

UNIVERSIDAD DE GRANADA

FACULTAD DE CIENCIAS

Departamento de Química Analítica

Grupo de investigación FQM-297 "Control Analítico, Ambiental, Bioquímico y

Alimentario"

TESIS DOCTORAL

**MATERIALES NANOESTRUCTURADOS DE ÚLTIMA
GENERACIÓN PARA LA DETECCIÓN ÓPTICA Y EL
RECONOCIMIENTO SELECTIVO DE MOLÉCULAS
DE INTERÉS BIOLÓGICO Y AMBIENTAL**

Ángel Valero Navarro

Granada, Marzo 2011

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Ángel Valero Navarro
D.L.: GR 2106-2011
ISBN: 978-84-694-2957-0



UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTA DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA

**MATERIALES NANOESTRUCTURADOS DE ÚLTIMA GENERACIÓN
PARA LA DETECCIÓN ÓPTICA Y EL RECONOCIMIENTO SELECTIVO
DE MOLÉCULAS DE INTERÉS BIOLÓGICO Y AMBIENTAL**

*Memoria presentada por Ángel Valero Navarro
para optar al grado de Doctor Europeo en Química.*

Granada, 1 de marzo de 2011

Ángel Valero Navarro

LOS DIRECTORES DE LA TESIS

Dr. D. Alberto Fernández Gutiérrez
Catedrático de Universidad
Departamento de Química Analítica

Dr. D. Jorge Fernando Fernández Sánchez
Profesor Titular de Universidad
Departamento de Química Analítica

Dr. D. Antonio Segura Carretero
Catedrático de Universidad
Departamento de Química Analítica

Esta tesis doctoral ha sido realizada con la ayuda de una beca predoctoral del Programa de Formación del Profesorado Universitario, concedida por el Ministerio de Educación y Ciencia (AP2006-01147) y a la financiación con cargo a fondos del grupo FQM-297 “Control Analítico, Ambiental, Bioquímico y Alimentario” del Plan Andaluz de Investigación de la Junta de Andalucía procedentes de diferentes contratos, proyectos y subvenciones de la Administración central y autonómica, plan propio de investigación de la UGR, así como de empresas interesadas en los resultados de nuestra investigación.

ÍNDICE

OBJETO Y JUSTIFICACIÓN	21
RESUMEN	25
SUMMARY	28
INTRODUCCIÓN	33
NANOCIENCIA Y NANOTECNOLOGÍA ANALÍTICAS	33
1. Alcanzar el nanotamaño.....	35
2. Los nanomateriales en el proceso analítico	36
SENSORES QUÍMICOS	39
1. Componentes básicos de un sensor químico	41
2. Clasificación de los sensores químicos	43
3. Importancia y actualidad de los sensores	45
SENSORES ÓPTICOS	51
1. Ventajas e inconvenientes de los sensores ópticos.....	52
2. Clasificación de los sensores ópticos.....	55
3. Sensores tipo célula de flujo (Optosensores).....	59
4. Sensores tipo sonda (Optodos)	65
5. Fases sensoras y mecanismos de reconocimiento	72
NANOTECNOLOGÍA Y CIENCIA DE LOS MATERIALES APLICADAS AL DESARROLLO DE FASES SENSORAS ÓPTICAS Y NUEVOS MATERIALES ... 75	
1. Óxidos metálicos nanoestructurados.....	76
2. Polímeros de Impronta Molecular (MIPs).....	79
2.1. Introducción histórica y generalidades.....	79
2.2. Polimerización orgánica: nacimiento y breve descripción general.....	86
2.2.1. Monómeros y polímeros: descripción general	88
2.2.2. Moléculas ramificadas, entrecruzadas y reticuladas. Termoplásticos y termoestables	89
2.2.3. Copolímero. Descripción general	91
2.3. Reacciones de polimerización. Clasificación histórica.....	92
2.4. Reacciones de polimerización. Clasificación actual	94
2.4.1. Polimerización por etapas	95

2.4.2. Polimerización en cadena	99
2.4.3. Cinética de la polimerización radical	103
2.4.4. Velocidad de reacción en la polimerización radical	110
2.4.5. Peso molecular y factores que afectan a su distribución	112
2.4.6. Inhibición y retardo en la polimerización radical	118
2.5. Copolimerización radical	120
2.5.1. Introducción	120
2.5.2. Modelo terminal	123
2.5.3. Tipos de copolimerizaciones	126
2.5.4. Variación de la composición con la conversión	129
2.6. Vías para la síntesis de MIPs	133
2.7. Técnicas para la síntesis de MIPs	136
2.7.1. Polimerización en masa	136
2.7.2. Polimerización en disolución	137
2.7.3. Polimerización por precipitación	140
2.7.4. Polimerización por dispersión	143
2.7.5. Polimerización en suspensión	144
2.7.6. Polimerización en miniemulsión	145
2.7.7. Polimerización por implantación (grafting imprinting)	146
2.7.8. Polimerización jerarquizada (hierarchical imprinting)	148
2.8. Caracterización química de los MIPs	149
2.9. Caracterización morfológica de los MIPs	150
2.10. Caracterización de los distintos sitios de enlace en MIPs	151
2.10.1. Origen de la heterogeneidad en MIPs	152
2.10.2. Influencia de la heterogeneidad	154
2.10.3. Forma de la distribución heterogénea de sitios de unión en MIPs	154
2.10.4. Métodos experimentales para la caracterización de la heterogeneidad y las propiedades de enlace de un MIP	156
2.10.5. Modelos de adsorción. Generalidades	159
2.10.6. Modelos de distribución discreta	161
2.10.7. Modelos de distribución continua	163
3. Materiales nanoestructurados híbridos Orgánicos-Inorgánicos	171

3.1. Nanopartículas magnéticas entrecruzadas preparadas mediante polimerización en miniemulsión en dos pasos	172
3.2. Polímeros de impronta molecular magnéticos	173
BIBLIOGRAFÍA.....	175
PARTE EXPERIMENTAL	191
BI. TEST RÁPIDO Y SENCILLO PARA LA DETECCIÓN DE HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS (HAPs) EN AGUAS DE LA ANTÁRTIDA.....	195
BI.1. Test de screening. Generalidades y características.....	195
BI.2. Generalidades de los HAPs.....	197
BI.3. Carcinogénesis de los HAPs	200
BI.4. Diseño del optosensor y sistema de medida.....	203
BI.5. Objetivos del bloque I	205
BI.6. Capítulo del bloque I	205
BI.7. Capítulo 1: <i>Rapid, sensitive screening test for polycyclic aromatic hydrocarbons applied to Antarctic water.</i>	213
BI.8. Conclusiones del bloque I.....	215
BI.9. Bibliografía del bloque I	216
BII. DISEÑO Y SÍNTESIS DE MIPs PARA LA DETERMINACIÓN DE MONOAMINO NAFTALENOS EN AGUA.....	221
BII.1. Monoamino naftalenos. Generalidades, toxicidad e impacto ambiental. 221	
BII.2. MIPs magnéticos microparticulados.....	225
BII.3. Caracterización óptica de los MIPs magnéticos sintetizados.....	229
BII.4. Objetivos del bloque II	231
BII.5. Capítulos del bloque II.....	232
BII.6. Capítulo 2: <i>The development of a MIP-optosensor for the detection of monoamine naphthalenes in drinking water</i>	233
BII.7. Capítulo 3: <i>Chemometric-assisted MIP-optosensing system for the simultaneous determination of monoamine naphthalenes in drinking waters</i>	249
BII.8. Capítulo 4: <i>Synthesis of a novel polyurethane-based-magnetic imprinted polymer for the selective optical detection of 1-naphthylamine in drinking water</i>	259
BII.9. Conclusiones del bloque II.....	281
BII.10. Bibliografía del bloque II	283

BIII. DISEÑO Y SÍNTESIS DE UN MIP PARA EL RECONOCIMIENTO SELECTIVO DE ÁCIDO CAFÉICO	287
BIII.1. El ácido caféico: un compuesto fenólico	287
BIII.2. Objetivo del bloque III	290
BIII.3. Capítulo del bloque III	291
BIII.4. Capítulo 5: <i>Synthesis of caffeic acid molecularly imprinted polymer microspheres and HPLC evaluation of their sorption properties</i>	293
BIII.5. Conclusiones del bloque III	313
BIII.6. Bibliografía del bloque III	314
BIV. FASES SENSORAS NANOESTRUCTURADAS BASADAS EN FTALOCIANINAS DE HIERRO (FePc) PARA LA DETERMINACIÓN ÓPTICA DE NO₂	319
BIV.1. Importancia en la detección de NO₂	319
BIV.2. Ftalocianinas de hierro (FePc). Generalidades y propiedades ópticas	321
BIV.3. Generación de las membranas sensoras	325
BIV.4. Sistema de medida	327
BIV.5. Objetivos del bloque IV	329
BIV.6. Capítulos del bloque IV	330
BIV.7. Capítulo 6: <i>Iron-phthalocyanines complexes immobilized in nanostructured metal oxide as optical sensors of NO_x and CO: NMR and photophysical studies</i>	331
BIV.8. Capítulo 7: <i>Octahedral iron (II) phthalocyanines complexes: multinuclear NMR and relevance as NO₂ chemical sensors</i>	339
BIV.9. Conclusiones del bloque IV	369
BIV.10. Bibliografía del bloque IV	369
CONCLUSIONES GENERALES DE LA TESIS	375
MAIN CONCLUSIONS	378

OBJETO Y JUSTIFICACIÓN

OBJETO Y JUSTIFICACIÓN

El objeto de la presente memoria es el desarrollo de materiales nanoestructurados de última generación para la detección óptica y el reconocimiento selectivo de moléculas de interés biológico y ambiental.

El avance y desarrollo experimentado en los últimos años en el campo de la Nanociencia y la Nanotecnología ha permitido un notable crecimiento tecnológico en otras ramas de la ciencia que crecen paralelamente y con las que hay establecidas importantes relaciones sinérgicas. Este es el caso de la Química Analítica, cuyas fructíferas y simbióticas relaciones con estas disciplinas han propiciado el nacimiento de nuevas áreas del conocimiento como es el caso de la Nanociencia y Nanotecnología Analíticas. El diseño y síntesis de nuevos materiales con propiedades físico-químicas a la carta y la capacidad de procesarlos a escala micro y nanométrica ha permitido desarrollar sofisticados y robustos sistemas de detección y reconocimiento molecular de fácil aplicabilidad y que han dado solución a problemas analíticos complejos. En este contexto uno de los roles de la Química Analítica es la consideración de las nanopartículas y el material nanoestructurado como herramientas para la innovación y mejora de los procesos de medida.

En la presente memoria se pretende profundizar en la comprensión básica de los procesos y técnicas que permitan obtener materiales nanoestructurados de muy diversa naturaleza con el fin de poder aplicarlos de forma satisfactoria en la resolución de diversos problemas analíticos. Al comienzo del desarrollo de esta tesis se comenzó trabajando en el diseño de optosensores convencionales utilizando para ello resinas comerciales como fases sensoras, que permitieran la retención de especies de interés analítico. Pronto se constataron las limitaciones, en cuanto a selectividad principalmente, que conlleva el uso de este tipo de resinas. Así, surge la necesidad de conocer y posteriormente aplicar, herramientas sintéticas que permitan el diseño de

materiales “a la carta” para conferir altas propiedades de selectividad a dichos materiales. De esta forma se pretende diseñar, sintetizar y utilizar experimentalmente materiales poliméricos nanoestructurados multifuncionales, como son los polímeros de impronta molecular (MIPs), que permitan reconocer de forma selectiva moléculas de interés ambiental y/o biológico. Debido a la versatilidad en el empleo de estos materiales, se pretende llevar a cabo su implementación como fases sensoras nanoestructuradas en el diseño de sensores ópticos, así como demostrar su efectividad como adsorbente selectivos en técnicas separativas. El aprovechamiento de conocimientos multidisciplinares resulta de gran importancia y permite la hibridación de este tipo de materiales para generar micro y nanopartículas orgánicas-inorgánicas, de tipo *core-shell*, con propiedades magnéticas. Este paso supone un salto cualitativo en la síntesis de MIPs y permite la detección óptica de moléculas de interés mejorando selectividad, sensibilidad, precisión y coste. Por último, nuestro objetivo es la inmovilización de diferentes complejos de ftalocianinas de hierro (FePc) en nanoestructuras de óxidos metálicos para llevar a cabo la detección óptica de NO₂. Se pretende demostrar, por un lado, que el uso de fases sensoras nanoestructuradas para este fin ofrece importantes ventajas, en cuanto a sensibilidad, selectividad y estabilidad, frente al empleo de las clásicas membranas poliméricas, y por otro lado, que el uso de complejos de FePc permite la detección selectiva, rápida y eficiente de NO₂.

RESUMEN-SUMMARY

RESUMEN

En esta memoria se presentan los resultados obtenidos durante la realización de la tesis doctoral titulada “Materiales nanoestructurados de última generación para la detección óptica y el reconocimiento selectivo de moléculas de interés biológico y ambiental”. La memoria de tesis se ha estructurado en dos partes: una introducción que recoge información sobre Nanociencia y Nanotecnología Analíticas y de cómo se pueden aplicar estas áreas a la síntesis de nuevos materiales que permitan reconocer, de forma selectiva, analitos de interés biológico y ambiental. Asimismo, y ya que la mayor parte del desarrollo de esta tesis se ha basado en el uso de sensores ópticos, está recogida una descripción sobre las diferentes modalidades en el diseño de este tipo de dispositivos y, de una forma más detallada, las diferentes vías, técnicas y conocimientos necesarios para llevar a cabo el diseño y síntesis de nuevos materiales y cómo pueden ser implementados como fases sensoras ópticas o como materiales adsorbentes para el reconocimiento molecular selectivo en el campo de las técnicas separativas; y una segunda parte, denominada parte experimental, donde se muestra la aplicación de los materiales descritos en la introducción para la resolución de diferentes problemas analíticos. Esta parte a su vez se divide en cuatro bloques y cada bloque está compuesto por uno o más capítulos (en total siete) donde se recogen los resultados experimentales obtenidos.

En el *primer capítulo* se describe el desarrollo de un test rápido y sencillo de screening para la detección de hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) de una forma fiable y con bajo coste en aguas de la Antártida. Para ello utilizamos un optosensor desarrollado por nuestro grupo de investigación que permite la detección fluorimétrica de benzo(a)pireno (BaP) (indicador de la presencia de otros HAPs) con un límite de detección de 3 ng l^{-1} . Tras llevar a cabo una puesta a punto del método, utilizando aguas dopadas artificialmente con BaP, posteriormente se ha aplicado a

aguas procedentes de diferentes puntos de la región antártica, detectando de forma exitosa los niveles de HAPs en las diferentes zonas chequeadas.

El *segundo capítulo* se centra en la síntesis de un polímero de impronta molecular (MIP) mediante la técnica de polimerización en disolución, que permita la detección y cuantificación por fluorescencia de 1-naftilamina (1-NA) y 2-naftilamina (2-NA) en aguas de consumo humano. El MIP ha sido caracterizado por diferentes metodologías para evaluar su capacidad de reconocimiento molecular, tras lo cual ha sido implementado como fase sensora en un optosensor convencional. La imposibilidad en la cuantificación individualizada de 1-NA y 2-NA se ha solventado mediante la cuantificación conjunta de ambos analitos.

El *tercer capítulo* versa sobre el empleo de técnicas quimiométricas para solventar las carencias del optosensor diseñado en el capítulo anterior y así poder resolver problemas identificados en dicho capítulo. Para ello se ha contado con la colaboración del Dpto. de Química Analítica de la Universidad de Rosario (Argentina). De esta forma, mediante el empleo de la quimiometría, se han logrado dos objetivos muy importantes: por un lado, se ha podido detectar y cuantificar individualmente 1-NA y 2-NA en mezclas de ambas, y por otro lado, ha sido posible la cuantificación individual de ambas especies, incluso en presencia del principal interferente identificado en el capítulo anterior.

El *cuarto capítulo* trata de la síntesis de un MIP magnético mediante polimerización por precipitación. Este MIP ha sido diseñado en base a los conocimientos adquiridos en los dos capítulos anteriores, para poder detectar selectivamente 1-NA en aguas de consumo humano con un límite de detección de 18 ng l⁻¹. La síntesis novedosa de este material permite obtener una estructura final microparticulada, en la que en el MIP se encuentra formando una capa externa para el reconocimiento selectivo, mientras que el interior está formado por nanopartículas

híbridas super-paramagnéticas. En este trabajo se pone de manifiesto la importancia que tiene una estructura bien organizada en el diseño de MIP magnéticos con propiedades adecuadas para ser utilizado como fase sensora óptica.

En el *quinto capítulo* se describe la síntesis por polimerización por precipitación de un MIP para la extracción selectiva del antioxidante ácido caféico. El material final, en forma de microesferas con una gran monodispersidad, ha sido evaluado mediante su uso como relleno en columnas HPLC, permitiendo la extracción de ácido caféico procedente de zumo de manzana de forma selectiva, sencilla, rápida y con bajo coste. La parte experimental de este capítulo se realizó durante una estancia en la Universidad de Strathclyde, Glasgow, R. Unido.

El *sexto capítulo* es una revisión bibliográfica, en forma de Highlight, en el que se recopila la investigación que ha sido desarrollada, durante los últimos años, por nuestro grupo de investigación en el desarrollo de fases sensoras basadas en la deposición de complejos de FePc sobre soportes nanoestructurados de óxidos metálicos, para la detección óptica de NO₂ y CO.

En el *séptimo capítulo* se describe la síntesis de nuevos complejos de FePc modificando la naturaleza de los ligandos que pueden unir para dar lugar a nuevos complejos octaédricos. La síntesis y caracterización estructural de los nuevos complejos se ha llevado a cabo en colaboración con el Departamento de Química de la Universidad de Almería. Estas nuevas FePc han sido depositadas sobre nanoestructuras de óxidos metálicos permitiendo detectar ópticamente y de forma exitosa, bajo niveles de NO₂ en aire. Además se ha mejorado tanto sensibilidad, como estabilidad térmica y temporal, con respecto a todos los resultados publicados con anterioridad.

SUMMARY

This report shows all the results obtained during the Doctoral Thesis entitled: "Latest generation nanostructured materials for the detection and molecular recognition of molecules of environmental and biological interest"

It has been divided in two wide sections; the first one is an introduction with information about Nanoscience and Nanotechnology and how these two knowledge areas can be applied to the synthesis of novel nanostructured materials. Since this thesis has been widely based on optical sensors, there is a big description and classification of this kind of devices. It is also described different ways of synthesis and development of the new nanostructured materials and how they can be implemented as optical sensing phases. Moreover, these materials can be exploited as sorbents in HPLC studies based on their molecular recognition properties.

The second section, called experimental section, shows the application of these techniques and materials to the resolution of different analytical problems. The experimental part has been divided into four sections and each section has been also divided in one or more chapters (seven chapters in total) which include the results obtained during the course of this thesis.

The *first chapter* describes the development of a rapid and sensitive screening test for the detection of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in Antarctic waters. We used an optosensors developed by our research group which allows the fluorescence detection of benzo(a)pyrene (BaP) (indicator of the presence of other PAHs) with a detection limit of 3 ng l⁻¹. After carrying out an overhaul of the method by using water artificially spiked with BaP, it has subsequently been applied to waters from different points of the Antarctic region, successfully detecting the levels of PAHs in the checked areas.

The *second chapter* is focused on the synthesis of a molecularly imprinted polymer (MIP) by solution polymerisation. It allows fluorescence detection and quantification of 1-naphthylamine (1-NA) and 2-naphthylamine (2-NA) in drinking waters. The MIP has been characterized by different methodologies for assessing the molecular recognition ability. Afterwards, it has been implemented as a sensing phase in a conventional optosensors. The inability of the individual quantification of 1-NA and 2-NA has been successfully resolved by the joint measurement of the two analytes.

In the *third chapter* we discuss the use of chemometric techniques with the previously designed MIP-optosensors, thus we can solve some of its problems. In this regard, we have had the cooperation of the Analytical Chemistry Department at the University of Rosario (Argentina). Thus, through the use of chemometrics, two very important objectives have been achieved: on the one hand, it was possible to detect and quantify 1-NA and 2-NA in a mixture of both and, on the other hand, it has been possible to get the individual quantification of both species, even in the presence of the main interference molecule identified in the previous chapter.

The *fourth chapter* deals with the synthesis of a magnetic MIP by precipitation polymerisation (mag-MIP). To synthesise mag-MIP we have based on the knowledge gained in the previous two chapters, in order to selectively detect 1-NA in drinking waters. The new synthesis of this material produces a final microparticled structure, in which the MIP is forming an outer layer for the selective recognition, while the interior is formed by hybrid super-paramagnetic nanoparticles. This paper highlights the importance of a well-organised structure in the design of magnetic MIPs with suitable properties to use them as optical sensing phases.

In the *fifth chapter* we describe the synthesis of a MIP by precipitation polymerisation for the selective extraction of the antioxidant caffeic acid. The final

material has been obtained in the physical form of well-defined microspheres. It has been evaluated through its use as sorbent in HPLC columns, allowing the extraction of caffeic acid from apple juice, in a selective, simple, fast and cheap way. The experimental part of this chapter was done during a stay at the University of Strathclyde, Glasgow, U.K.

The *sixth chapter* is a literature review, in the form of Highlight, which compiles all the research that has been developed by our group in the development of optical sensors, based on the deposition of iron phthalocyanines (FePc) complexes into nanostructured metal oxide supports, for the detection of NO₂ and CO.

