *A. albida* Willd has yield sesquiterpene lactones and flavonoids [2].

In Ecuador three species have been reported within *Artemisia* genus [3], *A. absinthium* L., *A. sodiroi* Hieron.,

and *A. annua* L. The aerial parts of *Artemisia sodiroi* commonly known as “Ajenjo” are used in traditional medicine in Southern Ecuador for the treatment of inflammations, headaches, stomachaches, hepatic pains, fever, kidney problems, headaches, cough and by women to regulate their menstrual cycle [4].

A GC/MS analysis of essential oil of *A. sodiroi* has been reported [5], colorimetric tests for the determination of secondary metabolites in the methanol extract showed the presence of alkaloids, tannins, steroids, and sesquiterpene lactones, cardiac glycosides [6]. However, there are no from previous reports of the isolation of phytochemicals from this species.

The purpose of this study is to identify and characterize the secondary metabolites from the aerial parts of *Artemisia sodiroi*. In this paper we report the isolation

ISSN 1390-5384



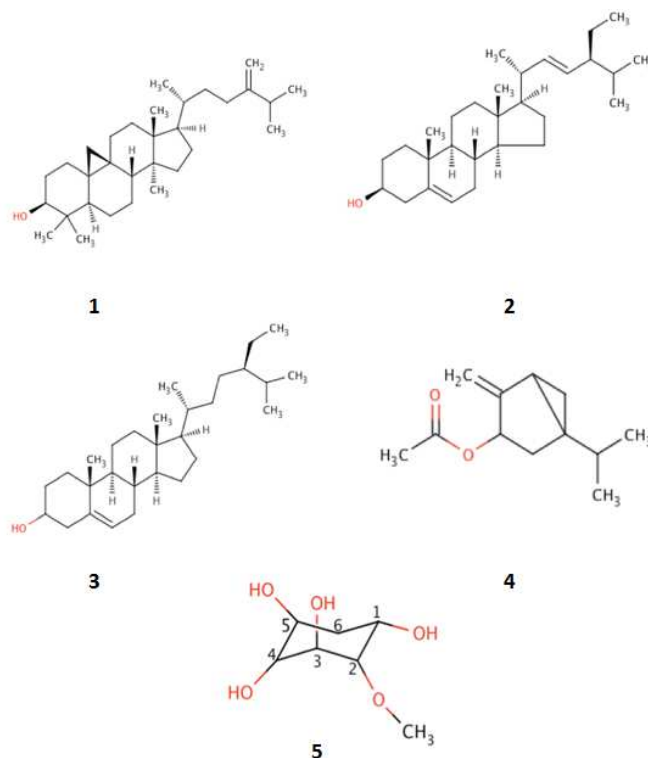


Figure 1: Structures of 24-methylenecycloartanol (1), stigmasterol (2), sitosterol (3), sabinyl acetate (4) and methyl-inositol (5).

tion and chemical characterization of five known compounds.

Materials and methods

General experimental procedures

Uncorrected melting points were measured with a Fisher-Johns apparatus. The GC/MS data were obtained in an Agilent 5975C Series GC/MS instrument operating under electron impact conditions (EI) at 70eV. NMR spectra were recorded in CDCl_3 and DMSO at 25°C on a Varian, operating at 400MHz for ^1H and 100Mz for ^{13}C spectra. All 1D and 2D spectra were acquired and processed with standard Varian software. Column chromatography was carried out using 60-230 mesh silica gel. Thin layer chromatography (TLC) was performed on aluminum plates covered with silica gel 60 F₂₅₄ plates (0.2 mm thick, Merck).

Plant material

The aerial parts of *A. sodiroi* were collected in June 2009 in the locality of Chuquiribamba, in the Loja province of Ecuador. Voucher specimens with the code PPN-as-021 are deposited at the Herbarium of the Applied Chemistry Institute of the Universidad Técnica Particular de Loja, Loja-Ecuador.

Extraction and isolation

The air-dried plant material (400 g) was extracted with hexane (dynamic maceration for 5 h) at room temperature and filtered in vacuum, the plant residue was ex-

tracted with ethyl acetate under the same conditions described before, after de filtration process the new residue was extracted with methanol (same pressure conditions); finally the three extracts (hexane, ethyl acetate and methanol) were concentrated under reduced.

Each one of the extracts hexane (7.48 g.), ethyl acetate (12.16 g.) and methanol (34.02 g.) was fractionated by column chromatography that was packed using wet packing method in hexane, using a ratio of 1:40 extract-silica gel. The columns were run using hexane, ethyl acetate and methanol by gradient elution technique. From the hexane extract fractionation 290 fractions were collected. From the ethyl acetate extract 290 fractions and from the methanol extract fractionation 282 fractions were collected.

Compound **1** (Figure 1) was eluted in the hexane-ethyl acetate (9:1) fraction (10 mg) as a white solid. Compound **2** and compound **3** were eluted in the hexane-ethyl acetate (8:2) fraction as a white solids; this three compound were obtained from the hexane extract fractionation. Compound **4** was eluted from the ethyl acetate extract in the hexane-ethyl acetate (8:2) fraction as a white solid. Compound **5** was eluted from the methanol extract fractionation in the ethyl acetate-methanol (8:2) fraction and recrystallized from methanol as a white crystalline solid.

Spectroscopic characterization

GC/MS analysis was used to identify compounds **1** to **4**, while ^1H NMR and ^{13}C NMR was used to identify compound **5**.

24-methylenecycloartanol (**1**): C₃₁H₅₂O, the mass spectrum of compound **1** shown the molecular ion at m/z 440 with fragments at m/z (relative intensity) 440(25), 422(66.92), 407(100), 379(53.01), 300(58.81), 175(68.4), 121(77.67), 81(83.71). The results were compared with other studies previously reported [7].

Stigmasterol (**2**): C₂₉H₄₈O, the mass spectrum shown the molecular ion at m/z 412, with fragments at m/z (relative intensity) 412(100), 394(26.37), 369(17.34), 327(25.43), 300(38.3), 271(48.9), 95(49.5), 69(64.16), these fragments were compared with the reported in the literature [8].

Sitosterol (**3**): C₂₉H₅₀O, the mass spectrum showed the molecular ion at m/z 414 with fragments at m/z (relative intensity) 414 (100), 396 (48.16), 329 (40.6), 303 (36.02), 273 (17.02), 255 (20.23), 213 (23.07), 145 (25.36), 107 (24.9), 95 (22.66), 81 (22.7), 69 (16.69), these data was compared with the reported in the literature for this compound [8].

Sabinyl acetate (**4**): C₁₂H₁₈O₂, the mass spectrum shows the characteristic fragments at m/z 150[M-44], 134[M-60], 91[C₇H₇⁺].

Methyl-inositol (**5**): colorless crystal (methanol), C₇H₁₄O₆, mp 190-193°C. ¹H NMR (D₂O, 400 Mz): δ 3.08 (dd, 1H); 3.26 (m, 1H); 3.31 (s, 3H, H-OMe); 3.39 (m, 1H); 3.44 (m, 1H); 3.66 (q, 1H); 3.84 (q, 1H); 4.29 (d, H-O); 4.43 (dd, 2H-O); 4.63 (dd, 2H-O). ¹³C NMR (D₂O, 100 Mz): δ 56.81 (Me); 68.062 (C1); 70.501 (C5); 72.059 (C6); 72.236 (C4); 73.322 (C3); 81.113 (C2).

Results and discussion

From the hexane extract of *A. sodiroi* three triterpenes were identified using GC/MS analysis. The weak molecular ion of compound **1** was given at m/z 440 and the characteristic peaks at m/z 422 [M-H₂O], 407 [-CH₃], 300 [M-C₁₀H₂₀]. The molecular ion and the fragmentation pattern indicate that the compound is 24-methylenecycloartanol. The fraction eluted in hexane-ethyl acetate (8:2) shown two compounds with molecular ions at m/z 412 and 414, the characteristic peaks are given at m/z 271 [M-139] and 273 [M-141] due to the loss of C₁₀H₁₉ and C₁₀H₂₁. The molecular weights and the fragmentation pattern indicate that the compounds present in this sample are stigmasterol (**2**) and sitosterol (**3**) respectively. The unique difference between these two structures is the presence of a double bond in the side chain. In traditional medicine in southern Ecuador the specie *A. Sodiroi* is used by woman to treat menstrual discomforts, use that may be associated with the presence of sitosterol in the plant; previous studies report the activity of this compound as a phytoestrogen [9].

From the ethyl acetate extract the fraction eluted in hexane-ethyl acetate (8:2) was analyzed in GC/MS, the mass spectrum did not show the molecular ion, but the structure was confirmed as sabinyl acetate (**4**) by comparison

with the spectra reported in the literature [10] which shows the characteristic fragments at m/z 150[M-44], 134[M-60], 91[C₇H₇⁺].

Methyl-inositol (**5**) was isolated as a colorless crystal (methanol) from the methanol extract in the ethyl acetate-methanol (8:2) fraction, this structure was elucidated by NMR. The ¹³C NMR spectrum showed seven carbon signals with chemical shifts within the region of heteroatom-linked carbon. The ¹H NMR spectrum showed signals between 3.08 and 4.63, the signal at δ 3.31 was assigned to the three-methoxyl protons, and the signal at δ 3.08, 3.26, 3.39, 3.44, 3.66, 3.84 were attributed to the methine protons. The assignments of its ¹H and ¹³C NMR resonances have been done involving two-dimensional experiments COSY, HMQC, and HMBC. NMR analysis of this compound was previously reported [11] and it is fully consistent with our study.

Conclusions

Phytochemical study of the extracts of *A. sodiroi* allowed the identification of five secondary metabolites three triterpenes (24-methylenecycloartanol, stigmasterol and sitosterol), an ester of a monoterpene alcohol (sabinyl acetate), and a cyclitol (methyl-inositol). The compounds were characterized using spectral techniques.

Acknowledgments

We would like to thank the Instituto de Química Aplicada, Universidad Técnica Particular de Loja, for provision of laboratory facilities. Vladimir Morocho for helpful assistance with the botanical aspects and collection of *A. sodiroi*.

References

- [1] Lee, S.J. 2006. "Apicin, a new flavonoid from *Artemisia apiacea*." *Bulletin of the Korean Chemical Society* 27, 1225-1226.
- [2] Suleimenov, E.M. 2005. "Sesquiterpene lactones and flavonoids from *Artemisia albida*." *Chemistry of Natural Compounds* 41, 689-691.
- [3] Jorgensen, P.M. 1999. "Catalogue of the vascular plants of Ecuador." *Missouri Botanical Garden Press, St. Louis, Missouri* 266.
- [4] Tene, V. 2005. "An ethnobotanical survey of medicinal plants used in Loja and Zamora-Chinchi, Ecuador." *Journal of Ethnopharmacology* 111, 63-81.
- [5] Ruiz, S. 2005. *Identificación de componentes y determinación de las propiedades físicas del aceite esencial de sacha anís (Tagetes filifolia Lag.), Ajenjo (Artemisia sodiroi Hieron), y tipo del cerro (Clinopodium nubigenum (Kunth) Kuntze), utilizando Cromatografía de Gases-EM. UTPL Loja-Ecuador.*
- [6] Ordóñez, P. 2006. "Phytochemical study of native plant species used in traditional medicine in Loja Province." *Lyonia*. 10, 65-71.