The *seventh chapter* is focused on the synthesis of new FePc complexes (changing the nature of the ligands) to give rise to new octahedral complexes. The synthesis and structural characterization of the new complexes has been carried out in collaboration with the Department of Chemistry, University of Almería. This new FePc complexes have been deposited into metal oxide nanostructures allowing, in a successful way, the optical detection of low levels of NO₂ in air. It has also been improved both sensitivity and temporal and thermal stability with respect to all previously published results.

INTRODUCCIÓN

NANOCIENCIA Y NANOTECNOLOGÍA ANALÍTICAS

En 1959, el premio Nobel Richard P. Feynman introdujo por primera vez el concepto de Nanotecnología en su conferencia *“There’s Plenty of Room at the Bottom”*¹ (“Hay mucho espacio al fondo...”). Desde ese día ha habido un gran número de avances y desarrollos en el campo de la Física, la Biología y la Química, que han demostrado la idea de este visionario de manipular la materia a una escala extremadamente pequeña, al nivel de las moléculas y los átomos, es decir, a **“nanoescala”**.

Mientras que el significado de “Nanotecnología” varía de campo a campo de aplicación, e incluso de país en país, y se usa, de forma muy genérica, para definir todo aquello que es muy pequeño, la Nanotecnología se puede definir comúnmente como el entendimiento, control y reestructuración de la material en el orden de los nanómetros para crear materiales con nuevas propiedades y funciones asombrosamente novedosas.

La Nanotecnología no debe considerarse de forma aislada, ya que debe basarse en los progresos básicos de la Nanociencia a través de las interfases de la secuencia clásica: investigación, desarrollo e innovación. Los avances en este contexto se fundamentan en unas interfases (relaciones) fructíferas.

Nanociencia y Nanotecnología tienen como característica común el tamaño de sus objetos de aplicación, que están comprendidos en la denominada “escala nanométrica”: entre 1 y 100 nm. En esta escala nanométrica se encuentran por su tamaño, por ejemplo, las nanopartículas metálicas, poliméricas o híbridas, los puntos cuánticos (“quantum dots”), los dendrímeros y pequeñas moléculas, e incluso átomos aislados.

La Nanociencia tiene múltiples definiciones complementarias tales como: *“Es la ciencia de la síntesis, análisis y manipulación de materiales a nivel atómico o molecular, donde las características o propiedades físicas o químicas son sustancialmente diferentes a las presentadas por el mismo material a una escala mayor (micro o macro)”*², o simplemente: *“Es la ciencia basada en diversas estructuras de la materia que tienen dimensiones de una milmillonésima parte del metro”*².

Por otra parte, la Nanotecnología trata del diseño, caracterización y uso de estructuras de dispositivos y de sistemas cuya forma y tamaño se controlan en la nanoescala.

En esas definiciones se plasma el rol de la Química Analítica en este contexto con palabras propias de esta disciplina, como “análisis” y “caracterización”, por ejemplo, que resumen dos facetas clave de la relación entre la Química Analítica y la Nanociencia y Nanotecnología: la consideración de las nanopartículas y el material nanoestructurado como objetos (analitos) o como herramientas para la innovación y mejora de los procesos (bio)químicos de medida.

Un aspecto sustancial de la Nanociencia y la Nanotecnología es su carácter tanto multidisciplinar como transversal y convergente. En Nanociencia y Nanotecnología desaparecen las fronteras clásicas entre la Física, la Química y la Biología. Esto hace que contemplemos con nuevos ojos a las ciencias naturales. Físicos, químicos e ingenieros son los científicos y profesionales más directamente relacionados, pero debe constatarse también su convergencia con otras áreas tales como las Tecnologías de la Información y Comunicación (TICs), Biotecnología y Ciencia de los Materiales, entre otras muchas.

1. Alcanzar el nanotamaño

Los nanomateriales pueden tener un origen natural, es decir, existir en la naturaleza como tales, por ejemplo, coloides orgánicos, magnetita, aerosoles, óxidos de hierro, etc., pero la verdadera revolución nanotecnológica está basada en el reto de la fabricación y elaboración de productos a ese nivel. Las dos estrategias que pueden seguirse para alcanzar el nanotamaño de objetos o materiales nanoestructurados son las que se representan esquemáticamente en la Fig. 1:

- a) Estrategia “*top-down*” o “de grande a pequeño” basada en metodologías en las que se consigue el nanotamaño a partir de un macromaterial.
- b) Estrategia “*down-up*” o “de pequeño a grande”, que se basa en crear nanoestructuras complejas a partir de elementos funcionales atómicos o moleculares.

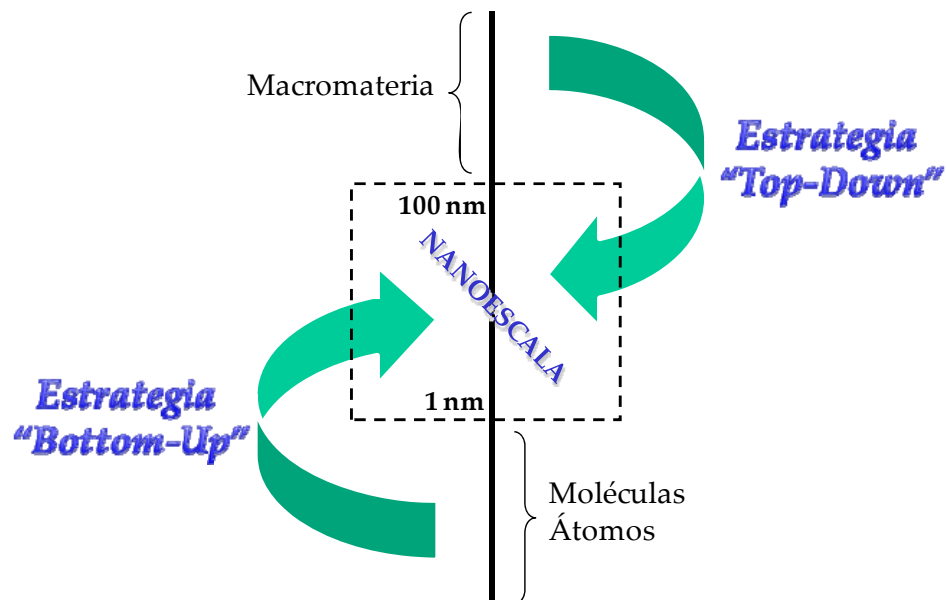


Fig. 1. Estrategias “*Top-Down*” y “*Bottom-Up*” para alcanzar el nanotamaño

No cabe duda de que los nanomateriales en su amplia variedad de opciones (puros/compuestos, nanopartículas/material nanoestructurado, nanocapas, etc.) son, en el momento actual, el campo de acción más relevante de la Nanoquímica y de la Ciencia de los Materiales. La síntesis, desarrollo y caracterización de nanomateriales es clave para otras áreas tales como la nanobiotecnología (nanomedicina), la energía, la nanoelectrónica, nanodispositivos, el desarrollo de sensores y nueva instrumentación. Las áreas de aplicación específicas son muy variadas: bienes de consumo, cosmética, impresión, empaquetado, catalizadores, agroalimentación, construcción, automoción, aeronáutica y sensores, entre otros.

2. Los nanomateriales en el proceso analítico

El empleo de nanopartículas supone actualmente más del 50% de las aplicaciones analíticas basadas en Nanotecnología². Generalmente, están implicadas en los denominados “sistemas analíticos nanotecnológicos” que son sistemas que explotan plenamente las propiedades excepcionales del material nanométrico (nanopartículas y material nanoestructurado) en el ámbito Químico-Analítico. Su empleo tiene como objetivo explotar características (ópticas, químicas, térmicas, magnéticas y otras) excepcionales de la nanomateria para el desarrollo de nuevos métodos, o mejorar los ya descritos en términos de incremento de las propiedades analíticas máximas (exactitud, representatividad), básicas (por ejemplo precisión, sensibilidad y selectividad) y productivas (rapidez, coste, riesgos, etc.)³.

Las nanopartículas o los materiales nanoestructurados pueden ser incorporados al proceso analítico de diversas formas:

- 1) Como tales, manteniendo su identidad individual o formando cúmulos⁴

- 2) Enlazados químicamente sobre una superficie.⁵
- 3) Incorporadas a un sólido inerte que, en su conjunto, toma la denominación de material nanoestructurado y es ampliamente usado en la fabricación de electrodos y fases sensoras.⁶
- 4) Funcionalizadas con compuestos inorgánicos, orgánicos y bioquímicos⁷.

El rol de las nanopartículas en el proceso analítico es muy variado y depende de su naturaleza y estado. Se usan fundamentalmente para el tratamiento de muestra, separaciones cromatográficas y electroforéticas y procesos de detección electroquímica, óptica, etc.

En la Fig. 2 se muestran de forma esquemática las nanopartículas más ampliamente usadas en Química Analítica, así como la extensión relativa en que las propiedades químicas, ópticas, eléctricas, térmicas y magnéticas son explotadas en cada caso².



Fig. 2. Nanopartículas más utilizadas en Química Analítica en la actualidad y la proporción relativa en que están involucradas las propiedades excepcionales de la nanomateria

SENSORES QUÍMICOS

De forma general, se puede denominar “**sensor**” a cualquier dispositivo robusto, de uso sencillo y preferiblemente portátil, capaz de transformar (transducir) la magnitud de un fenómeno cuya identificación resulta de interés en una señal física medible, proporcionando de forma directa y continua información de su entorno⁸. Estos dispositivos se pueden dividir en dos grupos en función de que detecten cambios en parámetros físicos (presión, temperatura, etc.) o bien parámetros químicos (pH, concentración de oxígeno, etc.). Los sensores físicos son sensores capaces de cuantificar fenómenos físicos y a los diseñados para medir especies (bio)químicas se les conoce como sensores (bio)químicos.

Resulta difícil dar una definición exacta y universal de lo que es un sensor químico. Según Roe y *col*⁹. un “sensor químico ideal” es un dispositivo capaz de detectar y/o cuantificar a tiempo real una especie química en un medio complejo (muestra de interés) a través de una interacción química selectiva.

La IUPAC propone otra definición según la cual un sensor químico es un dispositivo que transforma información química, variando desde la concentración de un componente específico de la muestra hasta el análisis total de su composición, en una señal analítica útil. La información química puede venir originada de una reacción química del analito o de una propiedad física del sistema investigado. Además, el sensor puede contener dispositivos que tengan las siguientes funciones: toma de muestra, transporte de muestra y procesamiento de señal y datos¹⁰.

Idealmente, un sensor químico debe operar de forma continua y reversible, directamente sobre la matriz de la muestra y debe tener la capacidad de proporcionar información sobre la distribución espacial y temporal de una especie molecular o iónica a tiempo real¹¹. Otras condiciones que idealmente debería cumplir un sensor

son las de ser portátil además de ser barato, tener mínimo mantenimiento y ser fácil de usar.

De hecho, el principal objetivo que se persigue con un sensor ideal es integrar dos de los tres pasos generales del proceso analítico (véase Fig. 3).

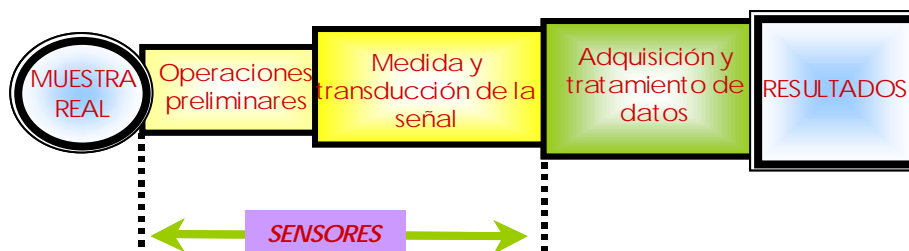


Fig. 3. Importancia de los sensores en el proceso analítico

Las prestaciones de un sensor son derivadas de criterios analíticos generales así como de requerimientos específicos como son la estabilidad a largo plazo, miniaturización, estabilidad mecánica, tiempo de respuesta, estabilidad con el tiempo, compatibilidad con la presión, temperatura, explosividad, radiactividad, condiciones biológicas y esterilización.

Sin embargo, muy pocos sensores cumplen todas las anteriores especificaciones de forma estricta. De hecho, numerosos autores denominan también sensores a ciertos diseños que no son capaces de medir de forma continua la concentración de ciertas especies, es decir, que son irreversibles y solo permiten una determinación. En este caso, hablamos de sensores “desechables o de un solo uso”⁸.

En determinadas ocasiones puede ocurrir que el sensor no sea lo suficientemente selectivo; en este caso, puede ser de gran ayuda la incorporación de alguna técnica simple de pre-tratamiento en línea con la detección, para separar el analito de las especies interferentes presentes en la muestra¹².

Así pues, en sentido amplio, podríamos acabar definiendo un sensor como cualquier dispositivo de uso sencillo que sea para los instrumentos de medida lo que los sentidos son para los seres vivos¹³, es decir, un sistema que proporcione una determinada respuesta a un estímulo exterior, respuesta que posteriormente es analizada y procesada.

1. Componentes básicos de un sensor químico

Un sensor químico capaz de informar sobre una especie química consta básicamente de tres partes^{10,14} (véase Fig. 4):

1. **Zona de reconocimiento o fase sensora:** en la cual se produce la interacción selectiva con el analito (o analitos) de interés, lo que origina un cambio del sistema cuya magnitud está relacionada con la concentración de la especie a determinar.

El receptor puede basarse en diferentes principios:

- *principio físico:* no se produce reacción química. Ejemplos típicos son aquellos basados en medidas de absorbancia, luminiscencia, índice de refracción, conductividad, temperatura, cambio de masa, etc.
- *principio químico:* una reacción química donde participa el analito que genera la señal analítica.
- *principio bioquímico:* un proceso bioquímico es la fuente que genera la señal analítica. Ejemplos típicos son los sensores potenciométricos microbianos o

los inmunosensores. Como hemos dicho anteriormente, éstos se consideran un subgrupo de los sensores químicos; son los llamados biosensores.

En ocasiones no es posible decidir inequívocamente si un sensor opera según un principio químico o físico; en algunos casos se da un proceso mixto: reacción química y principio físico medido. Este es, por ejemplo, el caso en el que la señal se deba a un proceso de adsorción.

2. **Transductor:** donde se transforma la energía que lleva la información química de la muestra en una señal analítica útil (se genera una señal óptica, eléctrica, etc.). El transductor, como tal, no muestra selectividad.
3. **Elemento electrónico:** de tratamiento y medida de señales eléctricas y que muestra los resultados.

La magnitud de la señal física obtenida se relaciona posteriormente con la concentración de analito a través de una curva de calibrado realizada previamente.

En resumen, un sensor consiste en una capa sensible o sistema de reconocimiento (receptor), un transductor para convertir la información química en una señal eléctrica y/u óptica y una electrónica para la evaluación de datos y aporte de resultados, normalmente integrada en el sensor

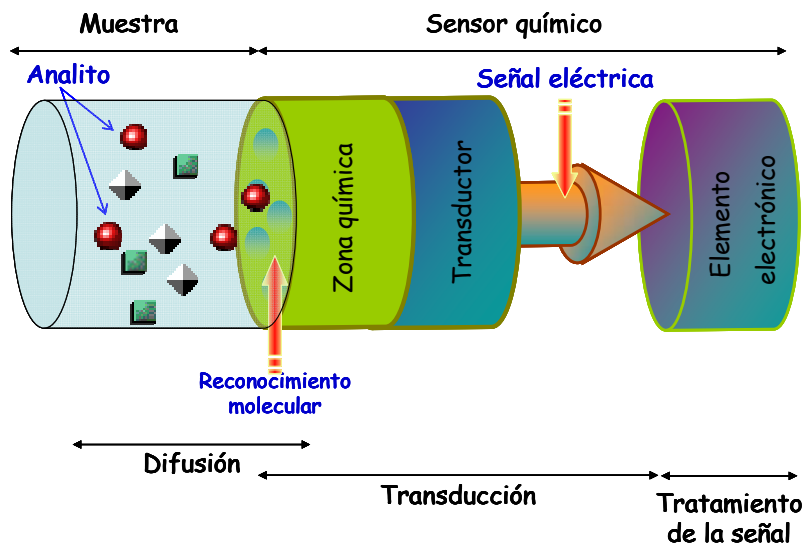


Fig. 4. Partes de un sensor químico

2. Clasificación de los sensores químicos

Se pueden establecer diferentes clasificaciones de los sensores utilizando diversos criterios. El gran interés que existe actualmente en el mundo de los sensores hace que éstos se encuentren evolucionando continuamente y por tanto, es seguro que irán apareciendo otras clasificaciones a medida que se desarrollen nuevos tipos de sensores.

Los criterios más utilizados y la clasificación de sensores correspondientes a cada criterio son los siguientes¹⁵:

- Atendiendo al modo de reconocimiento, los sensores pueden clasificarse en *sensores químicos o bioquímicos*. Cuando la etapa de reconocimiento se lleva a cabo mediante un elemento sensible biológico (por ejemplo, una enzima, un anticuerpo, una célula, etc.) el dispositivo resultante es conocido como biosensor. Así pues, la diferencia entre un sensor químico y un biosensor está

en la reacción (química o biológica) de reconocimiento del analito. Los sensores (bio)químicos han sido ampliamente utilizados para aplicaciones ambientales, clínicas, biológicas e industriales.

- De acuerdo con la naturaleza de la interacción medible los sensores se pueden clasificar en *reversibles o irreversibles*.
- Según su forma externa en *sensores tipo célula de flujo, tipo sonda o tipo microchip*.
- En función de la relación entre la zona de reconocimiento y el transductor, en *sensores conectados o integrados*.
- Teniendo en cuenta el modo de operación en *sensores de medidas discretas o de medidas de flujo (optosensores)*.
- Considerando el número de especies a determinar en *sensores simples o múltiples*, (monoparamétricos y multiparamétricos, respectivamente).
- Atendiendo a la naturaleza de la señal física que se genera y se mide, es decir, atendiendo al tipo de transductor, los sensores químicos se han venido clasificando en *sensores electroquímicos, ópticos, térmicos, piezoeléctricos, etc.*^{11, 16}.

Esta última clasificación, basada en la naturaleza de la señal que se genera o mide, es bastante general y ampliamente usada para clasificar los sensores químicos.

- Los sensores *electroquímicos* miden cambios en alguna propiedad eléctrica del sistema y ese cambio producido en las magnitudes eléctricas es proporcional a la concentración de analito. Así existen sensores

conductimétricos, potenciométricos, amperométricos, impedimétricos e ISFETs (transistores de efecto de campo).

- Los sensores *ópticos* son aquellos en los que se producen cambios en alguna propiedad óptica del sistema: transmitancia, transfectancia, optotérmicos, reflexión interna atenuada (ATR), cambio de índice de refracción, reflectancia (UV, NIR, IR), fluorescencia y fosforescencia (intensidad, tiempo de vida, atenuación), transferencia de energía, espectroscopía Raman, refractometría, turbidimetría, elipsometría, polarimetría o espectroscopía fotoacústica.
- Los sensores *térmicos* miden calores de reacción o cambios en la temperatura del sistema.
- Y los *piezoeléctricos* cuantifican cambios de masa, de viscosidad, etc.

También se han desarrollado otros sensores, aunque en menor medida, que utilizan otros tipos de detección, pudiendo citar: los de ondas acústicas de superficie y los magnéticos, en donde se utilizan medidas de paramagnetismo.

No existe, pues, un principio universal para el desarrollo de un sensor, ya que cada caso requiere una adaptación específica de un principio de medida.

3. Importancia y actualidad de los sensores

El desarrollo de sensores químicos es muy importante en campos tan variados como el de las ciencias de la salud, el ambiental, el industrial, el biotecnológico, la domótica, etc.

En el campo de la Química Analítica Clínica¹⁷⁻¹⁹, la posibilidad de miniaturización de los sensores ha dado muy buenos resultados, llegando a desarrollarse dispositivos muy económicos (desechables o reutilizables) que pueden ser separados del módulo principal. Así mismo, debido a su carácter miniaturizable y a su capacidad de medida continua e “in situ”, cada vez son más las investigaciones enfocadas al desarrollo de sensores ópticos con aplicaciones médicas capaces de ser usados directamente en humanos.

En el campo del control ambiental²⁰⁻²², el empleo de sensores constituye una herramienta muy útil en la identificación y cuantificación de contaminantes de forma remota y continua, dando información muy valiosa a la hora de llevar a cabo una estrategia adecuada para remediar los efectos de la contaminación en áreas contaminadas o en zonas con desechos peligrosos para la vida.

También se ha producido un importante incremento en la demanda de automatización en procesos industriales^{23, 24}. Las medidas de parámetros químicos son necesarias para seguir y controlar un proceso. Así, en la Química Analítica de procesos, los métodos para el análisis on line están basados en la disponibilidad de sensores químicos.

Los llamados paquetes inteligentes (*Intelligent Packaging*)²⁵ surgen como respuesta a las demandas cada vez más exigentes de los consumidores sobre los alimentos, con cada vez menos conservantes, con requerimientos legales cada vez más estrictos, en un mercado cada vez más globalizado y preocupado por la seguridad alimentaria y con la reciente amenaza del bioterrorismo en los alimentos^{26, 27}. Los paquetes inteligentes se pueden definir como sistemas que controlan las condiciones de los alimentos empaquetados para dar información sobre la calidad de esos alimentos durante su transporte y almacenaje. En este sentido, el desarrollo de sistemas sensores que determinen la calidad de los alimentos en términos de

frescura, deterioro microbiano u oxidación, se ha convertido en una tarea muy importante en la industria alimentaria. Las aplicaciones de los paquetes inteligentes en sistemas de trazabilidad y Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control (APPC-HACCP) también se han puesto de manifiesto.