- [7] Pascal, S. 1993. "Identification and characterization of two distinct microsomal oxidative enzymatic systems involved in sterol C4-demethylation." *Plant sterol biosynthesis* 11639–11654.
- [8] Kamboj, A. 2010. "Isolation of stigmasterol and B-sitosterol from petroleum ether extract of aerial parts of *Ageratum conyzoides* (asteraceae)." *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 3, 975–1491.
- [9] Burton, J. 2002. "The effect of phytoestrogens on the female genital tract." *Journal of Clinical Pathology* 55, 401–407.
- [10] Sydow, E. 1965. *Mass spectrometry of terpenes, acta chemical scandinavica* 19, 2083–2088.
- [11] Díaz M., González, 2008. "First record of l-quebrachitol in *Allophylus edulis* (sapindaceae)." *Carbohydrate Research* 343, 2699–2700.

Caracterización por Espectrometría de Masas MALDI de Cucurbit[n]uriles (n = 6,7,8)

María Emilia Dueñas,^{1,4} Sebastián Manzano,^{1,4} Vanessa Jiménez,^{2,4} Cesar Zambrano,¹
Cristian Santacruz,³ Cesar Costa Vera^{3,4,*}

¹*Colegio de Ciencias e Ingeniería, Universidad San Francisco de Quito.
Diego de Robles y Vía Interoceánica, Quito, Ecuador.*

²*Instituto de Química Aplicada, Universidad Técnica particular de Loja, San Cayetano.
Alto s/n, Loja, Ecuador*

³*Departamento de Física, Escuela Politécnica Nacional, Ladrón de Guevara E11-253.
Quito, Ecuador*

⁴*Grupo Ecuatoriano para el Estudio Experimental y Teórico de Nanaosistemas –GETNano–
Diego de Robles y Vía Interoceánica, Universidad San Francisco de Quito.
E-mail: cesar.costa@epn.edu.ec*

Editado por/Edited by: F. Javier Torres, Ph.D.

Recibido/Received: 11/29/2011. Aceptado/Accepted: 12/09/2011.

Publicado en línea/Published on Web: 12/20/2011. Impreso/Printed: 12/20/2011.

Abstract

The characterization of a mixture of cucurbit[n]uril (n=6,7,8) was carried out by MALDI MS (Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry Mass Spectrometry). The solid mixture of the titled compounds was synthesized as part of a research study involving supramolecular chemistry at the Departamento de Química e Ingeniería Química at USFQ. For the MALDI analysis, an appropriate procedure was implemented for sample preparation, which includes the effective dissolution of the solid mixture of cucurbit[n]uril in a solution of water and formic acid, and the addition of alpha-cyano-4-hydroxy cinnamic acid as MALDI matrix (10g/l in 70:30 (v:v) of methanol:acetonitrile). In the sample preparation process for MALDI, other solvents were employed to try dissolving the cucurbit[n]uril mixture with poor results. The addition of formic acid to deionized water was important to achieve satisfactory dissolution of the cucurbit[n]uril compounds and to assure its compatibility with the matrix. To acquire the corresponding mass spectra, a MALDI-Time-of-Flight Mass Spectrometer (MALDI-TOF MS) was used, which was built in the Departamento de Física at EPN. The mass spectra of the detected cucurbit[n]uril ions were characterized by the presence of the single protonated peaks of three molecular species corresponding to n=6,7,8 as inferred from their m/z values. Additionally, the mass spectra contained abundant peaks of the MALDI matrix in the mass region up to 500 Da. The mass spectra were satisfactorily internally calibrated with the help of multiple peaks of a PEG600 polymer that was introduced as an internal standard in the sample. The instrumental molecular mass resolution allowed for isotopical resolution over the whole mass range and the overall mass accuracy was about 0.1 %. The most intense signal among the cucurbit[n]uril peaks was assigned to the cucurbit[7]uril compound. A discussion is advanced to rationalize the observed molecular cucurbit[n]uril species under the used methodology.

Keywords. cucurbit[n]uril, glicoluril, MALDI, alpha-cyano-4-hydroxy cinnamic acid, TOF MS