Las demandas más importantes en la industria en cuanto a las características de los sensores son precio, robustez, estabilidad con el tiempo o con la temperatura, además de cumplir con una biocompatibilidad en procesos biotecnológicos.

Con respecto a este campo, los sensores ópticos han despertado un gran interés debido a que son dispositivos no invasivos o mínimamente invasivos, que no destruyen la muestra y, por tanto, su uso en este campo podría mejorar los dispositivos que se están utilizando en la actualidad. Principalmente, se puede decir que la aplicación estrella de los sensores ópticos en procesos biotecnológicos es el control de oxígeno en cultivos celulares así como directamente en el interior de las células, habiendo propuestas incluso para el uso de estos sensores en el tratamiento temprano contra el cáncer.

Otra de los últimos campos de gran aplicabilidad de los sensores químicos es la domótica. Cada vez la sociedad exige más sistemas de control de la calidad de vida en los hogares así como el disponer de dispositivos pequeños y automáticos que mejoren, sin un gran coste adicional, esta calidad de vida. En este campo, los sensores ópticos tienen mucho que decir debido a que son fácilmente miniaturizables y a que se pueden destinar al control de la calidad del aire, así como sensores tipo alarma que detecten posibles contaminaciones y/o fugas de gases nocivos para la salud humana.

El empleo de sensores químicos en todos estos campos puede dar lugar a resultados cuantitativos o semicuantitativos rápidos, en la propia matriz de la

muestra, es decir, in situ, reduciendo los costes de transporte y material de laboratorio, pues se minimiza el número de muestras requeridas en comparación con las necesidades para su análisis en el laboratorio, empleando los métodos clásicos para su confirmación. Además, la posibilidad de obtener medidas a tiempo real hace que su mayor campo de aplicación sea en aquellas situaciones en las que la muestra no se pueda llevar fácilmente al laboratorio y para análisis de rutina.

Los sensores químicos permiten realizar tres tipos de análisis que son aplicables al control analítico, dependiendo de las necesidades y que son: control continuo en línea a tiempo real (monitorización), control “alarma” regular y control ocasional discreto o al azar.

Hemos de resaltar que el éxito final de un sensor químico es su comercialización y venta, y para ello sus características de robustez, selectividad, sensibilidad, linealidad, inmunidad e interferencia y ausencia de efectos de matriz deben ser elevadas para poder competir con los análisis clásicos de laboratorio. Simultáneamente, su portabilidad, miniaturización y facilidad de uso son características muy importantes para su éxito comercial.

Después de aproximadamente dos décadas de investigación en la tecnología de los sensores, la mayor parte de los esfuerzos han dado como resultado únicamente curiosidades científicas en las universidades y en los institutos de investigación. En el presente, muy poco de la tecnología de éstos comparada con los cientos de diseños existentes, ha sido convertida en productos comerciales.

Varios son los obstáculos para su comercialización. En primer lugar, características tales como sensibilidad, intervalo lineal, reproducibilidad y estabilidad demostradas para los sensores a nivel de laboratorio no son lo suficientemente cercanas a las necesidades del usuario. Además, aún cuando se

logren valores óptimos, estas características se reducen drásticamente durante los distintos pasos en el desarrollo y producción en masa de un sensor. Por lo tanto, es importante investigar sobre el uso de nuevas fases sensoras que acerquen las características a las demandadas por la sociedad y que posean características químicas y físicas simples, que permitan el uso de tecnologías ya desarrolladas tanto como sea posible.

El segundo obstáculo es la necesidad de desarrollar sistemas integrados y de interfases. En el concepto de sensor es necesario tener en cuenta un paso posterior en el diseño de prototipos, y es que deben ser fácilmente utilizables por usuarios no habituales. Es decir, es necesario llevar a cabo el desarrollo de dispositivos simples, robustos, que necesiten de poco mantenimiento y que aporten la información justa y precisa que la sociedad demanda.

Y por último, el tercer gran obstáculo concierne a la competitividad del campo de los sensores. La comercialización se torna difícil o imposible si no se defienden las verdaderas ventajas que los sensores ópticos tienen sobre sus competidores basados en tecnologías ya desarrolladas y probadas.

Por todo ello, es necesario seguir investigando en este campo e invertir tiempo, esfuerzo y dinero en acercar las características de los sensores desarrollados en los laboratorios a las necesidades de la industria y/o la sociedad, demostrando sus ventajas frente a los dispositivos actuales así como minimizando o “enmascarando” sus deficiencias.

SENSORES ÓPTICOS

Los sensores ópticos se basan en la utilización de zonas de reconocimiento o fases sensoras químicamente activas y su implementación en dispositivos de medida, de tal forma que la interacción del analito a determinar con la fase sensora provoca un cambio en sus propiedades ópticas que es proporcional a la concentración del analito.

La importancia y el potencial de los sensores ópticos han ido en aumento durante los últimos años. Los primeros trabajos desarrollados sobre sensores para especies químicas se enfocaron desde una perspectiva electroquímica. No obstante, el gran volumen de conocimiento de que se dispone hoy día sobre métodos óptico-espectroscópicos y las amplias posibilidades que los mismos ofrecen, han dado lugar a la búsqueda e investigación en el campo de los sensores con detección óptica-espectroscópica^{28,29}.

La espectroscopía de emisión luminiscente ha desarrollado métodos caracterizados por su sensibilidad, selectividad y versatilidad; la industria de las telecomunicaciones ha logrado la comercialización de fibras ópticas de bajo coste que permiten transmitir luz y cubrir así largas distancias; se encuentran disponibles nuevas fuentes de radiación como láseres y diodos fotoemisivos (LEDs)³⁰ que permiten la excitación del analito prácticamente en todo el intervalo de longitudes de onda de la región visible; se han desarrollado fotodiodos y CCDs de bajo coste; y por último, nuevos métodos quimiométricos junto con microprocesadores de alta capacidad y pequeño tamaño permiten almacenar y procesar datos, aún en el caso de relaciones complejas de señal-concentración.

Así, la conjunción de las excelentes propiedades que ofrecen las fibras ópticas como vías de transmisión de luz a través de grandes distancias, el desarrollo

instrumental en el campo de la fotónica (láseres, LEDs, fotodiodos, CCDs, etc.), la aparición en el mercado de dispositivos baratos y de pequeñas dimensiones, los avances en computación (microprocesadores, redes neuronales, etc.), junto con la abundante información química cuantitativa y cualitativa que se puede obtener mediante técnicas analíticas espectroscópicas han llevado, en las últimas décadas, a un desarrollo espectacular de los sensores ópticos para el análisis y/o control de parámetros de interés químico, ambiental, clínico, etc.

Una de las ventajas que ofrecen los sensores ópticos es que para unir la zona de reconocimiento con los dispositivos de medida se pueden usar fibras ópticas. Podemos afirmar, por lo tanto, que el uso de fibras ópticas permite “acercar el espectrómetro a la muestra”, mientras que el empleo de fases sensoras inmovilizadas permite llevar a cabo medidas en la propia muestra, *in situ*.

Pero en los últimos años han aparecido sensores ópticos en los que no es necesaria la utilización de fibras ópticas, son los basados en el uso de microchip³¹⁻³⁴. En este caso, la fase sensora es inmovilizada directamente sobre el transductor o en un soporte inerte que se encuentra unido al mismo y que está integrado en el microchip donde están instalados la fuente de excitación y el sistema de detección. De esta forma, la respuesta del sensor es equivalente a los desarrollados haciendo uso de la fibra óptica pero simplificando su diseño y disminuyendo el tamaño.

1. Ventajas e inconvenientes de los sensores ópticos

En general, se puede decir que hay un elevado número de ventajas inherentes a los sensores ópticos que aconsejan el uso de los mismos frente a otros tipos de

sensores, particularmente los electroquímicos, sin que esto quiera decir que se menosprecien las importantes aplicaciones de éstos. Estas ventajas son:

- La señal óptica no está sujeta a interferencias eléctricas.
- No se requiere un sistema de referencia.
- No hay consumo significativo de analito por parte de la fase sensora, por lo que la muestra queda inalterada tras la medida.
- La fase activa no necesita estar en contacto con el sistema óptico. Esto simplifica extraordinariamente el desarrollo de sensores en los que la fase activa debe ser sustituida o reemplazada, lo cual resulta necesario cuando se desarrollan fases basadas en reactivos con vida limitada o en sensores de un solo uso (desechables).
- En algunos casos, utilizando un discriminador adecuado, es posible acoplar distintas fases ópticamente activas a un único sistema de transducción, lo cual da lugar a una importante disminución del coste y resulta una ventaja económicamente clara, pues es posible la realización del análisis rápido de diversos analitos con un mismo equipo.
- Son susceptibles también, de ser miniaturizados, permitiendo el desarrollo de sensores de fibra óptica o microchips muy pequeños y flexibles.
- Ofrecen la posibilidad de resoluciones a varias longitudes de onda e información temporal, pudiéndose aplicar también a técnicas de tiempo resuelto^{35,36}.
- Es posible desarrollar sensores ópticos para analitos que no pueden ser determinados por técnicas electroquímicas.

- En determinadas aplicaciones, como a la hora de realizar medidas biomédicas in vivo, los sensores ópticos son más seguros, evitándose el riesgo de un shock eléctrico.
- Algunos sensores ópticos pueden trabajar en intervalos de temperatura extremos lo que hace posible su esterilización a temperaturas elevadas.
- Parte de los sensores ópticos pueden ser esterilizados usando rayos gamma, lo que hace posible su utilización en biotecnología.
- Cuando se emplean sistemas de fibra óptica, es posible transmitir señales ópticas a grandes distancias, lo que permite realizar análisis en ambientes peligrosos (en ambientes radiactivos, en atmósferas contaminadas, a altas temperaturas o presiones, etc.) sin necesidad de recurrir previamente a la realización de la toma de muestra.

Sin embargo, los sensores ópticos también presentan algunas desventajas, tales como:

- ✘ La luz ambiental puede interferir en las medidas.
- ✘ La estabilidad temporal del sensor puede no ser elevada debido a la fotodescomposición de los reactivos usados.
- ✘ Los tiempos de respuesta pueden ser grandes, sobre todo en los casos en los que estén involucrados fenómenos de transferencia de masa.
- ✘ En general, los sensores ópticos presentan intervalos lineales menores que los electroquímicos.

- ✘ Y en muchos casos, existe una carencia de reactivos selectivos y que interaccionen reversiblemente con el analito. Además, habitualmente hay una pérdida de sensibilidad tras su inmovilización.

Estos problemas explican, en parte, la falta de éxito comercial hasta la fecha de los sensores ópticos y animan a un esfuerzo investigador continuado y ligado al trabajo conjunto de varias áreas³⁷.

2. Clasificación de los sensores ópticos

Son numerosas las clasificaciones propuestas de los sensores ópticos atendiendo a diversos aspectos¹⁵:

- **Según la naturaleza de la interacción con el analito**, se habla de sensores ópticos reversibles, cuando la interacción química del analito con la zona de reconocimiento del sensor es reversible; o sensores ópticos irreversibles, cuando la interacción es irreversible. Estos últimos se dividen, a su vez, en regenerables o reutilizables, siempre y cuando puedan volver a ser utilizados tras un tratamiento determinado; y no regenerables o desechables cuando resultan irrecuperables al realizar la medida y por tanto son de un solo uso.
- **Según su morfología**, los sensores ópticos pueden dividirse en tres amplios grupos:
 - Sensores tipo Célula de Flujo (**optosensores**). En este caso el sólido ópticamente activo se encuentra empaquetado en una celda de flujo que puede estar situada en el compartimiento de muestra del equipo o en el

exterior del mismo (en este caso será preciso utilizar fibras ópticas que permitan el transporte de la luz hasta el lugar de la medida).

En función de donde se localice la zona de reconocimiento podemos clasificar los sensores de flujo en dos tipos básicos¹⁵ (véase la Fig. 5):

- **Optosensor convencional**, donde la zona de reconocimiento está incorporada dentro de una célula de flujo especial que se encuentra en el compartimiento de muestra del instrumento.
- **Optosensor no convencional de fibra óptica**, donde la zona de reconocimiento está incorporada dentro de una célula de flujo que se sitúa fuera del instrumento. Para ello hay que usar fibra óptica para transportar la luz excitatriz desde el instrumento a la fase sensora y recolectar la emisión luminiscente, o bien se usa un microchip que albergue la fuente de excitación y el sistema de detección.

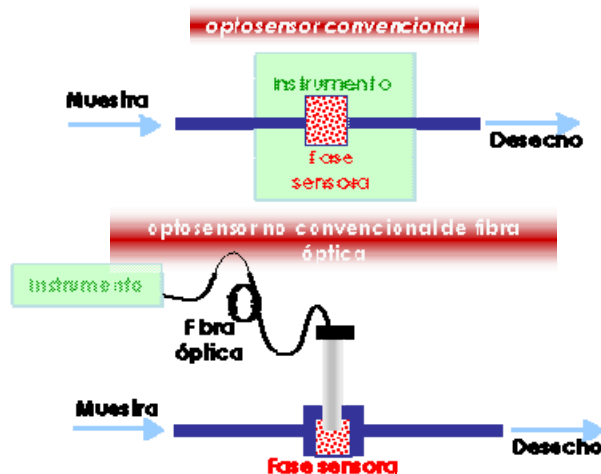


Fig. 5. Tipos básicos de sensores de flujo

- Sensores tipo sonda (**optodos**). Estos sensores están constituidos por una fase ópticamente activa situada en una guía de ondas, bien de morfología cilíndrica (fibra óptica) o bien de cualquier otra (por ejemplo, plana).
- Sensores tipo **microchip**. En ellos, la fase sensora se inmoviliza directamente sobre el transductor o sobre un soporte inerte que se alberga en un microchip que dispone de todo lo necesario para llevar a cabo la medida.

Los optodos y los sensores tipo microchip permiten su empleo tanto en discontinuo como en flujo, sin embargo los optosensores solo se pueden emplear en sistemas de flujo. Debido a su importancia y al hecho de que las fases sensoras generadas en esta tesis se han desarrollado con objeto de poder ser implementadas en optosensores y optodos, se discutirán éstos en el siguiente apartado.

- **Según la naturaleza del fenómeno óptico medido**, se puede hablar de sensores de absorbancia, luminiscentes (fluorescentes, fosforescentes, quimioluminiscentes, bioluminiscentes), etc.

En los sensores de absorbancia la relación entre la intensidad de la luz incidente y la luz reflejada están en directa relación con la concentración del analito a determinar. Estos sensores son sencillos y robustos, pero poco selectivos.

Dentro de los distintos mecanismos de transducción, los procesos fotoluminiscentes resultan particularmente atractivos para el desarrollo de sensores ópticos, ya que la radiación detectada puede ser diferenciada de la radiación incidente sobre la fase activa por su longitud de onda. Además, dan lugar a sistemas sensores altamente sensibles que permiten determinar muy bajos niveles de

concentración. Estas características hacen especialmente adecuado el uso de dichas técnicas fotoluminiscentes como técnicas de detección en el desarrollo de sensores químicos.

De las dos técnicas analíticas derivadas del fenómeno fotoluminiscente, la fluorimetría y la fosforimetría, la fluorimetría ha sido tradicionalmente la técnica empleada en el desarrollo de sensores ópticos luminiscentes. Sin embargo, es mucho menor el número de sensores fosforescentes a temperatura ambiente existentes. Esto se debe al escaso número de moléculas disponibles capaces de desarrollar fosforescencia. No obstante, en los últimos años la fosforescencia está cobrando cada vez más importancia como método de detección por las ventajas que presenta sobre la fluorescencia en el desarrollo de los sensores ópticos¹⁵:

- Es posible desarrollar instrumentación sencilla, empleando componentes electrónicos de bajo coste que permitan la medida de tiempos de vida de fosforescencia; todo esto está permitido por los largos tiempos de vida del estado triplete.
- Debido a que las posibles interferencias de emisiones fluorescentes residuales o luz dispersa pueden ser evitadas (usando un tiempo de demora adecuado tras la excitación con fuentes pulsadas), es posible obtener relaciones señal/ruido elevadas.
- La gran separación existente entre las longitudes de onda de excitación y emisión fosforescente hace que la discriminación entre ellas sea más fácil mediante el uso de sistemas de selección espectral de bajo coste.
- Se obtienen sistemas más selectivos, ya que la fosforescencia es un fenómeno mucho menos común que la fluorescencia.

Existen, sin embargo, algunas desventajas fundamentales:

- ✘ Se limita el uso de este sistema de detección fosforescente puesto que existen pocas moléculas que presenten emisión fosforescente.
- ✘ Será necesario desoxigenar las muestras para poder observar la emisión fosforescente del analito, ya que el oxígeno es un atenuador muy eficaz de la fosforescencia³⁸.

3. Sensores tipo célula de flujo (Optosensores)

Un sistema analítico convencional de flujo continuo comprende tres etapas: la transferencia de masa (analito) entre dos fases, las reacciones (bio)químicas y la detección continua en una celda de flujo convencional¹¹.

El dispositivo que realice simultáneamente la detección con la reacción y la separación en la celda de flujo puede considerarse formalmente como un optosensor, pues reúne sus cuatro características principales (responde directa, reversible, continua y rápidamente a variaciones en la concentración del analito de interés) de los sensores. Este término fue introducido por Ruzicka y Hansen³⁸ para definir un nuevo principio de detección en análisis por inyección en flujo basado en el cambio de las propiedades ópticas de una superficie activa situada en el paso de un flujo.

La realización simultánea de la etapa de retención del analito y del proceso de detección óptica en un sistema de análisis por inyección en flujo (FIA) constituye una vía de amplias posibilidades para la superación de muchos inconvenientes de los sensores ópticos^{39,40}.

Una metodología con las características de las técnicas FIA ofrece numerosas ventajas analíticas, entre las que se puede citar: fundamento sencillo, equipamiento de bajo coste, bajo consumo de muestra y reactivos, elevada frecuencia de muestreo y fácil automatización. El FIA se engloba dentro de los métodos cinéticos y por tanto presenta en general una mayor selectividad que las correspondientes técnicas manuales. La exactitud y la precisión son realmente sorprendentes a pesar de que se basa en medidas de sistemas en estado transitorio.

La técnica FIA consiste básicamente en una inyección o inserción directa de la muestra líquida en un flujo continuo y no segmentado. De este modo, la muestra es arrastrada a través del flujo del sistema, pudiendo tener lugar uno o varios procesos adicionales entre ésta y el fluido portador. La sustancia a analizar se hace pasar por un detector apropiado que permite realizar medidas en continuo, originando una señal transitoria que está relacionada con la concentración de la especie de interés. El grado de dispersión de la muestra es altamente reproducible estando controlado por factores tales como la velocidad de flujo, el diseño geométrico del sistema y la longitud y diámetro de los tubos.

Las condiciones experimentales de trabajo habitual en FIA originan una mezcla incompleta del bolo de muestra inyectado en el flujo portador. De ahí, que una característica fundamental de esta metodología sea que el tiempo de operación ha de ser muy reproducible por efectuarse las medidas en condiciones de no equilibrio. El tratamiento profundo de esta temática está ampliamente documentado en la bibliografía^{11,41}.

Finalmente, es de recalcar la casi universalidad del FIA dado que su carácter modular lo hace sencillo de adaptar a cualquier necesidad analítica concreta. Sin lugar a dudas, el gran desarrollo actual de esta técnica se debe a su excepcional versatilidad. Este tipo de sistema en flujo puede ser utilizado con éxito en el análisis

de rutina de un laboratorio. Un sistema FIA ordinario está constituido por al menos cuatro partes esenciales (Fig. 6):

- ◆ Unidad de propulsión, que impulsa un gas inerte o un portador a lo largo del sistema. Generalmente es una bomba peristáltica.
- ◆ Sistema de inyección, por donde se introduce la muestra. Generalmente es una válvula de cuatro o seis vías.
- ◆ Zona de reacción, donde puede o no existir alguna reacción adicional.
- ◆ Sistema de detección, donde se encuentra la celda de flujo.

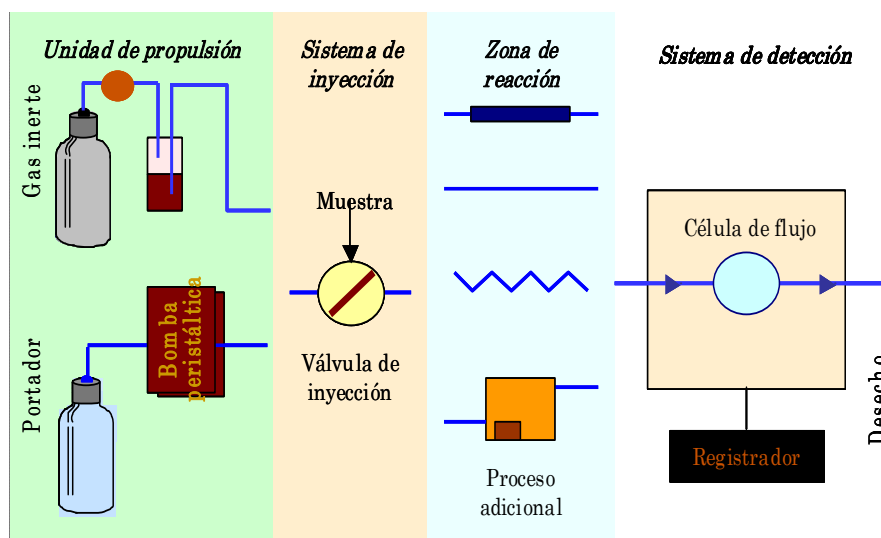


Fig. 6. Esquema general de un sistema FIA

El sistema FIA utilizado en esta tesis tiene una serie de particularidades y está constituido por una bomba peristáltica que impulsa a una disolución portadora, una válvula de inyección de muestra, una válvula de regeneración y un sistema de detección, que para optosensores convencionales es una cubeta de flujo situada en el compartimiento de muestra del espectrómetro de luminiscencia (Fig. 7).