Resumen

La caracterización de una mezcla de cucurbit[n]uriles (n=6,7,8) se ha realizado por medio de espectrometría de masas con la técnica de ionización MALDI (Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization). Los cucurbit[n]uriles fueron sintetizados como parte de una investigación de química supramolecular dentro del Departamento de Química e Ingeniería Química de la USFQ. Para el análisis con MALDI se ha introducido un procedimiento adecuado para la preparación de muestras, que incluye la disolución efectiva de la mezcla sólida de cucurbit[n]uriles en una solución de agua y ácido fórmico, y el uso del ácido alfa-ciano-4-hidroxi-cinámico como matriz MALDI, en una solución 10g/l en 70:30 (v:v) de metanol y acetronitrilo. En el proceso de preparación de muestras para MALDI se intentó utilizar otros solventes para el cucurbit[n]uril con pobres resultados. La adición del ácido fórmico al agua desionizada fue importante para lograr la correcta disolución del compuesto y asegurar su compatibilidad con la solución de matriz. Para obtener los espectros de masas correspondientes se utilizó un espectrómetro de masas de tiempo de vuelo MALDI (MALDI TOF-MS) construido en el Departamento de Física de la EPN. Los espectros de masa de los cucurbit[n]uriles se caracterizaron por la presencia de los iones protonados con una carga de las especies moleculares correspondientes a n=6,7,8, según se infiere de los valores m/z medidos. Adicionalmente, los espectros de masa contuvieron picos abundantes de la matriz MALDI en la región de masas hasta 500 Da. Los espectros de masa se calibraron internamente de forma satisfactoria con la ayuda de os múltiples picos del polímero PEG600 que se introdujo como un estándar interno en las muestras. La resolución de masas instrumental permitió separar las componentes isotópicas a lo largo de todo el rango de masas y una precisión general en la determinación de la masa de alrededor de 0.1 %. La señal más intensa entre los cucurbit[n]uriles se la asignó al compuesto cucurbit[7]uril. Se hace una corta discusión tendiente a racionalizar la observación de las especies observadas con nuestra metodología experimental.

Palabras Clave. cucurbit[n]uril, glicoluril, MALDI, ácido alfa-ciano-4-hidroxi cinámico, TOF MS

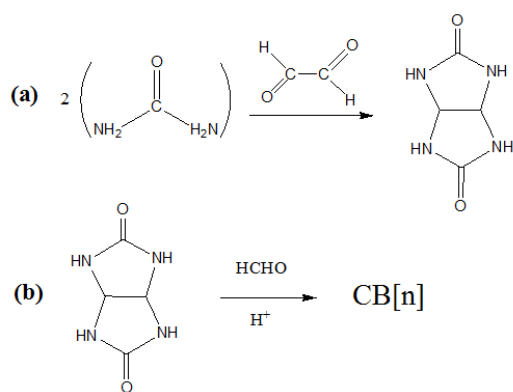


Figura 1: Síntesis de (a) glicoluril y (b) cucurbituriles

Introducción

Los cucurbituriles o cucurbit[n]uriles son cavitandos macrocíclicos que están compuestos por 5, 6, 7, 8 ó 10 unidades de glicoluril que se unen mediante puentes de metileno y se autoensamblan a partir de la reacción con formaldehído en medio ácido (Figura 1). Aunque la primera síntesis de estos compuestos se remonta a principios del siglo 20, no fue sino hasta 1981 que sus estructuras fueron elucidadas con certeza [1, 2, 3]. Usualmente, debido a la dificultad para pronunciar y escribir sus nombres, a los cucurbituriles se los representa como CB[n], donde n indica el número de repeticiones de las unidades de glicoluril. [1, 2, 4] Todos los cucurbituriles tienen una estructura cilíndrica angosta, que se asemeja a la corteza de una calabaza (de donde procede su nombre) donde sus partes superior e inferior han sido recortadas y el interior ha sido vaciado.

Entre estos compuestos macrocíclicos, el más común de la familia es el cucurbit[6]uril, CB[6], de fórmula empírica C₃₆H₃₆N₂₄O₁₂, masa molecular mono-isotópica de 996.294 g/mol y masa molecular promedio de 996.835 g/mol. La primera síntesis de este compuesto fue realizada por Mock et al mediante catálisis con ácido sulfúrico a temperaturas mayores a >110 °C, mientras que los isomorfos CB[n], n=5-8, 10 fueron preparados a temperaturas más bajas (75-90 °C). Ya que el tamaño de los CB[n] está definido por el número de unidades de glicoluril en la estructura, los volúmenes internos de estos compuestos varían entre 82³ en el caso del CB[5] a 870³ para el CB[10] [5, 6]. Este volumen interno, de características hidrofóbicas está centrado entre dos bordes hidrofílicos (uno superior y otro inferior) caracterizados por poseer grupos carbonilos que por su naturaleza polar pueden formar interacciones importantes con iones, moléculas huésped o con moléculas de solventes polares. Así, la familia de los CB[n] está asociada a una alta capacidad para interactuar con otros compuestos mediante fuerzas ion-dipolo y puentes de hidrógeno las cuales varían dependiendo del sitio de la molécula que se esté considerado (Figura 2). Por esta razón, los CBs tienen importantes aplicaciones industriales, tales como el ser agentes para el transporte de drogas dentro de organismos vivos, como filtros moleculares para

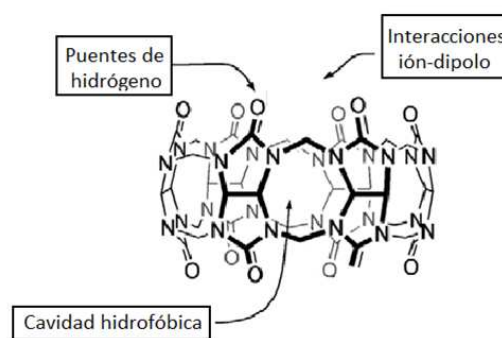


Figura 2: Posibles sitios de interacciones CB[6]

la purificación de gases o líquidos, como matrices para catálisis de reacciones químicas, como sensores para reconocimiento molecular, matrices de adsorción de agentes contaminantes, y como interruptores para máquinas moleculares [4, 5, 6, 7, 8, 9, 10].