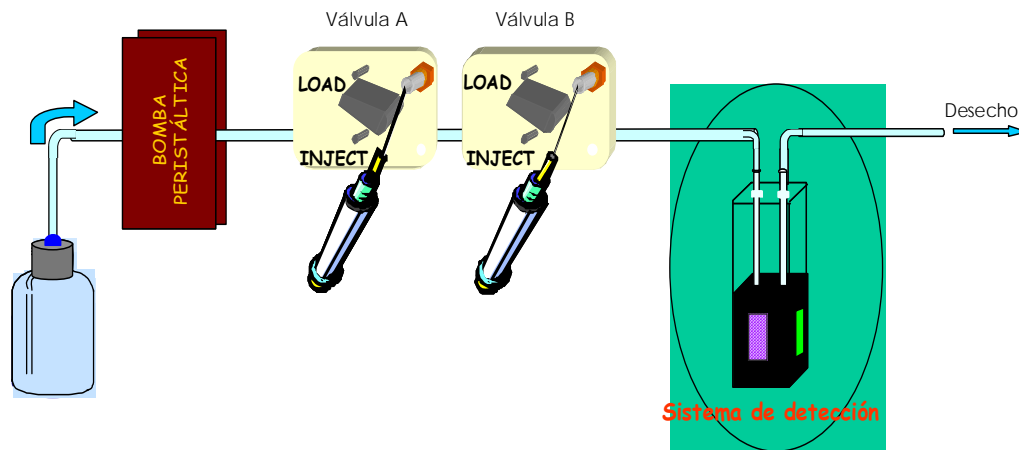


Fig. 7. Esquema del sistema FIA utilizado en esta tesis

Una de las características más relevantes de los sensores tipo célula de flujo es su total compatibilidad con sistemas FIA. Por lo que a las características intrínsecas de los sistemas de inyección en flujo (automatización, flexibilidad, acondicionamiento y calibrados de muestra sencillos, desarrollo previo de reacciones químicas, etc.) se suman las de la utilización de fases sensoras (selectividad, preconcentración del analito, etc.) que hacen posible su aplicación a muestras reales de todo tipo¹¹.

El acoplamiento con sistemas FIA puede ofrecer soluciones a algunos de los problemas de los sensores ópticos, tales como largos tiempos de respuesta marcados por lentos procesos de difusión del analito desde la muestra a la fase activa, que limitan la utilidad práctica de éstos. Así, los tiempos de respuesta pueden ser reducidos al incorporar un pequeño bolo de muestra en el flujo portador que va a interactuar con la fase sensora de forma transitoria. De igual manera, el tiempo de exposición se puede utilizar para realizar una discriminación cinética entre el analito y otras sustancias interferentes cuando éstas posean una velocidad de difusión diferente. Otro de los grandes aportes de estos sistemas FIA es su facilidad para

acoplar un sistema de regeneración de la fase sensora en el caso de irreversibilidad en la reacción de reconocimiento, de una forma simple y automática¹¹.

El empleo de fases sólidas para la detección en un sistema FIA ofrece, en principio, dos ventajas inherentes (propias del equilibrio heterogéneo líquido-sólido) cuando se compara con la utilización más convencional de fases líquidas que contienen el reactivo^{42, 43}:

1. La transferencia de masa radial en un reactor empaquetado es mucho más intensa que en un reactor hueco y, por tanto, la contribución de la difusión radial en el equilibrio sólido-líquido dentro del bloque es más eficaz.
2. El equilibrio líquido-sólido también tiene lugar en aquellos elementos de la muestra donde no hay dispersión, debido a que el mismo procede exclusivamente de la interfase sólido/líquido.

Las principales ventajas de tipo práctico que se pueden conseguir al introducir interfases sólidas en sistemas de análisis en flujo, son las siguientes¹¹:

- ◆ **Aumento de la sensibilidad** utilizando fases sólidas, ya que la sensibilidad de los sistemas de análisis en flujo puede incrementarse por:
 - *Preconcentración en línea o in situ*; es uno de los métodos más eficaces para aumentar la sensibilidad. Físicamente, la preconcentración puede conseguirse acoplando en el sistema en flujo una unidad adecuada de separación como puede ser una microcolumna con un relleno adecuado. Si la fase sólida se dispone en la célula de flujo de un detector óptico no destructivo se consigue un sistema particular de preconcentración in situ, que integra los procesos de retención y detección⁴⁴, y esto es lo que ocurre en los optosensores.

- *Disminución de la dilución*: históricamente, los primeros reactores sólidos utilizados en FIA fueron de naturaleza redox y de esta forma se evita la dilución correspondiente al empleo de un reductor adicional⁴⁵.
- *Aumento de la estabilidad de los reactivos*: las enzimas inmovilizadas sobre soportes adecuados suelen ser más estables que en disolución y se han utilizado ampliamente en sistemas de análisis en flujo tanto para determinar substratos^{46, 47}, como actividades enzimáticas⁴⁸.
- ◆ **Aumento de la selectividad** utilizando fases sólidas. Los métodos FIA son más selectivos que sus homólogos manuales puesto que al realizar las medidas sin llegar a condiciones de equilibrio se eliminan interferencias de especies que reaccionen más lentamente que el analito⁴⁹.

Los optosensores deben reunir una serie de características necesarias para un adecuado funcionamiento:

- ✚ El sistema debe ser reversible (o fácilmente regenerable si es irreversible).
- ✚ La cinética de los procesos que tengan lugar debe ser rápida.
- ✚ La fase de reconocimiento químico debe ser robusta.
- ✚ La zona sensora y el sistema de detección deben ser totalmente compatibles, lo cual no siempre es posible.

Como conclusión podemos señalar que los optosensores presentan una serie de ventajas como son:

- Una mayor sensibilidad al reducirse la dispersión de la muestra inyectada.

- Una mejora indirecta de la selectividad eliminando especies interferentes y señales parásitas a través de medidas cinéticas.
- Una sencilla regeneración de la fase sensora, de forma simple y automática, en el caso de irreversibilidad del mecanismo de reconocimiento.
- Una mejora de las características intrínsecas de los sensores derivadas del empleo de la técnica FIA como son: automatización, flexibilidad, acondicionamiento y desarrollo de métodos sencillos, desarrollo previo de reacciones químicas, etc.

Por el contrario, las mayores desventajas de los sensores de flujo son:

- ✘ La necesidad de un sistema para impulsar la muestra.
- ✘ La dificultad del análisis remoto a largas distancias y en micromuestras, que se reduce drásticamente en el caso de los optosensores de fibra óptica.
- ✘ La necesidad de que la zona sensible y el detector sean compatibles.
- ✘ La posibilidad de problemas si las cinéticas derivadas de los pasos de separación y reacción son demasiado lentas.

4. Sensores tipo sonda (Optodos)

El crecimiento de la fotónica y el abaratamiento de los componentes ópticos, han despertado un gran interés por la investigación y el desarrollo de sensores que usan fibra óptica²⁹.

Los sensores que usan fibra óptica han recibido la denominación de *optodos*⁵⁰ del griego “*οπτιχος*”: óptico y “*οδος*”: camino, u *optrodos* de “optical electrode”. Desde el punto de vista lingüístico es más correcto el término optodo, por ello es el que se usará a lo largo de esta memoria. Obviamente, en lo que se refiere a su principio de operación, son bastante diferentes de los electrodos, puesto que la señal es óptica y no eléctrica.

Un optodo es un dispositivo formado básicamente por una fase sensora o membrana ópticamente activa soportada sobre una guía de onda. La guía de onda más comúnmente usada para dispositivos sensores es aquella de morfología cilíndrica, es decir, la fibra óptica. De ahí que al hablar de optodos se haga referencia en la mayoría de los casos a los sensores de fibra óptica⁵¹⁻⁵⁴.

Sin embargo, existen optodos que usan guías de onda planas, dando lugar a los también llamados sensores planos o sensores tipo chip⁵⁵⁻⁵⁸.

Las ventajas principales que presentan los optodos frente a otro tipo de sensores son las siguientes^{29, 59-61}:

- ▶ A diferencia de los sensores potenciométricos, donde se miden diferencias absolutas entre dos potenciales, los optodos no precisan una señal de referencia.
- ▶ Son dispositivos pasivos formados por materiales dieléctricos, inertes químicamente en su mayoría, lo cual les confiere pasividad eléctrica y química. Se pueden emplear por tanto en ambientes hostiles, corrosivos, radiactivos, con riesgo de explosión, etc.

- ▶ Al ser la fibra óptica^{N. del A.} un medio dieléctrico, los optodos no se ven afectados por interferencias electromagnéticas, pudiendo utilizarse en medios altamente contaminados desde el punto de vista electromagnético, al contrario que los sensores eléctricos convencionales, muy sensibles a las mismas. En aplicaciones clínicas no representan un riesgo para el paciente ya que no se requiere una conexión eléctrica con el cuerpo, siendo especialmente útiles en radioterapia debido a su inmunidad a los campos electromagnéticos.
- ▶ La biocompatibilidad de la fibra óptica, la facilidad de realizar interfaces sencillas entre el sensor y la zona de medida facilita su empleo para la detección, medida y, a veces, actuación de/sobre variables biomédicas.
- ▶ Las pequeñas dimensiones de las fibras ópticas (con diámetros típicos comprendidos entre 50 y 200 μm) y la disponibilidad de componentes de pequeño tamaño y bajo coste permiten la miniaturización de estos dispositivos.
- ▶ Las fibras ópticas de bajas pérdidas permiten la transmisión de señales a largas distancias, típicamente 10-1000 metros, e incluso kilómetros si se utilizan amplificadores. Esto permite realizar análisis in situ en ambientes peligrosos como áreas radiactivas, entornos muy fríos o calientes y salas limpias, entre otros. Además, su empleo permite mayor flexibilidad espacial a la hora de utilizar otros instrumentos.
- ▶ Se pueden llevar a cabo análisis en tiempo real, ya que la primera etapa del proceso analítico, el muestreo, no es necesaria.

^{N. del A.} Se hablará de fibra óptica por ser el término más generalmente empleado, pero entiéndase que de forma general hablamos de guías de onda (tanto de morfología cilíndrica como plana).

- ▶ La capacidad de multiplexación, que permite que varios sensores compartan la misma fuente y el mismo detector, disminuyendo el coste y proporcionando la posibilidad de realizar grandes redes de sensores.
- ▶ Permiten realizar análisis no destructivos (ya que en la mayoría de los casos no se produce un consumo del analito), lo cual resulta crucial si se dispone de pequeñas cantidades de muestra.
- ▶ Se puede disponer de optodos que responden a ciertos analitos para los que se carece de electrodos.
- ▶ Las fibras ópticas son capaces de transmitir mayor densidad de información que los cables eléctricos, al poseer un ancho de banda más grande. Esto es debido a que las señales ópticas pueden diferir en cuanto a longitud de onda, fase, modulación de intensidad o polarización. Como resultado, una única fibra óptica puede, en principio, transmitir simultáneamente varias señales, permitiendo por ello el análisis de varios analitos a la vez.
- ▶ La dependencia frente a la temperatura de las fibras ópticas es mucho menor que la de los electrodos. En algunos casos es incluso irrelevante; si se emplean fibras de elevado punto de fusión, se puede aumentar el intervalo de temperaturas sin modificar prácticamente las prestaciones del sensor.

No obstante, los optodos también presentan ciertas limitaciones:

- ✘ La estabilidad limitada de los reactivos inmovilizados a largo plazo. Este problema se puede compensar, en cierta manera, realizando la detección a distintas longitudes de onda, utilizando sensores basados en tiempos de vida, o bien simplemente reemplazando la fase reactiva.

- ✘ Los tiempos de respuesta elevados en algunos casos ya que, al encontrarse indicador y analito en diferentes fases, es necesaria una etapa de transferencia de masa antes de alcanzar el equilibrio y, en consecuencia, hasta que se obtiene una respuesta constante. Este problema se minimiza si se emplean pequeñas fases reactivas. Por otra parte, en algunos casos, la transferencia de masa puede resultar en un incremento de la sensibilidad y la selectividad.
- ✘ Se precisan indicadores más selectivos y procesos de inmovilización más reproducibles que permitan aumentar la sensibilidad y estabilidad a largo plazo de las sondas.
- ✘ Las fibras ópticas disponibles en la actualidad contienen impurezas de naturaleza espectral que pueden originar una absorción, fluorescencia o dispersión Raman de fondo. El material de la fibra óptica determina el intervalo útil de longitudes de onda. Así, por ejemplo, las fibras ópticas de plástico son útiles en la región comprendida entre 420-800 nm, mientras que las fibras ópticas de cuarzo son adecuadas para transmitir radiación UV y las de vidrio para medidas en el visible.
- ✘ La relativa escasez de accesorios ópticos comerciales es otro inconveniente. Se precisan fuentes luminosas estables y de larga vida, mejores conectores, fibras ópticas, láseres baratos y, aunque en la actualidad ya existan LEDs (light emitting diodes) y LDs (laser diodes) para el visible a precios asequibles, los precios aumentan considerablemente si nos movemos hacia el UV. No obstante, se están haciendo avances en el desarrollo de LEDs en este campo⁶².

En el terreno de la fibra óptica, se puede decir que se está revelándose como el sistema más rentable por su relación calidad-precio.

- ✘ Las fibras ópticas han sido perfeccionadas para el uso en telecomunicaciones, es decir, se han desarrollado para transmitir a ciertas longitudes de onda (1550 y 1300 nm), en donde el nivel de transparencia es máximo: la atenuación es de 0.2 dB/km en 1550 nm y de 0.35 dB/km a 1330 nm. En los sistemas de telecomunicaciones es crítico reducir al máximo la atenuación (por absorción y/o dispersión) para aumentar la distancia de repetidores.

Por lo tanto, para transmitir en el visible o incluso en el UV, las fibras ópticas no están muy perfeccionadas, aunque ya se dispone de muchas fibras para estos propósitos.

Existen numerosos tipos de sensores de fibra óptica, y se pueden clasificar atendiendo a la tecnología (intrínsecos o extrínsecos), según la configuración (en reflexión, en transmisión o híbridos), según el punto en el que se realiza la medida (puntuales, distribuidos) o el tipo de modulación que utilizan.

Los sensores de fibra óptica se pueden clasificar en intrínsecos y extrínsecos, dependiendo de en dónde tenga lugar el reconocimiento del analito, en la fibra o fuera de ella^{28, 29, 63, 64}.

- ▶ **Sensores extrínsecos**, que están formados por una fase sensora externa a la propia fibra, cuyas propiedades ópticas se modifican tras su interacción con el analito. En este caso, la fibra óptica actúa transmitiendo la radiación a/desde la fase sensora. Los parámetros significativos de la fibra en este caso son: la eficiencia de la transmisión de la luz (transmitancia) y el ángulo de aceptación.

Este tipo de sensores se pueden subdividir en tres grupos:

- **De 1ª generación, optodos pasivos o directos**: En ellos, la fibra tan solo se utiliza como guía de luz. Se han utilizado para realizar análisis

espectrofotométricos a grandes distancias o, por ejemplo, para aquellas aplicaciones en las que no es posible el contacto físico con la muestra (por ejemplo, análisis de muestras a elevada presión). Su resistencia, simplicidad, estabilidad, durabilidad y que no necesitan ser calibrados pueden ser alguna de sus ventajas. Sin embargo, pueden ser poco selectivos y el número de analitos para los que pueden ser utilizados es limitado.

- **De 2ª generación:** En ellos la información analítica se genera a través de una reacción indicadora, ya que el analito no tiene un método inmediato de detección sensible. Un subgrupo de estos sensores son los llamados “sensores con depósito” en los que el reactivo se sitúa en un depósito y se alimenta de forma continua para su reacción con el analito en el extremo sensible.
- **De 3ª generación:** Están formados por una biomolécula acoplada a un sensor de segunda generación, por ejemplo un sensor de oxígeno o de pH. Tras la reacción con la biomolécula, el analito a cuantificar se transforma/correlaciona con la especie monitorizada por el sensor de segunda generación.

Los sensores de 2ª y 3ª generación también se denominan optodos activos o indirectos. Se puede destacar de ellos que son más selectivos que los pasivos y que no se ven afectados por el índice de refracción del medio. Las desventajas incluyen el posible lavado o fotodescomposición del indicador en contacto con la muestra, mayores tiempos de respuesta y la mayor complejidad de construcción.

- ▶ **Sensores intrínsecos.** Son aquellos en los que la propia fibra óptica actúa como sensor al modificarse alguna de sus propiedades por el analito. Por

tanto, a diferencia de los sensores extrínsecos, no se mide una propiedad óptica del analito o de una fase reactiva, sino el cambio en las propiedades ópticas de la fibra provocado por la reacción química con el analito, que tiene lugar sobre la propia fibra óptica, bien sea en su núcleo o en su superficie.

Una característica muy importante de estos sensores es que se pueden utilizar como sensores distribuidos, es decir, la medida puede realizarse en cualquier punto de la fibra óptica, determinándose tanto su magnitud como su posición en la misma.

5. Fases sensoras y mecanismos de reconocimiento

Todos estos tipos de sensores tienen una parte esencial en común para que pueda tener lugar el reconocimiento y detección del analito: **la fase sensora o zona de reconocimiento óptico**. Ésta puede ser una membrana polimérica en la que pueden ser solubilizados diferentes reactivos que interaccionen con el analito de interés produciendo un cambio en las propiedades ópticas de la misma⁶⁵, un óxido metálico o un sol-gel nanoestructurado en el que se inmovilice un reactivo que actúe de la misma forma que la descrita en el caso anterior⁶⁶, una resina comercial en la que los analitos se adsorben en su superficie y van preconcentrándose aumentando así la emisión luminiscente⁶⁷, o un polímero de impronta molecular en el que se hayan generado huecos específicos para el analito y dentro del cual, puedan preconcentrarse, permitiendo así su detección óptica⁶⁸.

El **mecanismo de reconocimiento óptico** va a depender, por tanto, del tipo de fase sensora que se diseñe. Así, los principales mecanismos de reconocimiento de los sensores ópticos son los siguientes:

1. **Mecanismo de coextracción o cambio iónico.** La fase sensora contiene un ionóforo (que interacciona con el analito), un cromoionóforo (cuyas propiedades ópticas serán sensibles al cambio de una propiedad química de la membrana, por ejemplo, el pH) y, en caso de cambio de carga en la membrana debido a la entrada o salida de especies cargadas, un aditivo aniónico lipofílico encargado de mantener la electroneutralidad dentro de la membrana. La interacción del analito de interés con el ionóforo provoca un cambio en una propiedad química de la membrana, por ejemplo, la entrada de iones H^+ (coextracción) que modifican el pH de la membrana o la cesión de H^+ del ionóforo al cromoionóforo (cambio iónico) que al igual que en el caso anterior produce un cambio de pH de la membrana. Esta variación de una propiedad química de la membrana, siguiendo con el ejemplo cambio de pH, induce un cambio en las propiedades ópticas del cromoionóforo, cambio que se relaciona con la concentración del analito de interés. Por tanto, es un mecanismo de reconocimiento indirecto.
2. **Mecanismo de interacción directa analito-cromoionóforo.** La fase sensora contiene un cromoionóforo que tras interactuar con el analito de interés (interacción física o química) cambia alguna de sus propiedades ópticas. Esta variación puede ser un aumento o una disminución de dicha propiedad, por ejemplo, desactivación de luminiscencia, que es proporcional a la concentración de analito.
3. **Mecanismo de interacción directa analito-soporte.** La membrana, que no contiene ningún aditivo ópticamente activo, interacciona con el analito que se retiene por interacciones físicas y/o químicas, preconcentrándose y produciendo una variación en las propiedades ópticas de la fase sensora que

es proporcional a la concentración de analito. Este es el caso de fases sensoras basadas en resinas comerciales o polímeros de impronta molecular.

NANOTECNOLOGÍA Y CIENCIA DE LOS MATERIALES APLICADAS AL DESARROLLO DE FASES SENSORAS ÓPTICAS Y NUEVOS MATERIALES

Como ya se comentó previamente, en los últimos años ha habido un desarrollo paralelo en la nanotecnología y la ciencia de los materiales que ha contribuido, activamente, al desarrollo de nuevas fases sensoras, imprimiendo, por tanto, un gran avance en el campo de los sensores químicos y físicos. El uso de la ciencia de los materiales y la nanotecnología en el desarrollo de fases sensoras han permitido bajar hasta la escala nano (nanosensores) y a su vez, implementar propiedades físico-químicas a la carta, que han permitido el desarrollo de sofisticadas fases sensoras capaces de resolver a nivel ambiental, biomédico e industrial, problemas analíticos cada vez más complejos y de forma más eficiente.

Debido a los avances producidos en las técnicas de polimerización dentro del campo de los polímeros orgánicos^{69, 70}, hoy día se pueden sintetizar polímeros con diferentes arquitecturas y con propiedades físico-químicas específicas para ser utilizados en la preparación de nuevas fases sensoras. Este hecho hace que la síntesis de polímeros y el estudio y conocimiento de las propiedades químico-físico de estos materiales sea una herramienta imprescindible y fundamental en la investigación y el desarrollo de nuevas fases sensoras. Además, la conjugación de materiales poliméricos orgánicos y materiales inorgánicos, para producir nuevos materiales híbridos orgánicos/inorgánicos, representa también una herramienta poderosa en la preparación de fases sensoras micro y nanoestructuradas.

1. Óxidos metálicos nanoestructurados

Estos nuevos materiales nanoestructurados están basados en la dispersión de partículas de óxidos metálicos en un polímero⁷¹. Los óxidos más utilizados son AlOOH , SiO_2 , ZrO_2 y TiO_2 y el polímero que se usa para que estos aglomerados o nanopartículas queden fijas sobre un soporte inerte es alcohol polivinílico (PVA). Su fabricación es muy simple y económica, lo que es además de interés para las empresas; se pueden conseguir 200 m² de material por minuto mediante la técnica de deposición conocida como “*curtain coating*”, deposición en cortina o cascada, y pudiendo generar membranas de 1 a 30 ml m⁻² de volumen total de poros con diámetros que oscilan entre 1 y 50 nm.

Sus características han permitido su desarrollo en multitud de aplicaciones, ya que posee un gran poder conductor, apropiado índice de refracción, transparencia, estabilidad y su principal característica: la posibilidad de obtener diferentes tamaños de poros y por tanto variar su interacción con la materia y/o la energía. Además, se pueden generar membranas multicapa con diferentes características físico-químicas.

La obtención de óxidos metálicos nanoestructurados está ampliamente desarrollada debido al gran interés que despiertan estos materiales en campos tan relevantes como la microinformática, robótica, sensores electroquímicos, etc., permitiendo obtener multitud de materiales con características totalmente diferentes en función del óxido metálico usado, así como el proceso de síntesis. En el desarrollo de esta tesis doctoral ha sido utilizado un tipo de óxido metálico muy concreto que ha dado muy buenos resultados en el desarrollo de fases sensoras ópticas⁷². Este material, denominado AP200/19, ha sido desarrollado por la empresa *Ilford Imaging GmbH Switzerland*, y se comercializa como papel fotográfico y transparencias para impresoras de inyección de tinta. Recientes estudios han demostrado que se pueden usar en el desarrollo de baterías flexibles de Li⁷³, para incrementar la eficacia de

OLEDs y pantallas flexibles, y como catalizador de reacciones fotoquímicas⁷⁴. El material es generado en forma de membranas nanoporosas en las que se puede controlar el tamaño, volumen y carga de los poros y se pueden incorporar reactivos selectivos a las especies a determinar, estabilizándolos, disminuyendo los tiempos de respuesta y mejorando su sensibilidad^{66,75} (ver Fig. 8 y Fig. 9)

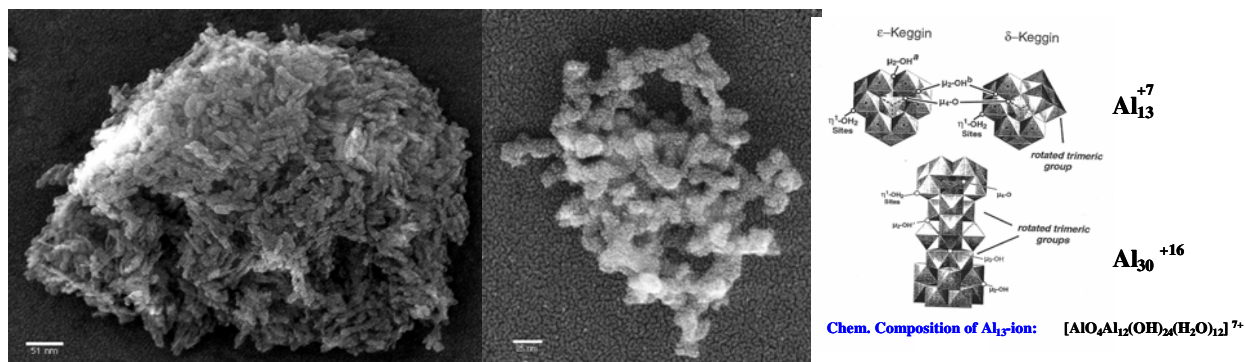


Fig. 8. Fotografía de SEM de las partículas de AlOOH usadas en la fabricación de soportes nanoestructurados

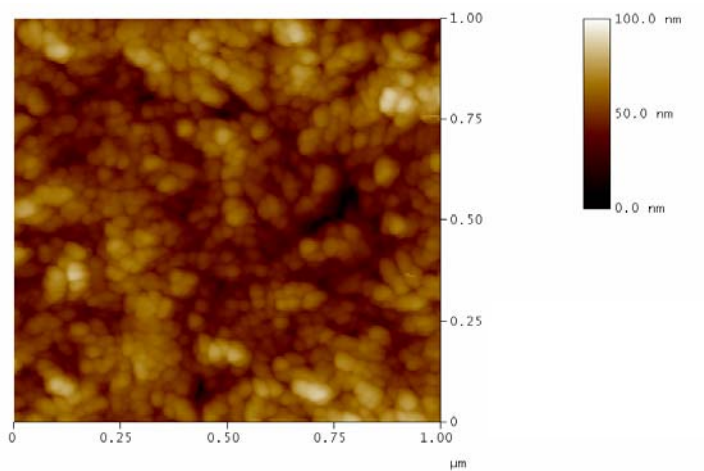


Fig. 9. Fotografía de AFM de la superficie del soporte nanoestructurado de AlOOH

Este tipo de materiales permiten la inmovilización en una matriz inorgánica de una o varias especies que se pueden incorporar a la matriz durante o después del proceso de obtención del material, actuando de igual forma que las membranas poliméricas pero con las características de los materiales inorgánicos. Además, debido a que durante el proceso de síntesis se puede controlar su porosidad, estos materiales proporcionan fases sensoras que aumentan su sensibilidad y estabilidad con respecto a las poliméricas. La inmovilización de las moléculas ópticamente activas en la matriz del óxido metálico se puede llevar a cabo por dos métodos, principalmente:

- ✦ **Deposición:** depositando una disolución concentrada (en un disolvente volátil) de la sustancia a retener, de forma que por fuerzas de capilaridad esta disolución penetra rápidamente en la estructura mesoporosa y, tras la evaporación del disolvente, éste queda retenido, física o químicamente, en su estructura.
- ✦ **Inmovilización química:** mediante la formación de enlaces covalentes entre la molécula a inmovilizar y los grupos activos (generalmente hidroxilos o aminos) de la superficie porosa del material.

Se ha demostrado que los óxidos metálicos incrementan la sensibilidad de reactivos luminiscentes hasta 40 veces con respecto a su sensibilidad cuando son incorporados en membranas poliméricas⁷⁶. Además, proporcionan gran estabilidad frente a la fotodescomposición y estabilidad en condiciones ambientales debido a la baja probabilidad de la formación de aglomerados y precipitación de reactivos en los nanoporos⁷⁷ y, también, pueden ser esterilizados mediante autoclave y/o rayos gamma sin pérdida significativa de su actividad sensora⁶⁵. Otra característica de los óxidos metálicos es la posibilidad de la co-incorporación de dos o más reactivos sin que se produzcan aglomerados, permitiendo procesos físico-químicos reversibles

entre ellos, como procesos de transferencia de energía (FRET)⁷⁶ y de transferencia de protones⁶⁶, lo que abre nuevas posibilidades y un futuro prometedor en el desarrollo de sensores ópticos.

2. Polímeros de Impronta Molecular (MIPs)

2.1. Introducción histórica y generalidades

Tanto en fase líquida como gaseosa, las moléculas se mueven y están distribuidas al azar. Cada molécula se mueve libremente, sin “importarle” mucho qué tiene a su alrededor. Se pueden generar algunos complejos intermoleculares debido a choques accidentales entre moléculas, aunque el tiempo de vida de estos complejos es muy pequeño y su concentración tanto en disolución, como en fase gaseosa, es virtualmente cero. Sin embargo, algunos tipos de moléculas (**moléculas receptoras**) son capaces de diferenciar selectivamente entre unas determinadas especies y otras. Estos receptores seleccionan exclusivamente una o varias moléculas del resto de moléculas que forman parte del sistema y forman con ellas complejos no covalentes con una gran estabilidad. Esta forma muy somera de describir el comportamiento de algunos sistemas moleculares se denomina “*reconocimiento molecular*” y es una de las claves esenciales para la existencia de la vida.

Los polímeros de impronta molecular (MIPs) se pueden definir como⁷⁸ “*polímeros tridimensionales con huecos específicos inducidos por una molécula molde que sirven para el reconocimiento molecular y que dan lugar a un material donde el molde dirige la disposición y orientación de los componentes que lo forman mediante un mecanismo de autoensamblaje*”. Es decir, se trata de materiales biomiméticos que reproducen de un modo más básico el mecanismo de reconocimiento de los sistemas biológicos

(hormona-receptor, enzima-sustrato, antígeno-anticuerpo). Por tanto, la tecnología MIP consiste en desarrollar un material polimérico capaz de interactuar selectivamente con una molécula o ión actuando como “cerradura” ante un analito “llave” (ver Fig. 10).



Fig. 10. Modelo llave-cerradura aplicable al reconocimiento molecular de los MIPs

Aunque las partículas MIPs pueden ser de dimensiones nanométricas, generalmente son de tamaño micrométrico, pero su carácter nanotecnológico proviene del tamaño nanométrico de los sitios activos, donde se retiene específicamente el analito (en semejanza a la interacción enzima-sustrato, denominada de llave-cerradura en bioquímica). Las propiedades químicas superficiales de estos materiales nanoestructurados y su empleo como adsorbentes reversibles se han revelado como una de las aplicaciones más notables hasta ahora.

Una de los retos actualmente más interesantes en el campo de la Nanociencia y Nanotecnología Analíticas es transformar la interacción molecular, que tiene lugar entre el soluto y el MIP, en un cambio óptico medible. Este fenómeno daría lugar a la generación de sensores ópticos que integren las excelentes propiedades de reconocimiento molecular inherentes a los MIPs, con la selectividad y sensibilidad propias de las técnicas espectroscópicas, especialmente de la fluorescencia.

Este objetivo se puede alcanzar mediante diversas estrategias, aunque las más desarrolladas y que mejor resultados han ofrecido, hasta la fecha, son: utilizando especies o analitos de interés óptimamente activos que puedan ser monitorizados ópticamente mediante su retención en el MIP^{79, 80}; o mediante el uso de monómeros debidamente funcionalizados que, una vez generado el polímero, actúen como transductores ópticos del mismo^{81, 82}. De esta forma, la interacción de la especie de interés con el polímero produciría un cambio en las propiedades ópticas del material, permitiendo la determinación tanto cualitativa como cuantitativa del analito.

Las formas de inmovilizar el material de reconocimiento para el desarrollo del sensor pueden ser muy variadas, comprendiendo desde la inmovilización del MIP en una célula de flujo, que a su vez queda incorporada en un sistema de análisis por inyección en flujo (FIA)^{79, 80}, hasta su deposición en la punta de una fibra óptica⁸³.

Aunque el interés en la técnica de impronta molecular es relativamente nuevo, el concepto en sí mismo tiene una larga historia.

En torno a 1930, el químico soviético M.V. Polyakov fue uno de muchos científicos que estuvieron implicados en investigaciones con siliconas para su uso en cromatografía. Polyakov preparó siliconas por acidificación de soluciones de silicato de sodio en las que, después del secado del polímero gelatinoso obtenido, se generaba una matriz rígida. En un artículo publicado en 1931⁸⁴ se presentó el efecto que provocaba sobre la estructura porosa de la sílice, la presencia de una serie de aditivos como benceno, tolueno o xileno. Tras de 20-30 días de secado a temperatura ambiente en presencia de los aditivos, los polímeros eran lavados con agua caliente. Cuando se usaba H₂SO₄ como iniciador de la polimerización (agente acidificante), se obtuvo una correlación positiva entre el área superficial (por tanto, la capacidad de carga) y el peso molecular del aditivo correspondiente. Sin embargo, si el agente acidificante era (NH₄)₂CO₃, los resultados diferían notablemente de los arriba

mencionados. En este caso, cuando la silicona se ponía en presencia de los aditivos, la cantidad de aditivo adsorbido dependía completamente de la estructura del aditivo con el que se hubiera llevado a cabo el secado, siendo mayor la retención de un aditivo determinado si era con él mismo con el que se había producido el secado de la matriz. En otras palabras, los aditivos fueron considerados como moldes que afectaban directamente a la estructura superficial de la silicona. Sin embargo, y a pesar de la enorme relevancia de los resultados, estos estudios pasaron en gran parte inadvertidos por la comunidad científica.

Años más tarde, Pauling y su discípulo Dickey⁸⁵, utilizaron un método muy similar al de Polyakov. La principal diferencia es que éstos adicionan la molécula molde durante el proceso de polimerización de la silicona. Así, al precipitar el gel de sílice en presencia de una serie de colorantes (naranja de metilo, etilo, propilo y butilo) y tras secar la matriz y extraerlos, esta estructura guardaba cierto efecto memoria hacia los aditivos con los que había sido sintetizada. Podría decirse, por tanto, que Pauling y Dickey fueron los padres de la impronta molecular.

Fue en 1972 cuando se marca el comienzo de la impronta molecular como se conoce hoy día, cuando los laboratorios de Wulff⁸⁶ y Klotz⁸⁷ divulgaron independientemente la preparación de polímeros orgánicos con predeterminada selectividad hacia algunas moléculas. Los moldes utilizados, o sus derivados, que estaban presentes durante la polimerización eran reconocidos selectivamente por el MIP. Los trabajos pioneros de los grupos de Wulff, Mosbach y Takagishi⁸⁸⁻⁹⁰, propusieron los fundamentos de la técnica de impronta molecular actual.

Actualmente, la impronta molecular es una técnica que va en aumento. Durante los últimos cinco años se han publicado más de 2000 artículos referentes a MIPs. El aumento inicial durante los años 90 se debió principalmente a la fabricación de polímeros de impronta por vía no-covalente y su aplicación en diversos campos.

El trabajo publicado por Vlatakis *y col.* en 1993⁹¹ fue el primer trabajo que demostraba que un sistema de MIPs puede rivalizar en selectividad con un sistema de anticuerpos. Este trabajo recibió mucha atención y representa en gran medida el trabajo más citado del área. Muchos logros notables se han divulgado desde entonces que han contribuido a hacer de la tecnología de impronta molecular una técnica muy interesante y prometedora.

Para preparar un MIP lo más usual es usar un proceso de polimerización radicalaria, donde uno o más monómeros junto con un entrecruzador y en presencia de la molécula molde forman lo que se conoce como el complejo de pre-polimerización. Éste, una vez que se inicia la reacción radicalaria mediante la adición de un iniciador de radicales, da lugar a un polímero tridimensional que contiene a la molécula molde en su estructura. Una vez obtenido esta resina polimérica y tras la extracción del molde, se crean cavidades en el interior del polímero que son complementarias en tamaño, forma geométrica y orientación de grupos funcionales a la molécula usada como molde (véase la Fig. 11).

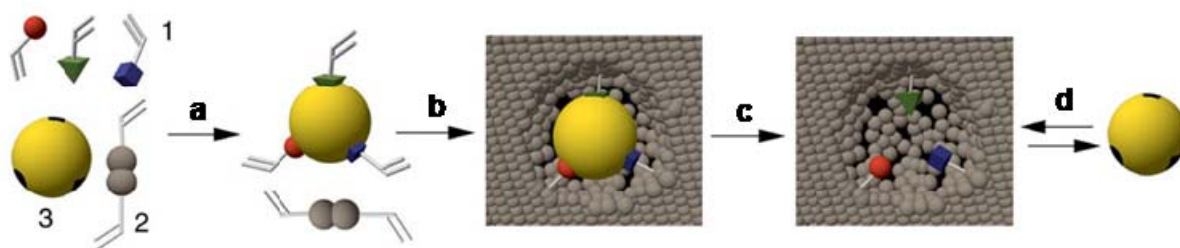


Fig. 11. Representación esquemática de las etapas implicadas en la síntesis de MIPs⁹².

1: monómeros funcionales, 2: entrecruzador, 3: molécula molde; **a)** formación del complejo de pre-polimerización, **b)** polimerización, **c)** extracción del molde liberando los sitios de unión, **d)** unión selectiva con el analito de interés

Las interacciones entre la molécula molde y los monómeros para dar lugar al complejo de pre-polimerización pueden ser básicamente de dos tipos: vía enlaces

covalentes o bien mediante interacciones no covalentes (repulsiones hidrofóbicas/hidrofílicas, puentes de hidrógeno, interacciones π - π , fuerzas de Van der Waals, interacciones electrostáticas, etc.).

Estos materiales nanoestructurados presentan una serie de ventajas frente a los otros materiales utilizados en el diseño de fases sensoras ópticas, como son:

- ✓ Son materiales baratos y sencillos de preparar.
- ✓ Permiten trabajar en disolventes orgánicos debido a su estructura altamente entrecruzada así como en un amplio intervalo de temperaturas, pH y presiones.
- ✓ Se pueden preparar MIPs “a la carta” en función del molde usado.
- ✓ Pueden usarse durante un número elevado de ciclos de reconocimiento sin que se vean alteradas sus propiedades analíticas.
- ✓ La adsorción de la molécula de interés tiene lugar de forma reversible y en un corto periodo de tiempo.
- ✓ No inducen respuesta inmune, a diferencia de las biomoléculas, lo cual puede facilitar la preparación de fases sensoras ópticas de uso in vivo.
- ✓ Pueden prepararse en una gran variedad de formatos físicos (nanopartículas, micropartículas, membranas poliméricas, fibras, etc.)
- ✓ Pueden usarse durante un número elevado de ciclos de reconocimiento sin que se vean alteradas sus propiedades analíticas.

- ✓ Pueden almacenarse durante años a temperatura ambiente sin sufrir modificaciones significativas de sus propiedades⁹³.

No obstante, como todo material, tiene una serie de inconvenientes:

- ✗ Presentan una sensibilidad baja.
- ✗ Pueden darse interacciones inespecíficas, pues son materiales porosos con un elevado porcentaje de cavidades no específicas para el analito, disminuyendo por tanto la selectividad.
- ✗ La extracción del molde es compleja e incompleta (queda retenido en torno a un 5% en masa del mismo).
- ✗ La cinética de unión entre el molde y los monómeros funcionales del polímero suele ser lenta.
- ✗ La constante de equilibrio termodinámico de unión del molde con el MIP es muy dependiente de las características químico-físicas (sobre todo la polaridad) del disolvente en el que se lleva a cabo.
- ✗ La dependencia de la constante de equilibrio con las características del disolvente hace que para ciertas moléculas (moléculas de polaridad media y alta) en disolución y en condiciones normales de presión y temperatura, esta constante de unión sea muy baja.
- ✗ Hay limitaciones en el tamaño de la molécula molde, debiendo usarse generalmente moléculas de peso molecular elevado para que se puedan generar cavidades lo suficientemente grandes que permitan la impronta de la red polimérica.

Debido a la naturaleza polimérica de los MIPs es necesario un conocimiento profundo de los diferentes tipos y las distintas formas de llevar a cabo la polimerización para llevar a cabo la síntesis del material de una forma controlada. Sin estos conocimientos sería muy difícil llegar a la obtención de un material con altas cualidades para el reconocimiento molecular y que además sea compatible con el medio en el que va a tener lugar dicho reconocimiento. Es por ello, que la polimerización orgánica, su química y las distintas posibilidades que ofrece sea concebida como una de las claves fundamentales para obtener un MIP de forma exitosa.

2.2. Polimerización orgánica: nacimiento y breve descripción general

El término **polímero** engloba una extensa variedad de materiales tanto naturales como sintéticos. Muchos de ellos han sido y siguen siendo de gran utilidad en nuestra sociedad. Dentro de este término se pueden introducir sustancias tan conocidas como la celulosa, el almidón, las proteínas, las pieles, la lana, el algodón, fibras sintéticas basadas en poliésteres y poliamidas, los popularmente conocidos como plásticos, los cauchos, los adhesivos, las pinturas, etc.

Aunque ha sido el siglo XX el espacio temporal en el que estos materiales han llegado a su apogeo, no en vano se conoce a esta época como la “era del plástico”, ello no significa que la humanidad no los haya utilizado con anterioridad. El hombre desde sus orígenes siempre ha utilizado estos productos en distintos hábitos cotidianos, además de que la mayor parte de las biomoléculas presentes en todo organismo vivo se puedan definir como biopolímeros. Así, las proteínas y los hidratos de carbono han sido parte de su alimentación. El mismo papel está formado por fibras celulósicas que es un material macromolecular. Las pieles de distintas

especies animales y la lana han sido utilizadas desde siempre por el hombre para protegerse del frío. Sin embargo, estos productos naturales quedaron fuera del estudio de los laboratorios de química hasta el siglo XVIII. La razón hay que encontrarla en las distintas propiedades que presentan estos materiales frente a las de las sustancias orgánicas e inorgánicas habituales. Así, muchos métodos implantados en los laboratorios de química desde los albores de ésta (como los procesos de purificación de sustancias, los procesos de cristalización, la destilación, etc.), eran infructuosos e inadecuados cuando se aplicaban a los materiales macromoleculares que no hierven, son difícilmente solubles, no cristalizan en la forma habitual, etc.