Los grupos carbonilo que enmarcan los portales de CB[n] actúan como bases débiles, y como resultado de esto la solubilidad de los CB[n] se incrementa dramáticamente en soluciones ácidas concentradas o soluciones de acuosas de metales alcalinos. Sin embargo, la poca solubilidad en agua pura es un problema que limita la aplicación de estos compuestos. Así, el CB[6] y CB[8] son esencialmente insolubles, mientras que CB[7] y CB[5] tienen una modesta solubilidad (3×10^{-2} M) [11].

La caracterización molecular de los miembros de la familia de los cucurbit[n]uriles especialmente cuando se trata de evaluar la eficiencia y calidad los procesos de preparación es de importancia. El uso de la espectrometría de masas para este propósito tiene ventajas obvias, y la definición de los métodos analíticos correspondientes es una necesidad básica. Un sinnúmero de trabajos relacionados con el estudio estos compuestos mediante la técnica de ionización por electrospray ionization (ESI) se ha reportado en la literatura. Por otro lado, muy pocos esfuerzos se han reportado respecto del uso de la técnica de ionización MALDI para el análisis de cucurbituriles. Las condiciones de ESI permiten típicamente analizar complejos no covalentes de los cucurbituriles con moléculas orgánicas [11, 12]. En particular la ionización debida a la complejación con uno o varios cationes de sodio es la que se puede ver en el espectro [12].

La técnica MALDI se ha impuesto los últimos años como una técnica sensitiva, relativamente fácil de aplicar, que permite ionizar una multitud de compuestos. Los espectros de MALDI se diferencian de aquellos de ESI por su simplicidad relativa. En MALDI, en particular para masas debajo de los 1000 Da, se observan normalmente los picos de los iones protonados con una sola carga [M+H]⁺, aunque también son típicos los iones complejados con sodio y potasio correspondientes a [m + Na]⁺ y [M+K]⁺, respectivamente. En este sentido, conceptualmente, un espectro MALDI es mucho más sencillo de interpretar que uno de ESI. Como un

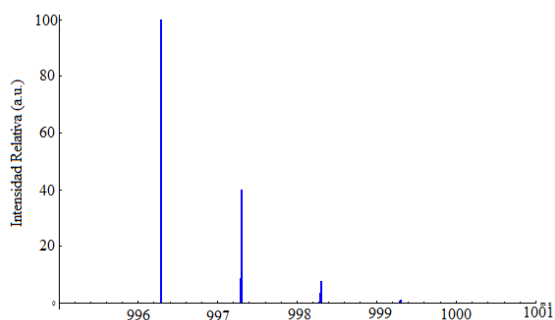


Figura 3: Distribución isotópica esperada de masas para CB[6] de acuerdo con su fórmula empírica

caso especial se puede mencionar a los polímeros que se ionizan casi únicamente por adición del catión de sodio, a diferencia de otras sustancias orgánicas como los péptidos.

La clave de la aplicación de MALDI al análisis está en la selección y el uso de la sustancia matriz, típicamente un ácido orgánico, que sirve como anfitrión de las moléculas de interés, y que absorbe la luz láser, se ablucciona e induce la formación de iones moleculares aislados del analito. Para la aplicación efectiva de la técnica se requiere 1) que las soluciones de matriz sean compatibles con las soluciones de los analitos, 2) que la solución de la mezcla cristalice eficientemente, y 3) que el compuesto matriz ionice efectivamente a los analitos.

MALDI puede acoplarse a un gran número de tipos de analizadores de masa, y en particular, es excepcionalmente compatible los llamados espectrómetros de masa por tiempo de vuelo (TOF-MS por sus siglas en inglés), tanto in vacuo como con el uso de fuentes de iones atmosféricas. Estos instrumentos muestran buena sensibilidad, un gran rango de masas y costo relativamente bajo. Como una ventaja adicional que se puede mencionar, para el rango de masas de hasta 1500 Da, un instrumento TOF-MS dotado de extracción retardada de iones y espejo electrostático, permite en general, alcanzar una resolución de masas isotópica. La distribución isotópica esperada del CB[6] se muestra en la Figura. 3. Las distribuciones isotópicas de los CB[7] y CB[8] tienen apariencias similares.

En este artículo se reporta la determinación mediante MALDI MS de la masa molecular de una mezcla de cucurbit[n]uriles preparado mediante el procedimiento reportado en la referencia [8].

Este trabajo se realizó en el marco de un taller de introducción a las técnicas de caracterización molecular por espectrometría de masas para estudiantes de ingeniería química realizado en Julio de 2011 en las instalaciones del Departamento de Física de la Escuela Politécnica Nacional, auspiciado por la red GET Nano. La muestra de cucurbit[n]uriles provista M.E. Dueñas y S. Manzano se preparó en el laboratorio de química inorgánica de la Universidad San Francisco de Quito.

Metodología

Síntesis de Glicoluril

Un balón de 250 mL fue cargado con una solución de urea (15.015 g, 0.25 mol) en agua (25.0 mL). A continuación se añadió una solución de glioxal al 40 % ac. (5.006 g, 0.08625 mol) y HCl concentrado (2.15 mL). Una vez terminada la adición se permitió que el balón se caliente lentamente (85-90° C) hasta que se detecte la formación de cristales blancos en el fondo del balón. Una vez enfriado el sistema, los cristales fueron recolectados por filtración y lavados con 50 mL de agua destilada seguido por 25 mL de acetona. Este procedimiento generó 3.99 g de producto seco, lo que implica un rendimiento del 79.8 % [13].