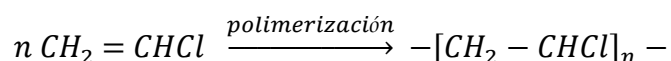
El comienzo de la química macromolecular como ciencia puede situarse en la década de los años veinte cuando, en la reunión anual de físicos y naturalistas alemanas celebrada en Düseldorf, en 1926, el premio Nobel Herman Staudinger presentó sus descubrimientos sobre algunos de estos materiales. Tomando como base determinado productos, obtenidos por hidrogenación del caucho natural, extraído de ciertas plantas tropicales, dedujo que las altas viscosidades que presentaban en disoluciones diluidas no podían ser sino el reflejo de un muy elevado peso molecular de dichas sustancias. Su hipótesis fue que ese elevado peso molecular podría explicarse si esas sustancias estuvieran constituidas por largas cadenas de átomos unidos por enlaces covalentes, consecuencia de la repetición a lo largo de cada cadena de unidades más pequeñas. A estas unidades Staudinger las llamó **monómeros** y la estructura resultante, **polímero**^{94, 95}.

El concepto de macromolécula salió reforzado de esta reunión de Düseldorf y, como consecuencia, los científicos comenzaron a considerar la idea de obtener polímeros partiendo de sustancias orgánicas normales (monómeros), mediante procesos que se denominaron reacciones de polimerización. Se encontraron pronto

vías para llevar a cabo estos procesos, fundamentalmente basadas en dos tipos de reacciones bien conocidas en química orgánica: las reacciones de condensación y las reacciones de adición a un doble enlace. Al mismo tiempo comenzó también el estudio sistemático de las propiedades de materiales macromoleculares, ya fueran de origen natural o sintético.

2.2.1. Monómeros y polímeros: descripción general

Como ya se ha comentado, una molécula de polímero está formada por la unión, mediante enlaces covalentes, de moléculas más pequeñas denominadas monómeros. Sin entrar en detalles, normalmente se representa como la unidad repetitiva, denominada “**mero**”, de la estructura entre corchetes y con un subíndice “**n**” que simboliza el número de unidades repetitivas. Estas unidades de partida son usualmente equivalentes o casi equivalentes al monómero o material de partida con el que se forma el polímero. En el ejemplo de abajo se representa el *policloruro de vinilo* (PVC) obtenido a partir de la polimerización del monómero *cloruro de vinilo*.



Si los monómeros que forman parte de la cadena son todos idénticos, hablamos de *homopolímero*, mientras que si tenemos dos o más tipos diferentes de unidades monoméricas estaríamos hablando de un *copolímero*. Por otro lado, podemos tener dímeros (dos moléculas de monómero), trimeros (tres moléculas de monómero), oligómeros (de 5 a 15 unidades repetitivas), etc. La longitud de la cadena de un polímero viene especificada por el número de unidades que se repiten en la cadena, es decir, por su **grado de polimerización**. Teóricamente, el peso

molecular de un polímero es simplemente el peso molecular de la unidad repetitiva por su grado de polimerización (se verá en detalle más adelante).

Un concepto fundamental al hablar de polímeros es el de **funcionalidad**. Este concepto es fundamental en el desarrollo de la teoría de los polímeros y en él se basan muchas de las fórmulas para el tratamiento teórico y matemático de las macromoléculas. El concepto está asociado a la capacidad de reacción de los monómeros en el proceso de polimerización en el que intervengan. Se puede definir funcionalidad de una molécula, como la cantidad de sitios reactivos que esa molécula pone en juego en una determinada reacción de polimerización. Estos grupos reactivos son, generalmente, los grupos funcionales de un monómero, es decir, un arreglo particular de la molécula que es capaz de llevar adelante la reacción de polimerización.

2.2.2. Moléculas ramificadas, entrecruzadas y reticuladas. Termoplásticos y termoestables

En muchas de las reacciones de polimerización, las unidades estructurales se colocan en forma de una cadena totalmente lineal. Tal es el caso de polímeros como el polietileno, el polipropileno o el policloruro de vinilo, entre otros. Los polímeros de estas características topológicas son materiales **termoplásticos**, esto es, reblandecen o funden por acción del calor, lo que permite darle forma mediante moldes, forma que posteriormente se estabiliza al enfriarlos, fabricando así multitud de objetos útiles. Además es posible volverlos a reblandecer y volverlos a moldear con formas diferentes (son reciclables). La popularidad de estos termoplásticos hizo que se vulgarizara el término *plástico* como vocablo genérico para describir a la mayoría de los polímeros.

En otras polimerizaciones pueden ocurrir reacciones que produzcan cadenas más o menos cortas en forma de ramas a lo largo de una cadena que podemos considerar como principal. En la Fig. 12 se puede ver un ejemplo de dos posibles estructuras no lineales que puede adoptar una macromolécula.

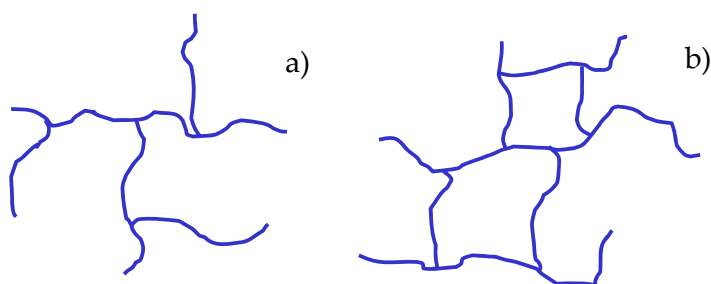


Fig. 12. Dos topologías no lineales que puede adoptar una macromolécula: **a)** cadenas ramificadas y **b)** cadenas reticuladas

El ejemplo **a)** de la Fig. 12 puede tener lugar cuando se lleva a cabo la polimerización de butadieno, $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}_2$. Un posible proceso, con el catalizador adecuado, implica la ruptura y el crecimiento de la cadena principal a través del doble enlace 1-2. Pero al quedar intacto el enlace 3-4, este tiene la posibilidad de generar cadenas laterales a partir de cualquier punto que lo contenga. Otro ejemplo lo constituyen las reacciones de condensación en las que uno de los monómeros sea trifuncional. Al reaccionar con otro bifuncional de estructura adecuada puede igualmente generar estructuras ramificadas.

Cuando ramas laterales unen diferentes cadenas principales de polímero, se comienza a generar una estructura en la que esas cadenas se unen entre sí, produciéndose polímeros reticulados o entrecruzados. Cuando el entrecruzamiento alcanza gran extensión, Fig. 12 **b)**, en el sentido que una gran parte de las moléculas

del sistema, hablamos de cadenas reticuladas, pudiéndose alcanzar en el límite un gran retículo tridimensional que englobe a todas ellas.

La diferencia experimental que se observaría entre polímeros levemente entrecruzados y polímeros altamente reticulados sería que, en presencia de un disolvente apropiado, los polímeros entrecruzados llegarían a disolverse, mientras que los polímeros reticulados no lo harían, observándose un hinchamiento de los mismos como consecuencia de que el disolvente penetra entre las ramas de la macromolécula pero no puede separarlas. Tanto la reticulación como el entrecruzamiento confieren a los polímeros propiedades de gran importancia técnica, mecánica y de resistencia a los disolventes. Igualmente les confiere un comportamiento frente a la temperatura muy especial, en el sentido de que, a diferencia de los termoplásticos, los polímeros reticulados no se reblandecen con el calor y seguir incrementándoles la temperatura solo supondría su degradación. Hablamos en este caso de polímeros **termoestables**.

2.2.3. Copolímero. Descripción general

Como ya se mencionó anteriormente, cuando en una polimerización se hacen reaccionar dos monómeros distintos, la macromolécula resultante se llama copolímero. Sus unidades estructurales **A** y **B**, procedentes de los monómeros utilizados, se pueden colocar en orden distinto a lo largo de la cadena polimérica, obteniéndose así distintos tipos de copolímeros (véase Fig. 13):

- a) Copolímeros al azar:* Cuando la introducción de los dos tipos de monómeros dentro de la cadena sucede totalmente al azar.

- b) *Copolímeros alternantes*: En este caso la alternancia en la distribución de los monómeros a lo largo de la cadena es totalmente alternante.
- c) *Copolímero de bloque*: En los copolímeros de bloque las unidades de monómero forman bloques, ya sean predominantemente de tipo **A** o de tipo **B**.
- d) *Copolímero de injerto*: Esto ocurre cuando el polímero de bloque está ramificado, siendo la unidad estructural de la cadena principal del tipo **A** y la ramificación del tipo **B**.

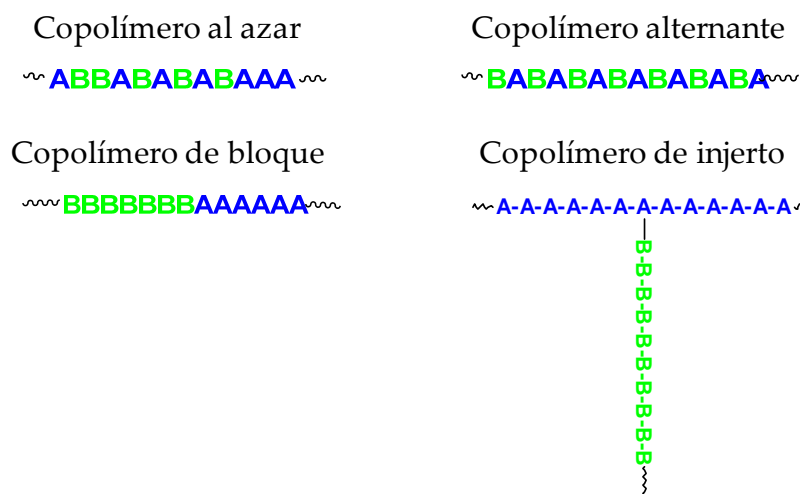


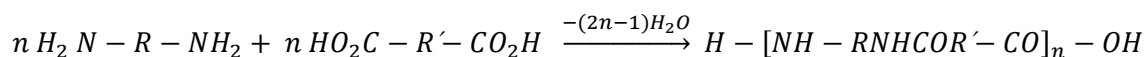
Fig. 13. Algunos tipos de copolímeros

2.3. Reacciones de polimerización. Clasificación histórica

Desde un punto de vista histórico, los polímeros se clasificaron al principio en dos grandes familias que atendían a los dos grandes métodos introducidos en las primeras décadas de desarrollo de estos materiales. En ambos tuvo mucho que ver la labor de Wallace Carothers en los laboratorios de DuPont. Carothers propuso que las reacciones de formación de polímeros podrían clasificarse en base a las diferencias de

composición entre el polímero y el monómero o monómeros a partir de los que fue sintetizado. Así, podríamos hablar de dos grandes familias:

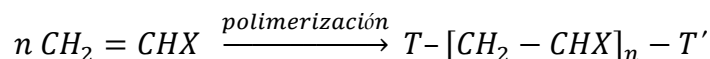
- *Polimerizaciones por condensación de monómeros multifuncionales.* Los polímeros de condensación son aquellos que han sido generados a partir de monómeros polifuncionales mediante sucesivas reacciones de condensación y con eliminación de pequeñas moléculas, como por ejemplo, agua. Un ejemplo de polímeros de condensación son las poliamidas obtenidas a partir de diaminas y diácidos con eliminación de agua de acuerdo con la siguiente reacción general:



donde R y R' pueden ser grupos alifáticos o aromáticos. La unidad entre paréntesis que se repite n veces a lo largo de la cadena de poliamida se denomina **unidad de repetición**. En este tipo de polímeros, la composición de la unidad de repetición difiere de la de los monómeros de reacción por el hecho de perder una molécula durante la reacción.

- *Polimerizaciones de adición a un doble enlace.* Este tipo de polímeros se forman sin la pérdida de ninguna molécula pequeña, a diferencia de los anteriores. Para que tengan lugar este tipo de polimerizaciones se precisa la existencia en el monómero de un doble enlace $C=C$. Es el caso de los denominados *monómeros vinílicos*, representados de forma general como $CH_2=CHX$, donde X representa a un sustituyente (hidrógeno, alquilo, arilo, nitrilo, éster, ácido cetona, éter o halógeno). La reacción comenzará por el ataque de algún iniciador a uno de los carbonos del monómero, provocando la ruptura del doble enlace y dando lugar en el otro carbono a la aparición de un radical, de un catión o de un anión, que es por donde continuará la reacción, al facilitarse su ataque a otra

molécula de monómero. La macromolécula final obtenida puede representarse como:



donde con T y T' se ha querido representar los denominados grupos finales, que pueden provenir de los distintos elementos que se encontraban en el matraz de reacción, generalmente el catalizador o iniciador, el disolvente, etc. A diferencia de los polímeros de condensación, la composición de la unidad de repetición en este tipo de polímeros es la misma que la de los monómeros.

Pronto se constató el hecho de que determinados monómeros (generalmente con estructura cíclica) no producían al polimerizar moléculas pequeñas como subproductos de condensación, siendo igual la composición de la unidad de repetición que la de los monómeros de reacción, mientras que las características cinéticas de determinados procesos de polimerización por adición tenían más que ver con las policondensaciones que con las poliadiciones.

Como consecuencia de ello, se optó por una clasificación y terminología diferente, fundamentalmente basada en el comportamiento cinético de las reacciones.

2.4. Reacciones de polimerización. Clasificación actual

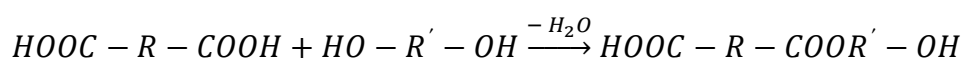
La clasificación actual, basada en el comportamiento cinético de las reacciones de polimerización, divide a estas reacciones en dos grandes bloques⁹⁶. Un primer gran bloque incluye a las reacciones en las que todos los monómeros pueden participar estadísticamente en la formación de las futuras cadenas desde el principio. El tamaño de las cadenas va creciendo lentamente con el tiempo y la concentración

de los monómeros de partida, como tales, cae prácticamente a cero a los pocos instantes de la reacción. Tales reacciones se clasifican bajo el nombre de *polimerizaciones por etapas*. En este bloque pueden incluirse muchas policondensaciones y algunas reacciones que implican el concurso de compuestos cíclicos.

En el otro gran bloque de reacciones de polimerización se incluyen las reacciones en las que, por algún procedimiento, se van generando continuamente pequeñas concentraciones de centros activos (radicales, cationes o aniones) que, una vez generados, adicionan monómero rápidamente para formar una cadena completa en pocos instantes. De forma que transcurrido un tiempo de polimerización, el medio de reacción contiene todavía una gran concentración de entidades monoméricas que no han podido adicionarse a los centros activos generados y una cierta cantidad de cadenas polimerizadas. Tales reacciones se llaman *polimerizaciones en cadena*.

2.4.1. Polimerización por etapas

Como se ha comentado anteriormente las reacciones más representativas correspondientes a las polimerizaciones por etapas son reacciones en las que tienen lugar, de forma repetida, clásicos procesos de condensación entre dos grupos funcionales distintos, para dar lugar a otro nuevo, con eliminación de moléculas pequeñas como el agua. La condición fundamental para producir polímeros es que los reactivos (monómeros) deben contener una funcionalidad superior a uno. De esta forma, una reacción clásica como la de un ácido y un alcohol para producir un éster y agua pueden generar un polímero si el ácido es difuncional y el alcohol también,

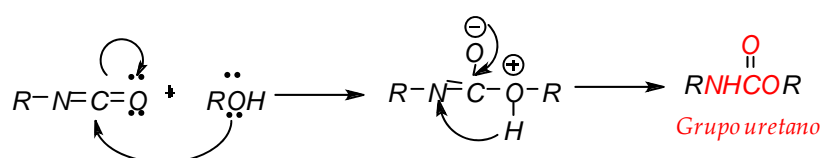


ya que la nueva entidad generada en el primer paso de la reacción, además de contener un grupo éster, mantiene una bifuncionalidad en sus extremos, lo que le permite seguir reaccionando con otros grupos de diferente naturaleza para seguir generando nuevos grupos éster en cadenas progresivamente más largas.

Entre los procesos de policondensación más habituales destacan las reacciones entre ácidos carboxílicos de funcionalidad igual o superior a dos, aminas di- o multifuncionales para producir poliamidas y las reacciones entre alcoholes e isocianatos para dar lugar a poliuretanos. Estos últimos polímeros han sido extensamente utilizados en esta memoria, por lo que pasaré a describir brevemente algunos aspectos relacionados con su síntesis.

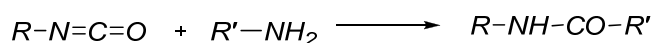
- *Poliuretanos.* El grupo de materiales que se incluye bajo el nombre de poliuretanos es, en realidad, una vasta familia de formas estructurales que nacen tanto de la complejidad de las reacciones de los grupos isocianato (-N=C=O) como de la capacidad para poder variar las condiciones de síntesis, a la búsqueda de un material concreto con unas determinadas propiedades.

La síntesis de estos materiales suele llevarse a cabo mediante la reacción de monómeros con grupos isocianato y otros con grupos alcohol mediante una típica reacción de adición nucleofílica, para dar lugar a un enlace *uretano*:

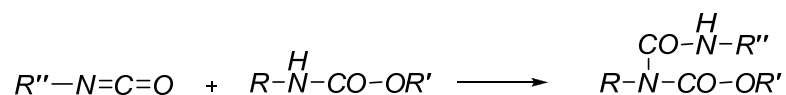


La alta reactividad de los grupos isocianato en condiciones no muy exigentes es una vía interesante para producir polímeros cuando se cumpla la condición de una funcionalidad múltiple. En general, un grupo isocianato reacciona con todo tipo de compuestos que contengan hidrógenos activos,

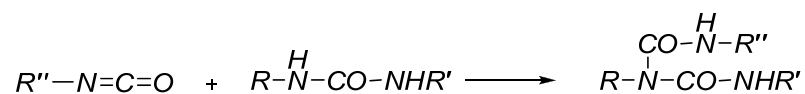
como puede ser el caso de moléculas de agua, alcoholes, aminas o ácidos. De esta forma, aparte de la típica reacción isocianato-alcohol (que por otro lado, es la más utilizada en la síntesis de poliuretanos) los grupos isocianato pueden reaccionar con aminas para dar lugar a *ureas*:



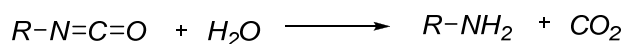
La reacción también se da con los propios uretanos, con lo que una molécula de uretano y una de isocianato pueden dar lugar a un *alofanato*:



reacción que también pueden dar las propias ureas para formar *biurets*:



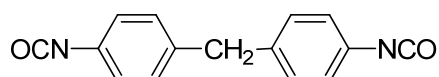
Finalmente, conviene también recordar en este marco la rápida reacción de los isocianatos con agua para dar lugar a aminas y dióxido de carbono:



esta última reacción puede ser indeseable en algunas ocasiones ya que puede ser causante de la terminación prematura de cadenas, aunque en otras aplicaciones el agua es adicionada de forma intencionada para la fabricación de espumas de poliuretanos. Así, el CO₂ actúa como agente formador de burbujas gaseosas, que al salir de la masa de reacción genera estas espumas.

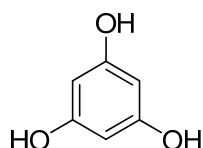
Conviene decir que, aunque pueden obtenerse poliuretanos lineales sobre la base del empleo de isocianatos y alcoholes estrictamente

bifuncionales, lo cierto es que en los usos convencionales así como en los descritos en esta tesis, se emplean unos monómeros y otros con funcionalidades superiores a dos, lo que da lugar a estructuras ramificadas y reticuladas de muy variadas propiedades. Por solo mencionar dos de los posibles orígenes de esa polifuncionalidad, se recordará aquí que si bien uno de los isocionatos más conocidos, el 4,4'-difenil metano diisocianato (MDI)



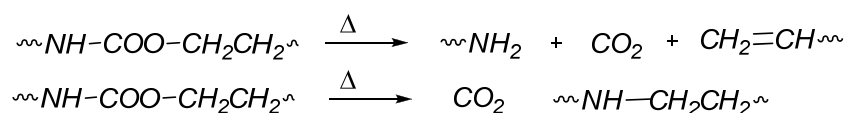
es, en estado puro, un sólido de punto de fusión en torno a 40 °C, el producto que comercialmente se vende para usos industriales y de laboratorio es un líquido viscoso que contiene algunos triisocianatos, lo que hace que la funcionalidad de este MDI comercial pueda variar entre 2.0 y 2.8.

Otro ejemplo de monómero muy utilizado para conferir un determinado grado de entrecruzamiento a un poliuretano es el 1,3,5-trihidroxibenceno, más conocido como floroglucinol:



cabe mencionar que la temperatura es un factor fundamental en la síntesis y control de la estructura de poliuretanos, sobre todo en los entrecruzados o reticulados, ya que no solo afectará a la termodinámica del proceso, sino que además producirá grandes cambios en la cinética global de la reacción. Así, la temperatura de polimerización afectará a las propiedades mecánicas de los polímeros finales, generando polímeros más o menos flexibles y blandos, a temperaturas cercanas a la ambiental, mientras que temperaturas próximas a

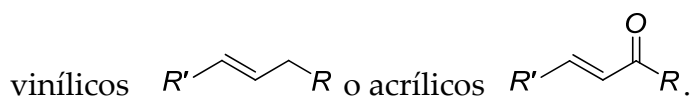
los 100 °C conllevan a la formación de materiales muy duros y altamente rígidos. La temperatura de reacción nunca debe ser superior a 100-120 °C, ya que a estas temperaturas los poliuretanos pueden experimentar diferentes tipos de reacciones de degradación como, por ejemplo:



También es posible la regeneración de los monómeros isocianato y alcohol primarios por descomposición polimérica.

2.4.2. Polimerización en cadena

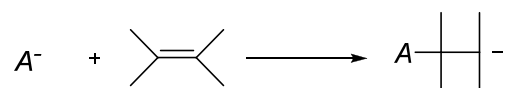
La polimerización en cadena es, generalmente, el resultado de la apertura del doble enlace existente en muchos compuestos monoméricos, como los derivados



La ruptura, además de por la propia estructura del monómero, está condicionada por las condiciones de la reacción y sobre todo, por la acción de un iniciador que activa la densidad electrónica del monómero, de forma que rompe el doble enlace, bien en una rotura homolítica o heterolítica. En el segundo caso, dependiendo del carácter electrófilo o nucleófilo del iniciador, se genera una especie catiónica o aniónica que condiciona el posterior desarrollo de la cadena en crecimiento.

- a) **Polimerización iónica.** Las polimerizaciones iónicas se basan en una ruptura heterolítica de los dobles enlaces de los monómeros olefínicos merced al papel

de un iniciador que ataca de forma adecuada la densidad electrónica del monómero. Y así, en una típica polimerización aniónica, un anión fuertemente básico A^- puede atacar a una olefina:



El producto de esta adición es otro anión que puede adicionar nuevos monómeros en un clásico proceso de propagación. No todas las olefinas, sin embargo, son susceptibles de una polimerización aniónica. Para hacer posible la reacción descrita arriba, el monómero debe tener una estructura en la que la densidad electrónica del doble enlace se mueva con facilidad o que dicho enlace esté ya parcialmente polarizado. Monómeros como el estireno y sus derivados, las piridinas o los dienos están entre los monómeros que cumplen la primera condición. Otros, como los acrilatos, metacrilatos o acrilonitrilo tienen sustituyentes próximos al doble enlace que provocan la adecuada polarización.

Sin embargo, la consecución de altos polímeros en polimerizaciones iónicas (tanto aniónicas como catiónicas) necesitan que esas especies iónicas presentes en el medio tengan una adecuada estabilidad o, en otros términos un adecuado tiempo de vida medio que les permita continuar el proceso de propagación.

Existen varias estrategias para dar lugar a cadenas en crecimiento con extremos aniónicos. Y así, se han empleado una gran variedad de iniciadores de corte básico como amiduros, alcóxidos, hidróxidos metálicos, fosfinas o compuestos organometálicos como el butil litio.

La característica más importante de muchas polimerizaciones aniónicas es la falta de un mecanismo inherente de terminación. Las especies activas generadas en los primeros instantes del proceso por reacción del iniciador con el monómero, mantienen esa actividad hasta que el monómero desaparece, tras lo cual es incluso posible mantener esa actividad durante un cierto tiempo, por lo que si se adiciona nuevo monómero desde el exterior la polimerización se reinicia.

Dado que las especies activas se generan al mismo tiempo y todas acaban de crecer cuando el monómero desaparece, la longitud (el peso molecular) de las cadenas es muy homogénea, lo que conduce a distribuciones muy estrechas de peso molecular o índices de polidispersidad muy bajos.

La polimerización catiónica es, en una consideración superficial, bastante parecida a la polimerización aniónica. Un catión iniciador se une a una olefina, a un ciclo o a otro monómero, compensando la carga con un contraión colocado en sus proximidades. El catión resultante adiciona más monómero hasta que la reacción se termina. Sin embargo el mecanismo de terminación en la catiónica tiene lugar mediante una reacción entre el contraión y la cadena en crecimiento que, de esta forma termina su vida activa. El proceso genera el iniciador que puede iniciar una nueva cadena. Por lo tanto, el conjunto de secuencias es similar a lo que en las reacciones radicales se denomina una transferencia de cadena. Tal proceso de terminación es el factor dominante de una polimerización catiónica. Debe ser cuidadosamente controlado para impedir que agua u otras impurezas generen procesos no deseados. Las reacciones, además solo transcurren bien a temperaturas bajas (-70 °C). El iniciador catiónico más común es un protón que aunque no puede existir libremente en un medio condensado, puede estar

unido a compuestos con pares de electrones libres. Si la unión es débil, el complejo es un ácido y cuanto menos fuerte es la unión más fuerte es el ácido. Los más fuertes son complejos de compuestos (coiniciadores) con hidrógenos ácidos (agua, alcoholes, ácido clorhídrico) con ácidos de Lewis o iniciadores. Un complejo habitual es el que forma un ácido de Lewis como el tricloruro de aluminio a partir de un orbital sp^3 disponible, con un alcohol.

- b) **Polimerización radical.** Las polimerizaciones radicales se conocen desde hace más de sesenta años y prácticamente para los años cincuenta se tenían bien establecidos los principios que han permitido extender esta técnica a la más variada producción de diferentes polímeros y copolímeros. Ello fue posible gracias a la comprensión del mecanismo del proceso. De entre todos los procesos de polimerización, la polimerización radical es la más importante y la más usada. Más del 50% de los polímeros sintetizados en el mundo se producen por vía radical⁹⁷, ya que muchos de los monómeros de tipo vinílico o acrílico polimerizan por esta vía. Las razones fundamentales de este éxito descansan en la posibilidad de realizar las polimerizaciones a temperaturas bajas (entre ambiente y 100 °C) y la menor pureza necesaria, tanto en lo referente a monómeros como a iniciadores, para que la reacción se desarrolle eficientemente. Es también importante recalcar que la polimerización radical es el método más versátil para preparar copolímeros, al poner más de un monómero a polimerizar en el mismo medio.

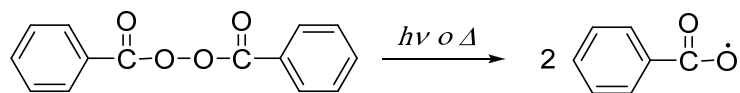
Casi todos los compuestos conteniendo un doble enlace pueden ser polimerizados por vía radical. Las únicas condiciones que deben cumplir son la capacidad termodinámica de polimerizar y la posibilidad cinética de hacerlo con unos parámetros que hagan rentable el proceso. La primera condición suele cumplirse en casi todos los casos, al ser la apertura del doble

enlace y posterior concatenación de unidades un proceso espontáneo. La condición cinética, sin embargo, es algo más restrictiva y elimina ciertos monómeros de las vías comerciales de polimerización radical.

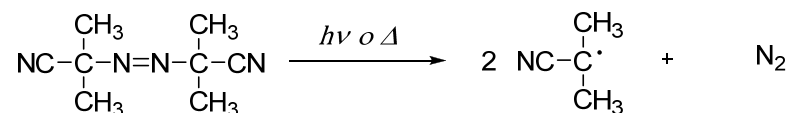
2.4.3. Cinética de la polimerización radical

La polimerización radical procede mediante un clásico proceso de reacción en cadena, siguiendo una serie de etapas cinéticas que se irán explicando detalladamente.

- **Iniciación.** En la etapa inicial o iniciación se necesita el concurso de alguna molécula capaz de generar radicales. Muchos iniciadores de la polimerización radical son compuestos que tienen algún enlace fácil de romper homolíticamente por acción de luz o calor. Compuestos típicos para estos fines son los peróxidos, hidroperóxidos, azocompuestos, sistemas redox, etc. Se usan en concentraciones inferiores al 1% (m/m). Un ejemplo típico de iniciador radical puede ser el peróxido de benzoilo que se descompone a la suficiente velocidad en dos radicales a temperaturas próximas a 70 °C o mediante luz ultravioleta:

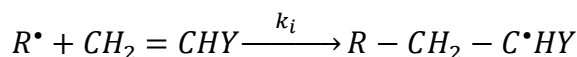
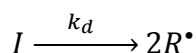


De estructura muy diferente e igualmente muy usado por su intervalo de temperatura y relativa facilidad de manejo es el azo-bis-isobutironitrilo (AIBN):



Algunos monómeros pueden autoiniciar su polimerización mediante el concurso de la energía térmica o por aplicación de radiación ultravioleta.

El esquema cinético básico de esta etapa es el siguiente:

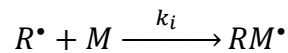
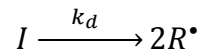


Como se acaba de detallar, la iniciación consta de dos procesos. En el primero se generan una serie de radicales (R^\bullet), a partir de un iniciador (I), mediante diversos métodos físicos o químicos con una constante cinética de disociación k_d ; radicales que en una segunda etapa pueden transferir su actividad al monómero mediante una adición al doble enlace, generando los radicales propagantes con una constante cinética de iniciación k_i . Se han desarrollado una gran variedad de métodos para la producción de radicales primarios. Entre los más utilizados están la acción del calor (descomposición térmica), y la acción de la radiación UV-visible.

➤ **Iniciación térmica.** Sustancias susceptibles de descomponerse térmicamente a velocidades razonables son aquellas que poseen enlaces con bajas energías de disociación. Estas descomposiciones presentan una gran dependencia con la temperatura, de forma que su rango de aplicación se limita a un pequeño intervalo de temperatura, siendo un criterio generalmente aceptado que la constante de velocidad para el proceso de descomposición varíe entre 10^{-4} - 10^{-6} s^{-1} . Entre los diversos iniciadores destacan la familia de los peróxidos y la familia de los azocompuestos, entre los que destaca el AIBN, muy

empleado debido a la ausencia de reacciones secundarias típicas de muchos peróxidos.

La velocidad de iniciación para una polimerización iniciada térmicamente según el esquema de polimerización radical:

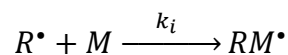
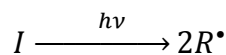


viene dada por:

$$V_i = 2fk_d[I] \quad (1)$$

donde el factor 2 se debe a la formación de dos radicales, f es el factor de eficiencia de la primera etapa de iniciación, k_d es la constante de velocidad de descomposición del iniciador y $[I]$ es la concentración de iniciador. Para la obtención de polímeros, las velocidades de iniciación suelen del orden de 10^{-7} - 10^{-9} mol L⁻¹s⁻¹, siendo $[I] \approx 10^{-2}$ - 10^{-4} mol l⁻¹, $k_d \approx 10^{-2}$ - 10^{-4} s⁻¹ y los valores del factor f varían entre 0.5 y 1 para los iniciadores más eficientes.

➤ **Iniciación fotoquímica.** La velocidad de iniciación para un esquema de iniciación fotoquímica como:

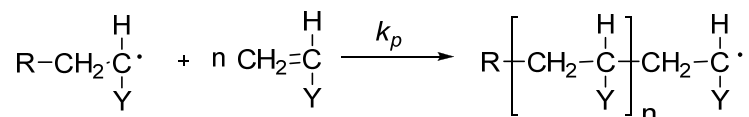


viene dada por:

$$V_i = 2\phi f' I_a \quad (2)$$

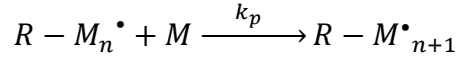
donde el factor 2 tiene el mismo significado que en la iniciación térmica, ϕ es el rendimiento cuántico en la formación de radicales por fotón absorbido y f' es la fracción de radicales que entra en la segunda reacción. La intensidad de luz absorbida, I_a , por el fotoiniciador viene dada por la ley de Lambert-Beer.

- **Propagación.** La propagación consiste en una secuencia de adiciones de extremos radicales al doble enlace de sucesivas unidades monoméricas.



Desde el punto de vista cinético, la primera cuestión a dilucidar es si la reactividad de las especies propagantes depende de la longitud de la cadena. Desde el inicio de la polimerización existe una distribución de tamaños de especies propagantes que, debido a ese tamaño diferente, no tienen la misma capacidad de moverse en el medio, sobre todo a medida que este se va haciendo más viscoso, como suele ocurrir a altas conversiones. Se podría pensar que a altas conversiones, y por tanto a altas viscosidades, la propagación podría ser un fenómeno gobernado por la difusión y depender por tanto del tamaño de cadena. Se ha demostrado que para sistemas en presencia de disolvente, donde se controla la viscosidad, este efecto no es importante en la propagación ya que los diversos macrorradicales pueden verse afectados por la difusión. El otro componente de la propagación, es el monómero, siendo este una molécula pequeña y por tanto de gran movilidad. Esta simplificación permite introducir una única constante de velocidad para la reacción de propagación, lo que facilita el desarrollo cinético del proceso.

Así en general, la reacción de propagación puede expresarse mediante el siguiente esquema:



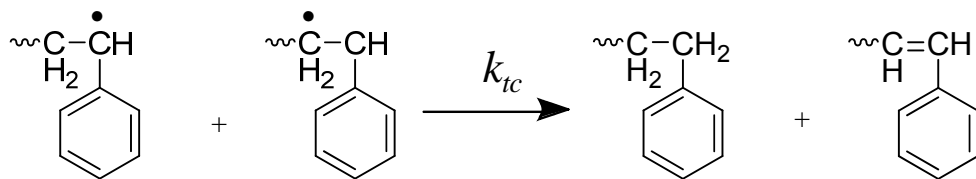
● **Terminación.** Los radicales pueden terminar con su actividad en las llamadas reacciones de terminación natural y en las de transferencia de cadena.

➤ **Terminación natural.** Dos radicales en crecimiento se encuentran en la masa reaccionante dando lugar a una o dos cadenas que no presentan radicales en sus extremos.

a) En un primer caso, los dos radicales forman un enlace covalente entre las dos cadenas en crecimiento, generando una única nueva cadena. Este tipo de terminación se denomina **por combinación** con una constante cinética k_{tc} .



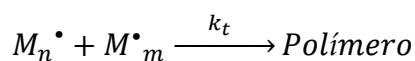
b) Por el contrario, dos radicales en crecimiento pueden dar lugar a dos cadenas diferenciadas, en un tipo de terminación que se denomina **desproporción** y que implica la transferencia de un átomo de hidrógeno y la formación de un doble enlace terminal en una de las cadenas. La constante cinética que gobierna este proceso se denomina k_{td} .



Se admite, en general, que la mayoría de los monómeros vinílicos terminan predominantemente por combinación, sin que ello excluya un mínimo porcentaje de desproporción^{96, 98}. Estas terminaciones están muy condicionadas por las posibilidades de difusión de las cadenas en crecimiento en el medio de alta viscosidad en el que se va convirtiendo la masa reaccionante. La reacción química entre los macrorradicales es un proceso rápido, mientras la difusión de las cadenas de diverso tamaño es relativamente lento. Para la situación en que la difusión empieza a ser un factor limitante, la constante de velocidad para la terminación puede expresarse como:

$$\frac{1}{k_t} = \frac{1}{k_t^{quim}} + \frac{1}{k_t^{dif}} \quad (3)$$

siendo k_t^{quim} la constante de velocidad para la reacción química entre radicales y k_t^{dif} la constante de velocidad para el proceso gobernado por la difusión de los radicales en el medio. Debido a la complejidad de los fenómenos de difusión y su evolución con la conversión, hoy en día no existe un modelo único que sea capaz de explicar la dependencia de la constante de terminación con los mecanismos de difusión. Sin embargo, los resultados experimentales de muchos sistemas polimerizables han permitido constatar que aunque el proceso de terminación natural está gobernado por la difusión, su comportamiento microscópico o experimental permite suponer que la constante de velocidad de la terminación natural se comporta como si de una reacción química se tratara^{96, 98, 99} y por tanto tenemos:

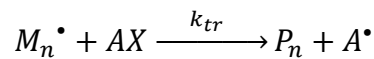


Si se considera la terminación natural independiente de la longitud de la cadena, la expresión para su velocidad viene dada por:

$$-\frac{d[M^{\bullet}]}{dt} = 2k_t[M^{\bullet}]^2 \quad (4)$$

siendo $k_t = k_{tc} + k_{td}$, suma de las constantes de terminación por combinación y desproporción y $[M^{\bullet}]$ la concentración total de radicales.

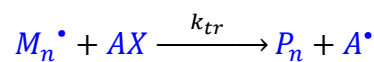
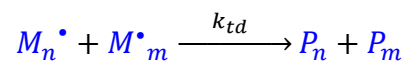
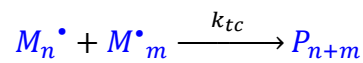
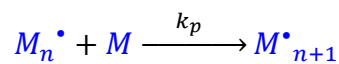
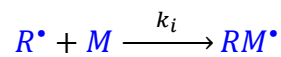
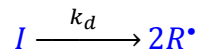
➤ *Terminación por transferencia de cadena.* La otra forma de terminar con la actividad de una cadena en crecimiento es la transferencia de cadena cuyo esquema es:



Los agentes de transferencia (AX) acaban con la actividad radicalaria de una cadena en crecimiento al transferirle un átomo o grupo. Estos agentes tienen un origen diverso (monómero, iniciador, polímero, disolvente, impurezas u otros agentes) y el átomo transferido más habitualmente es el átomo de hidrógeno, lo que se consigue desde moléculas que tengan grupos S-H, P-H, Sn-H, etc. Dos efectos importantes se desprenden de estos procesos⁹⁶. Por un lado afectan al peso molecular o distribución del peso molecular al formarse una nueva molécula de polímero. El segundo efecto tiene que ver con el hecho de que el nuevo radical puede iniciar una nueva cadena influenciando así la velocidad de reacción.

2.4.4. Velocidad de reacción en la polimerización radical

Resumiendo todo lo expresado en el apartado anterior, un esquema clásico de la polimerización radical consta de los siguientes procesos:



La formación de polímero es sinónimo del consumo de monómero, por tanto, la velocidad a la que desaparece el monómero expresa la velocidad de reacción. Así, la velocidad de reacción viene dada por:

$$V_p = -\frac{d[M]}{dt} = k_i[R^\bullet][M] + k_p[M^\bullet][M] \quad (5)$$

si se supone que las cadenas que se forman son largas, se puede considerar que casi todo el monómero se consume en la etapa de propagación quedando la ecuación (5) como:

$$V_p = -\frac{d[M]}{dt} \cong k_p[M^\bullet][M] \quad (6)$$

Se ha demostrado experimentalmente que la aproximación del estado estacionario con respecto a la concentración de especies radicales es una suposición bien fundada y que se alcanza en pocos segundos^{96, 98, 99}. Al no haber pérdida de radicales desde el punto de vista cinético, el proceso de desaparición queda limitado a las terminaciones naturales:

$$V_i = V_t - \frac{d[M^\bullet]}{dt} = 2(k_{tc} + k_{td})[M^\bullet]^2 = 2k_t[M^\bullet]^2 \quad (7)$$

Despejando la concentración de radicales de la ecuación (7),

$$[M^\bullet] = \left(\frac{V_i}{2k_t}\right)^{1/2} \quad (8)$$

que sustituida en la ecuación (6) permite obtener la velocidad de polimerización:

$$-\frac{d[M]}{dt} = V_p = \frac{k_p}{(2k_t)^{1/2}} (V_i)^{1/2} [M] \quad (9)$$

donde V_i es la velocidad de iniciación, que puede tomar formas diversas según el tipo de iniciación. Así, si la reacción es iniciada térmicamente la velocidad de reacción viene dada por la sustitución en la ecuación (9) de la expresión para la velocidad de iniciación, ecuación (1), y la consideración de que la concentración de iniciador disminuye con el tiempo de forma exponencial, de acuerdo a un proceso de primer orden:

$$-\frac{d[M]}{dt} = V_p = \frac{k_p}{k_t^{1/2}} (fk_d[I_0]e^{-kat})^{1/2} [M] \quad (10)$$

siendo $[I_0]$ la concentración inicial de iniciador. Este sencillo mecanismo, también denominado ideal, se ha verificado para una gran cantidad de polimerizaciones a concentraciones de monómero no inferiores a 3 M. Sin embargo, la gran cantidad de

sistemas estudiados ha llevado a la conclusión de que este proceso no es tan simple como aparenta, siendo las principales causas de desviación las dependencias de las constantes de propagación y terminación con los procesos de difusión. Estas desviaciones suelen producirse cuando la concentración de los macrorradicales es muy alta y, por tanto la viscosidad también, como suele ocurrir en la polimerización en masa (total ausencia de disolvente).

2.4.5. *Peso molecular y factores que afectan a su distribución*

La otra gran magnitud, además de la velocidad de reacción, que, por su naturaleza, lleva mucha información concerniente a la cinética de una polimerización es el peso molecular. En los polímeros esta magnitud no adquiere un valor único como en los compuestos químicos convencionales, sino que está dado por una distribución de valores alrededor de un parámetro que es el más probable, para la concentración de monómeros, la funcionalidad y las condiciones de reacción^{98, 99}. Dado que no hay un único valor de peso molecular, será necesario definir un valor medio (o más propiamente dicho, el valor más probable) y la distribución de valores alrededor del mismo. La distribución de peso molecular presenta, en la mayoría de los casos, forma de campana de Gauss (Fig. 14).

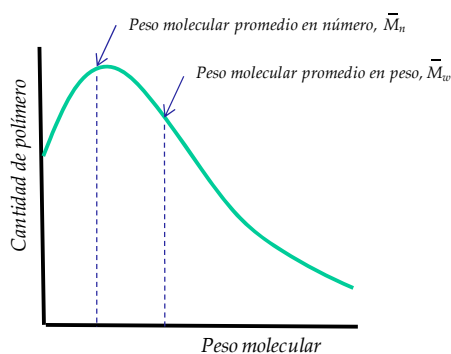


Fig. 14. Distribución de pesos moleculares en una muestra polimérica genérica

Existen varias maneras de expresar aritméticamente el peso molecular, la más sencilla calcula el promedio, dividiendo el peso total de polímero obtenido por la suma de los pesos de cada molécula multiplicada por el número de moléculas. Es decir, es un promedio calculado sobre el número de moléculas y se denomina *peso molecular promedio en número* (\bar{M}_n).

$$\bar{M}_n = \frac{w_t}{\sum_i n_i} \quad (11)$$

donde w_t representa la masa total de polímero y n_i el número de moléculas de cada especie i .