Síntesis de Cucurbit[n]uriles

Un balón de 250 mL fue cargado con glicoluril (1.5 g, 10.6 mol) y 6.9 mL de HCl al 36 %. A temperatura ambiente se añadió 1.5 mL de formaldehído. Después de un periodo de 10 minutos, se observó que la mezcla adquirió la apariencia de gel. Se dejó reposar la solución por 3 horas y posteriormente se calentó lentamente hasta 100° C para disminuir la viscosidad del gel. La mezcla se calentó posteriormente por 3 horas. Una vez terminado el tiempo de calentamiento se dejó enfriar el balón lentamente. El producto se aisló por precipitación añadiendo 10 mL de metanol. El precipitado se filtró y se lavó con metanol y acetona. [10]

Preparación de muestras para MALDI

El analito se preparó haciendo una solución de cucurbituril de 5 g/l en una mezcla de agua y ácido fórmico en una proporción 10:1 (v:v). Otros solventes más (agua desionizada pura, etanol, metanol) o menos polares (tolueno, benceno, cloroformo) se usaron en una fase inicial de prueba, sin gran éxito. El ácido α -ciano-4-hidroxi-cinámico (ac4hc) que se utilizó como matriz para MALDI se obtuvo de Sigma, al igual que los solventes usados. Una solución de 10 g/l de ac4hc se preparó en 70:30 metanol-acetonitrilo (v:v). Las muestras para MALDI se prepararon depositando sobre un porta-muestras de acero alcuotas de 1 μ l de las soluciones de cucurbituril y matriz. La mezcla se dejó secar bajo un flujo suave de aire caliente provisto por un secador convencional de pelo. Las muestras secas, fácilmente identificables por un depósito cristalino amarillento, se introdujeron en el espectrómetro de masas para análisis. En algunos casos, se introdujo en la solución de mezcla una alcuota de solución acuosa de PEG600 (Sigma). Esta sustancia se introdujo con la finalidad de tener un calibrante interno en los espectros de masas.

Espectrometría de masas

Las muestras preparadas se introdujeron con un porta-muestras adecuado en la fuente de iones del espectrómetro de masas. Este instrumento se construyó en casa,

en el Departamento de Física de la EPN, y permite obtener espectros de masa con una resolución en masa del orden de 7000, para una masa nominal de 1000 Da.

En este instrumento, un pulso láser de nitrógeno de 337 nm se enfoca desde el exterior de la cámara de muestras con una lente sobre la muestra. El impacto del pulso láser provoca la desorción y ionización del analito. Los iones resultantes se aceleran de una fuente con dos etapas de aceleración, separadas por mallas metálicas de 95 % de transparencia en una configuración Wiley y MacLaren. Luego de esto los iones se introducen en un tubo de vuelo sin campos eléctricos y viajan libremente desde la fuente de iones hasta el detector. El tiempo de vuelo de cada tipo de ion está relacionado con su masa molecular. Para mejorar la resolución instrumental, se utilizan dos técnicas en este instrumento, la extracción retardada y un espejo electrostático. La configuración y desempeño de este instrumento ha sido reportada anteriormente. [14, 15]

Los tiempos de vuelo en este instrumento se registran en un osciloscopio digital. Los espectros analizados consistieron de la promediación de cien espectros individuales obtenidos con sendos disparos del láser. Los espectros se calibraron externamente en primer lugar, para lo cual se utilizaron las dimensiones del instrumento, los valores de voltaje utilizados en las diferentes partes de la fuente de iones, y el retraso utilizado para la extracción retardada. Con estos valores y con ayuda de la ecuación de tiempo de vuelo, se pudo determinar un valor aproximado para la relación masa-carga (m/z) de los iones. Los picos correspondientes a los iones conocidos de la molécula matriz, y los de los cationes de sodio y potasio, una vez identificados a partir de la calibración inicial, se usaron para refinar la calibración. Los espectros se recalibraron finalmente una vez determinada la identidad de los iones del analito como una medida de consistencia y para mejorar la precisión la determinación de m/z . Con la resolución instrumental y este procedimiento de calibración se obtuvieron precisiones del orden del 0.1 %. La adquisición de los espectros y su análisis preliminar para determinar el tiempo de vuelo correspondiente se realizó con ayuda del programa de uso libre MoverZ, [16] y masspec desarrollado en la EPN. [15]

Resultados

Dos tipos de espectros de masas se obtuvieron a partir de sendas preparaciones para determinar la masa molecular, e inferir a partir de esta, la estructura de los sistemas sintetizados. En primer lugar se analizó cucurbit[n]uril mezclado con la matriz para identificar los picos correspondientes al compuesto. En el segundo tipo de espectro se incluyó además el polímero PEG600, el cual produce un gran número de picos en una distribución característica polimérica. Estos picos adicionales se usaron como calibrantes internos ya que su masa molecular es conocida. En ambos casos se identificó al

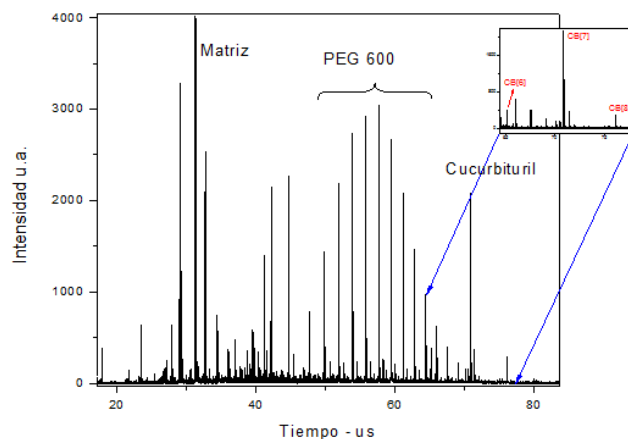


Figura 4: Espectro de masas MALDI de la mezcla analizada, en unidades de tiempo de vuelo (μs). Los picos de matriz son evidentes en las masas bajas hasta los 40-50 μs . Entre 50 y 70 μs , se observa una distribución característica de unidades poliméricas del PEG600. Alrededor de 70 μs los tres picos de cucurbit[n]uril son visibles (estos se destaca en el inserto).

compuesto de cucurbit[n]uril a partir de tres picos característicos desde los 1000 Da hasta los 1300 Da. En la Figura 4 se muestra un espectro del segundo tipo indicado, donde se puede ver la mezcla de iones moleculares de matriz MALDI, PEG600 y cucurbit[n]uril. De los tres picos principales correspondientes al cucurbituril, el de masa intermedia resultó ser el de mayor intensidad y por lo tanto, presumiblemente el de mayor concentración en la mezcla.

Una fuente de confirmación de la identidad de los compuestos de cucurbit[n]uril es el patrón isotópico de estos. Los patrones isotópicos correspondientes a los tres picos principales de los cucurbit[n]uriles determinados coinciden dentro de la resolución instrumental con los patrones simulados indicados en la Fig. 3. Esto se puede ver en la Figura 5 para el caso del pico más grande representativo del compuesto.

Calibración

Los espectros de masas fueron primeramente calibrados externamente, esto es, con ayuda de la ecuación de tiempo de vuelo calculada con los valores de las distancias para las diferentes partes del instrumento determinadas por el fabricante. Adicionalmente, es necesario incluir la información de las diferencias de potencial que se utilizan para acelerar los iones. Con estos parámetros se introduce del valor medido el tiempo de vuelo correspondiente a cada pico de interés en la ecuación de tiempo de vuelo y se obtiene su masa molecular. Este cálculo permite obtener valores aproximados para las masas de los compuestos observados con una precisión del orden de 1 %.

Con ayuda de las masas así determinadas, se pudo identificar un número de picos correspondientes a sustancias conocidas (la matriz y el PEG600). Estos picos se

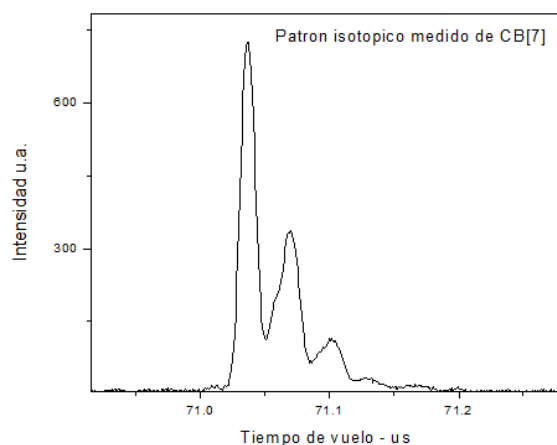


Figura 5: Detalle del pico correspondiente a CB[7] que muestra la distribución isotópica del compuesto, dentro de la resolución instrumental. La similitud de este patrón con el patrón teórico mostrado en la Fig. 3 es una confirmación independiente de la identidad de los compuestos CB[n].

resolvieron isotópicamente. La presencia del polímero PEG600 se reconoce por una distribución de masas correspondientes a unidades poliméricas con diferentes números de monómeros, alrededor de la masa 600 Da (lo que justamente sirve para denominar al compuesto). Las masas de los polímeros observados desde 10, hasta 22 monómeros corresponden al ión $[M+Na]^+$, en cada caso. La separación en masas entre esos picos es igual al valor de la masa del monómero de PEG, es decir 44.0262 Da.

A su vez, los picos de la matriz que se usan para calibración corresponden a los iones protonados molecular $[m+H]^+$ (190.17 Da) y del fragmento $[m-18+H]^+$ (172.17 Da). Asimismo, se pueden observar el ión correspondientes al radical $m\cdot$ (189.17 Da), al dímero molecular, y a otros iones típicos del ac4hca que se obtienen bajo las condiciones de MALDI.

Una vez identificados los picos de los calibrantes se procedió utilizar su masa molecular para calibrar internamente los espectros. La calibración interna permite obtener precisiones mucho mayores en el caso de calibración externa, en este caso de hasta 0.1 %. Esto se evidencia, por ejemplo en el caso del ión del polímero de PEG600 con 13 unidades (13-mero) sodiado, cuya masa teórica es 745.410 Da y cuya masa medida resulta ser 746.193 Da.

Del mismo modo, con la calibración interna se determinó que las masas de los tres iones moleculares de los cucurbit[n]uriles en el espectro de masas son de menor a mayor, 997.2 Da, 1163.9 Da y 1328.4 Da. De la estructura molecular conocida de estos compuestos se infiere que interesantemente estas masas corresponden a los iones ionizados por la adición de un protón es decir a la especie $[M+H]^+$, en cada caso (996.29 Da, 1162.155 Da, y 1328.02 Da). Esta situación es diferente a la reportada con ESI donde principalmente se observan iones sodiados $[M+Na]^+$ exclusivamente, [11, 12] lo cual

amerita un breve comentario. La diferencia podría adscribirse al hecho de que las condiciones de preparación de muestras con MALDI. En este caso estas condiciones parecen no favorecer la constitución de complejos no covalentes más complejos que el ión protonado como en el caso de ESI. La presencia de un medio ácido en la preparación de la muestra MALDI de los cucurbit[n]uriles ciertamente pone a disposición de las moléculas a ionizar un gran número de protones, lo que bajo estas condiciones podría inclinar la balanza hacia la complejación con protones libres en lugar de cationes como Na^+ .

Es importante en este resultado observar que si bien con el procedimiento experimental utilizado para preparar los cucurbit[n]uriles se obtiene una mezcla de CB[6], CB[7] y CB[8], el compuesto predominante en los espectros con buena diferencia es el de CB[7]. La abundancia relativa observada calculada comparando las alturas de los picos correspondientes a las tres especies es aproximadamente 18 %, 100 % y 13 %. Esto podría apuntar a que el procedimiento de preparación de la mezcla de cucurbit[n]uriles empleado tiene un rendimiento excepcional para la especie particular CB[7], comparado con las otras dos. Sin embargo, eventualmente, también podría deberse a una mucho mayor solubilidad relativa de esta especie en particular en los solventes usados para preparar las muestras para MALDI. Por otro lado, la eficiencia de ionización bajo las condiciones de MALDI podría ser diferente para los diferentes compuestos CB[n], aunque presumiblemente, este sería en cualquier caso un efecto menor. Las abundancias indicados no deben tomarse por lo tanto, directamente como valores absolutos sino como una medida aproximada de la presencia molecular relativa en la mezcla, debido a los inherentes problemas de cuantificación con MALDI MS. Sin embargo, estos valores dan una buena idea relativa de la situación real y por lo tanto, la metodología empleada, podría usarse para hacer confiablemente la monitorización (control de calidad) de los procesos químicos de preparación de estos compuestos.

Conclusiones

Se ha reportado la preparación de una mezcla de cucurbituriles y su análisis por medio de espectrometría de masas MALDI. Con la determinación de la masa molecular de los iones generados, se infiere la presencia en la mezcla de las especies químicas correspondientes a CB[6], CB[7], y CB[8]. Las metodologías tanto de la preparación de los compuestos como de preparación de muestras para MALDI y del análisis de los mismos resultaron ser exitosas. La evaluación de la intensidad relativa de los picos correspondientes en el espectro de masas permite concluir que el método de preparación de los compuestos empleado en este trabajo favorece la aparición de CB[7] sobre CB[6] y CB[7] en tasas de entre 5 y 6 a 1. La relevancia de las diferencias en solubilidad en el solvente usado y de la eficiencia de ionización de los compuestos con MALDI se discute brevemente.

Este trabajo ha sido el resultado de una colaboración académica en la que se demuestra que el aporte de esfuerzos inter-institucionales con las facilidades existentes tanto en la EPN como en la USFQ permiten la formación de alto nivel académico y la producción de resultados de interés científico relevante.

Agradecimientos

Los autores agradecen el aporte de CEDIA a través de los programas CEPRA 2 y CEPRA 4 que ha permitido la financiación de los talleres de colaboración académica en los que se realizó este trabajo.

Referencias

- [1] Lagona, J., Mukhopadhyay, P., Chakrabarti, S., and Isaacs, L. 2005. "The cucurbit[n]uril family." *Angew. Chem.* 44, 4844–4870.
- [2] Mock, W. L. 1995. "Cucurbituril." *Top. Curr. Chem.* 175, 1–24.
- [3] Freeman, W., Mock, W. L., and Shih N. Y. 1981. "Cucurbituril." *J. Am. Chem. Soc.* 103, 7367–7368.
- [4] Diederich, F., Stang P., and Tykwinski R. 2008. "Modern supramolecular chemistry: strategies for macrocycle synthesis" *Modern Supramolecular Chemistry*.
- [5] Cintas, P. 1994. "Cucurbituril: Supramolecular perspectives for an old ligand." *J. Inclusion Phenom. Mol. Recognit. Chem.* 17 205–220
- [6] Mock, W. L. 1996. "Cucurbiturils- a New Family of Host Molecules" *Comprehensive Supramolecular Chemistry*. 2 477
- [7] Mock, W. L., Irra, T., Wepsiec, J., and Adhya, M. 1989. "Catalysis by cucurbituril. the significance of bound-substrate destabilization for induced triazole formation." *J. Org. Chem.*
- [8] Mock, W. L., Irra, T., and Wepsiec, J. 1983. "Cycloaddition induced by cucurbituril. a case of Pauling principle catalysis." *J. Org. Chem.* 48, 3619–3620.
- [9] Kim, K., Selvapalam, N., Ho, Y., Park, K., Kim, D., and Kim, J. 2007. "Functionalized cucurbiturils and their applications." *Chem. Soc. Rev.* 36, 267–279.
- [10] Day, A., Arnold, A., and Blanch, R. 2004. "Cucurbituril and method for synthesis." *US Patent 6*.
- [11] Zhang, H. "Characterization of Cucurbituril Complex Ions in the Gas Phase Using Electrospray Ionization Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry" *PhD thesis Brigham Young University* 2006.
- [12] Da Silva, J., Jayaraj, N., Jockusch, S., Turro, N., and Ramamurthy, V. 2011. "Aggregates of cucurbituril complexes in the gas phase." *Organic Lett.* 13, 2410–2413.
- [13] Issacs, L. 2011. "The mechanism of cucurbituril formation." *Isr. J. Chem.* 51, 578–591.
- [14] Costa-Vera, C. 1999. "PhD thesis." *Escuela Politécnica Nacional*.
- [15] Santacruz, C. 2006. "PhD thesis" *Escuela Politécnica Nacional*.
- [16] 2011. Genomics solutions, m/z. <http://bioinformatics.genomicsolutions.com/moverz.html>