Si expresamos w_t como la suma de los pesos de cada fracción:

$$w_t = \sum_i n_i M_i \quad (12)$$

el peso molecular promedio en número sería:

$$\bar{M}_n = \frac{\sum_i n_i M_i}{\sum_i n_i} \quad (13)$$

Una metodología de cálculo que acerca el valor del peso molecular a parámetros más reales es la que considera la fracción de peso de cada especie existente; de esta manera se obtiene el valor del peso molecular promedio en peso (\bar{M}_w). Está basado en el hecho de que una molécula más grande contiene más cantidad de la masa total de la muestra polimérica que las moléculas pequeñas. Por tanto, se define un factor de peso X_i como:

$$X_i = \frac{M_i}{M_T} \quad (14)$$

donde M_i es la masa de la especie i y M_T es la masa total de polímero. Por tanto, el peso molecular promedio en peso puede expresarse de diferentes formas:

$$\bar{M}_w = \sum_i n_i \frac{M_i}{M_T} M_i \quad (15)$$

$$\bar{M}_w = \frac{\sum_i n_i M_i^2}{\sum_i n_i M_i} \quad (16)$$

$$\bar{M}_w = \sum_i X_i M_i \quad (17)$$

Debido a que en la realidad el peso molecular másico es siempre mayor que el numérico, el cociente \bar{M}_w/\bar{M}_n resulta en un valor que siempre es mayor que 1. Este parámetro se define como *índice de polidispersidad* de un polímero, y viene dado por:

$$\bar{M}_w/\bar{M}_n = p \text{ (dispersión)} \geq 1 \quad (18)$$

Un cociente igual a la unidad es el resultado de que todas las cadenas poliméricas son idénticas y tienen el mismo peso estadístico, siendo esto una idealidad. Cuanto más se aleje el valor de la unidad, mayor será la anchura de la distribución de pesos moleculares.

Para evaluar los *factores que afectan a la distribución de pesos moleculares en una reacción de polimerización radical*, se comenzará definiendo la longitud de cadena cinética media ($\bar{\nu}$) o número promedio de moléculas de monómero consumidas por cada radical primario que participe activamente en la propagación. La expresión para la longitud de cadena viene dada por la relación entre la velocidad instantánea de desaparición del monómero (V_p) y la producción también instantánea de radicales implicados en la iniciación (V_i)^{96, 99}:

$$\bar{v} = \frac{V_p}{V_i} \quad (19)$$

Aplicando la hipótesis del estado estacionario, la ecuación (19) toma la forma:

$$\bar{v} = \frac{V_p}{V_i} = \frac{V_p}{V_t} = \frac{k_p[M][M^\bullet]}{2k_t[M^\bullet]^2} = \frac{k_p[M]}{2k_t[M^\bullet]} \quad (20)$$

que refleja el importante hecho de que *la longitud de la cadena es inversamente proporcional a la concentración de radicales*. Algo fácil de admitir intuitivamente pues a mayor número de radicales presentes, estos crecerán menos en presencia de la misma cantidad de monómero.

Como la magnitud experimentalmente medible es el peso molecular del polímero finalmente formado, sin actividad radicalaria alguna, es necesario relacionar la longitud de la cadena cinética con el grado de polimerización promedio en número, \bar{x}_n , o número promedio de moléculas de monómero existente por molécula de polímero formado. El grado de polimerización a su vez, está relacionado con el peso molecular promedio en número \bar{M}_n , mediante la ecuación:

$$\bar{x}_n = \frac{\bar{M}_n}{M_0} \quad (21)$$

siendo M_0 el peso molecular de la unidad repetitiva. Si en una primera aproximación se considera despreciable la contribución de las reacciones de transferencia, la relación existente entre la longitud de la cadena cinética y el grado de polimerización viene dada por:

$$\bar{x}_n = 2\bar{v}, \text{ terminación por combinación}$$

$$\bar{x}_n = \bar{v}, \text{ terminación por desproporción}$$

Sin embargo, los grados de polimerización medidos experimentalmente son generalmente inferiores a los que pueden predecirse teniendo solo en cuenta las terminaciones naturales. El responsable de este hecho es la existencia de reacciones de transferencia que compiten con la reacción de terminación. Si tenemos en cuenta todas las reacciones de terminación natural y de transferencia, el grado de polimerización, según la definición dada anteriormente, puede expresarse mediante la ecuación:

$$\bar{x}_n = \frac{-\frac{d[M]}{dt}}{\sum V_t} = \frac{k_p[M][M^*]}{(2k_{td} + k_{tc})[M^*]^2 + k_{tr,m}[M][M^*] + k_{tr,i}[I][M^*] + k_{tr,d}[D][M^*]} \quad (22)$$

donde se incluyen las constantes de los procesos denominados de transferencia al monómero (C_m), al iniciador (C_i) y al disolvente (C_d), definidas como:

$$C_m = \frac{k_{tr,m}}{k_p} \quad C_i = \frac{k_{tr,i}}{k_p} \quad C_d = \frac{k_{tr,d}}{k_p} \quad (23)$$

A partir de estas constantes se define el siguiente parámetro:

$$y = \frac{k_{td}}{k_{td} + k_{tc}} \quad (24)$$

que refleja la proporción relativa de terminación por desproporción en el proceso global de terminación natural. Si además se sustituye la concentración de especies radicales por:

$$[M^*] = \frac{V_p}{k_p[M]} \quad (25)$$

la ecuación (22) se puede transformar en la siguiente expresión general:

$$\frac{1}{\bar{x}_n} = \frac{(1 + \gamma)k_t V_p}{k_p^2 [M]^2} + C_m + C_i \frac{[I]}{[M]} + C_d \frac{[D]}{[M]} \quad (26)$$

En esta ecuación, las concentraciones de monómero, iniciador y disolvente son instantáneas. La ecuación (26) se usa a bajas conversiones para poder usar sin mucho error las concentraciones inicialmente presentes. La ecuación (26) es muy útil para obtener una gran cantidad de información sobre el sistema si se manipula adecuadamente. En una polimerización con iniciación térmica, en masa (ausencia de disolvente), usando las expresiones anteriormente desarrolladas, la ecuación (26) se transforma en:

$$\frac{1}{\bar{x}_n} = \frac{(1 + \gamma)k_t V_p}{k_p^2 [M]^2} + C_m + C_i \frac{k_t V_p^2}{f k_d k_p^2 [M]^3} \quad (27)$$

Una representación, frente a la velocidad de polimerización, del inverso del grado de polimerización obtenido experimentalmente para polimerizaciones llevadas a cabo a distintas concentraciones de iniciador y bajas conversiones, permite discernir la existencia o no de transferencia al iniciador en el intervalo observado. Si en dicho intervalo $C_i \approx 0$, la representación será lineal; mientras que si $C_i \neq 0$, dicha representación será parabólica. Experimentos de este tipo han sido hechos para muchos iniciadores entre los que se encuentra el AIBN. Este iniciador presenta una constante de transferencia nula, por lo que se considera al AIBN como una especie de iniciador ideal. Con iniciadores de este tipo la ecuación (27) se transforma en:

$$\frac{1}{\bar{x}_n} = \frac{(1 + \gamma)k_t V_p}{k_p^2 [M]^2} + C_m \quad (28)$$

A partir de esta ecuación es posible determinar el factor $(1+\gamma) k_t/k_p^2$ de la pendiente y C_m de la ordenada en el origen. Para una gran cantidad de monómeros C_m suele ser muy pequeña¹⁰⁰, no siendo muy apreciable su contribución a la reducción del peso molecular.

La obtención de la constante de transferencia a iniciadores que no tengan constante nula se hace en ausencia de disolvente y requiere la manipulación de la ecuación (26) para obtener:

$$\frac{1}{\bar{x}_n} - \frac{(1+y)k_t V_p}{k_p^2 [M]^2} = C_m + C_i \frac{[I]}{[M]} \quad (29)$$

donde $(1+y) k_t/k_p^2$ puede ser previamente conocido mediante el uso de iniciadores ideales (como el AIBN). En general las constantes C_i tampoco suelen tener valores muy altos¹⁰⁰ aunque no por ello despreciables.

La presencia de disolventes u otros agentes específicos de transferencia generan un mayor efecto sobre el peso molecular. Para determinar su constante de transferencia se aplica la ecuación general (26), reordenada convenientemente y usando parámetros calculados previamente, como se ha comentado en párrafos anteriores. Las constantes de transferencia a una gran cantidad de disolventes se encuentran tabuladas¹⁰⁰. Se dispone de un amplio intervalo de constantes que, introducidas en las ecuaciones anteriores, proporcionan la posibilidad de regular el peso molecular del polímero a obtener.

Existen pocos mecanismos confirmados del proceso de transferencia al polímero, que en general solo se produce a altas conversiones, produciendo estructuras ramificadas. Su incidencia en la regulación del peso molecular es, sin embargo, muy baja.

2.4.6. Inhibición y retardo en la polimerización radical

Desde el principio del estudio de las polimerizaciones radicales se observó el hecho de que la adición de ciertas sustancias, la presencia de impurezas o moléculas

casi inevitables como el oxígeno, tenían unos efectos notables sobre la polimerización, llegando hasta la supresión de la misma. En función del efecto causado estas sustancias se clasifican como inhibidores o retardadores. Los inhibidores son capaces de destruir rápida y eficientemente las especies iniciadoras o propagantes impidiendo la progresión de las mismas. Los retardadores son sustancias que, al reaccionar con las especies propagantes, generan nuevos radicales con una inferior reactividad frente al monómero, de forma que la polimerización progresa sin llegar a detenerse pero con velocidades inferiores. Los retardadores presentan en general mecanismos complicados y de diversa naturaleza.

Los inhibidores son sustancias que tienen muchas aplicaciones, pudiéndose utilizar como estabilizadores en los monómeros comerciales para evitar que polimericen en su almacenamiento. Este uso hace que haya que eliminar estos estabilizantes por diferentes procedimientos. Los inhibidores se utilizan también como método de detención de la reacción, mediante la adición de un exceso de los mismos al sistema. Los inhibidores más utilizados son la quinonas, hidroquinonas y sus derivados.

Un inhibidor importante es el O_2 disuelto en el medio de reacción. El O_2 presenta una elevada constante en su reacción con los radicales, que puede situarse en unas 10^4 veces superior a la constante de propagación media de los monómeros. Por ello, la presencia de O_2 llega a inhibir completamente la polimerización o a retardarla en función de la concentración de O_2 que haya en el medio. En algunos sistemas se ha detectado incluso la formación de copolímeros de bajo peso molecular de monómero y O_2 ⁹⁶. Esto da una idea de la importancia que tiene la eliminación del O_2 en el medio de reacción.

Entre los inhibidores, existen algunos que tienen la particularidad de ser radicales estables, a las temperaturas corrientemente utilizadas en polimerización, es

de destacar el radical 2,2,6,6, tetrametil-1-piperidiniloxi (TEMPO) que presenta la siguiente estructura (Fig. 15):

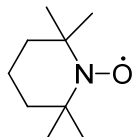


Fig. 15. Estructura molecular del inhibidor 2,2,6,6, tetrametil-1-piperidiniloxi (TEMPO)

Estos radicales se han utilizado, bajo determinadas condiciones, para estudiar el proceso de iniciación. Si se considera que, debido a su naturaleza radical, reaccionan con los radicales provenientes de la iniciación para formar aductos incapaces de posteriores reacciones y que lo hacen mediante una estequiometría 1:1, la desaparición de estos inhibidores puede relacionarse con la velocidad de iniciación según:

$$-\frac{d[Inh]}{dt} = V_i = 2fk_d[I] \quad (30)$$

La velocidad de desaparición del iniciador puede seguirse por ultravioleta. Con estas experiencias si se conoce k_d se puede conocer la eficiencia de la iniciación f .

2.5. Copolimerización radical

2.5.1. Introducción

La copolimerización de apropiadas mezclas de monómeros permite la obtención de una gran variedad de polímeros con diferentes topologías, funcionalidades y materiales híbridos con propiedades muy diversas^{99, 101}. Pueden

obtenerse copolímeros estadísticos, alternantes en bloque, en injerto y otras topologías que se muestran en la Fig. 16.

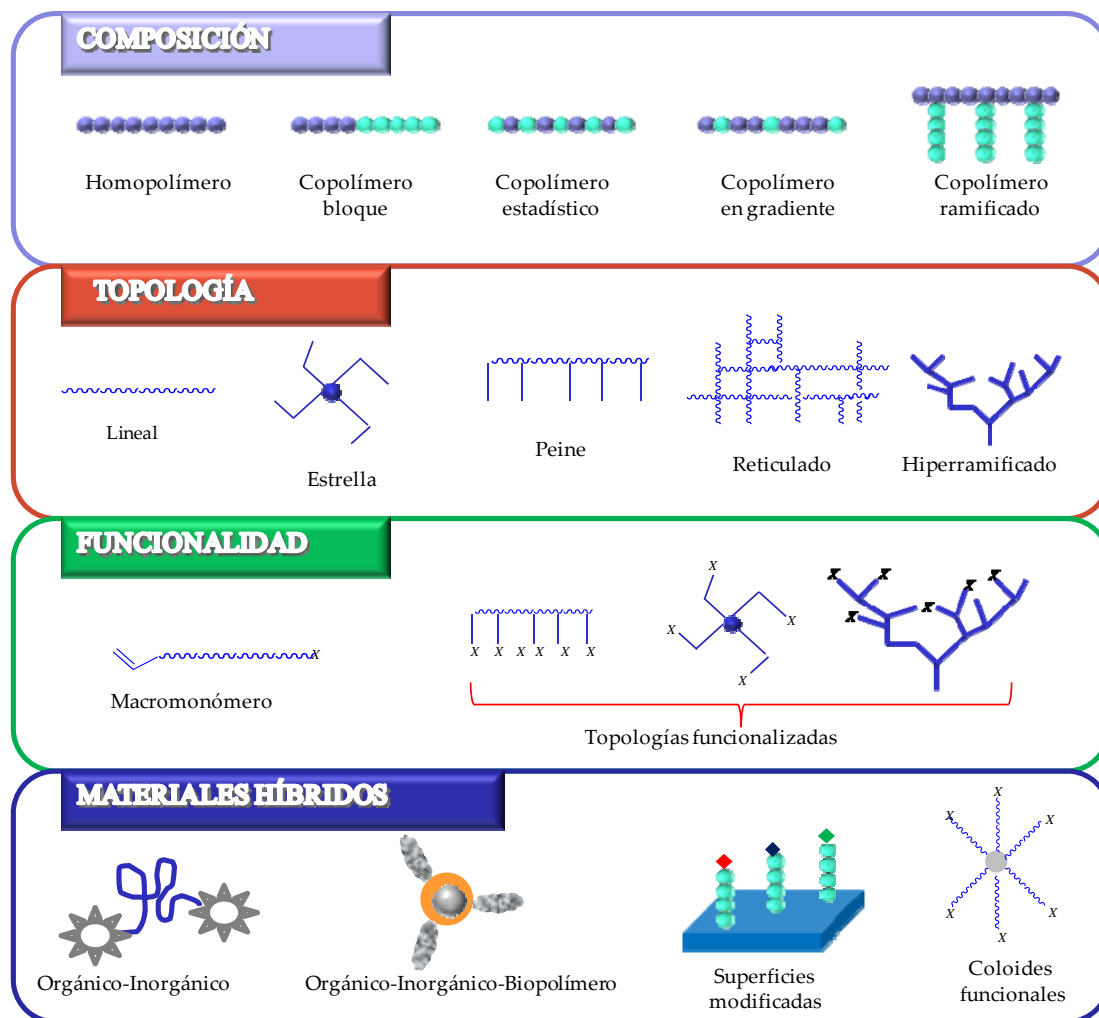


Fig. 16. Estructuras poliméricas obtenidas mediante copolimerización radical

Mediante la polimerización radical convencional las topologías poliméricas que se pueden obtener con éxito son solo polímeros estadísticos y alternantes, y algunos materiales híbridos que no requieren un control preciso de la composición y funcionalidad polimérica, debido a que las reacciones de terminación o transferencia de cadena^{96, 99} compiten con el propio crecimiento de la cadena. Sin embargo en los últimos años, se han descubierto una serie de procesos por vía radical (denominados

bajo el término *polimerización radical controlada* (**PRC**)) que permiten la obtención de las demás topologías.

La importancia de estas copolimerizaciones en cadena puede resumirse en dos aspectos fundamentales. En primer lugar, la copolimerización permite estudiar o comparar reactividades entre los diferentes monómeros, reactividades que deben sus diferencias a las diferentes estructuras químicas. En segundo lugar, el proceso de copolimerización permite la formación de nuevos tipos de polímeros que participan de las propiedades de los homopolímeros correspondientes. En función de la cantidad de cada monómero en la cadena polimérica, las propiedades del copolímero varían gradualmente, aunque ello no debe entenderse que lo hacen de forma lineal. Por tanto, un adecuado control del proceso puede permitir la síntesis de copolímeros con propiedades a medida de la aplicación concreta en la que se desee utilizarlos.

Un modelo que describa adecuadamente el proceso de copolimerización debe ser capaz de predecir la composición global de copolímero. Debe ser también capaz de predecir la velocidad global del proceso y la distribución de secuencias de los comonómeros (microestructura), ya que una misma composición global puede ser el resultado de muchas posibles combinaciones de monómeros a lo largo de las cadenas que se forman. Velocidad y microestructura pueden también ir cambiando a lo largo del proceso de polimerización al ir variando la relación o proporción entre las cantidades de monómeros que quedan por reaccionar (alimentación), debido a la diferente reactividad de los mismos.

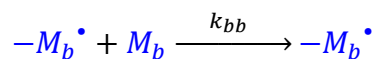
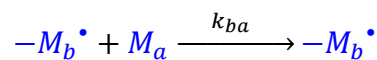
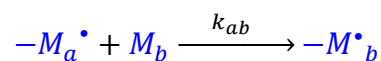
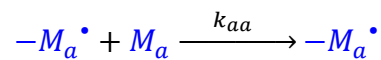
La complejidad de todas estas dependencias ha obligado a la introducción de numerosas simplificaciones a la hora de dar lugar a los diferentes modelos que expliquen el proceso. Esto hace que la modelización de la copolimerización siga siendo hoy en día un problema abierto.

2.5.2. Modelo terminal

El modelo terminal se basa en tres premisas bien definidas:

1. La reactividad de las cadenas propagantes solo depende de la reactividad de la última unidad de la cadena, siendo por tanto independiente de la composición previa de la misma.
2. Las cadenas de copolímero formadas son lo suficientemente largas como para desechar la influencia de los procesos de iniciación y de terminación, dando solo importancia a las reacciones de propagación.
3. Las reacciones de copolimerización son irreversibles (esta es una suposición que ha sido experimentalmente bien asentada y corroborada).

Se puede considerar que en una copolimerización de dos monómeros distintos M_a y M_b se pueden dar cuatro reacciones distintas de propagación:



Las velocidades de consumo o desaparición de los monómeros M_a y M_b en la mezcla reactiva (o alimentación) son sinónimas de las velocidades a las que ambos monómeros entran a formar parte del copolímero. Por tanto la relación entre ambas velocidades de desaparición expresa la composición del copolímero que, en primera aproximación, puede escribirse como:

$$\frac{-\frac{d[M_a]}{dt}}{-\frac{d[M_b]}{dt}} = \frac{k_{aa}[M_a^\bullet][M_a] + k_{ba}[M_b^\bullet][M_a]}{k_{ab}[M_a^\bullet][M_b] + k_{bb}[M_b^\bullet][M_b]} \quad (31)$$

La ecuación (31) representa la composición instantánea del copolímero. Aplicando la hipótesis del estado estacionario es posible eliminar las especies propagantes. Para ello se aplicará la hipótesis del estado estacionario a cada una de las especies propagantes. Considerando las cuatro reacciones posibles que se acaban de proponer para la copolimerización, es obvio que la primera y la cuarta no suponen variación en la concentración de las especies activas terminadas en M_a o M_b , mientras que sí lo hacen los procesos de interconversión (reacciones segunda y tercera). Por tanto, las velocidades de estos últimos procesos deben ser iguales para que las concentraciones de especies reactivas permanezcan constantes:

$$k_{ba}[M_b^\bullet][M_a] = k_{ab}[M_a^\bullet][M_b] \quad (32)$$

La misma ecuación se obtiene desde la óptica de M_a como de M_b . Despejando $[M_a^\bullet]$ de la ecuación (32) y sustituyendo en la ecuación (31) se obtiene:

$$\frac{d[M_a]}{d[M_b]} = \frac{\frac{k_{aa}k_{ba}[M_b^\bullet][M_a]^2}{k_{ab}[M_b]} + k_{ba}[M_b^\bullet][M_a]}{k_{bb}[M_b^\bullet][M_b] + k_{ba}[M_b^\bullet][M_a]} \quad (33)$$

Dividiendo por $k_{ba}[M_b^\bullet][M_a]$ e introduciendo las relaciones de reactividad de los monómeros, definidas mediante las relaciones de constantes,

$$r_a = \frac{k_{aa}}{k_{ab}} \quad (34)$$

$$r_b = \frac{k_{bb}}{k_{ba}} \quad (35)$$

la ecuación (33) puede transformarse en:

$$\frac{d[M_a]}{d[M_b]} = \frac{[M_a](r_a[M_a] + [M_b])}{[M_b]([M_a] + r_b[M_b])} \quad (36)$$

que es una primera expresión para la llamada *ecuación de composición instantánea del copolímero*. Las relaciones r_a y r_b reflejan la tendencia de cada uno de los monómeros a copolimerizar consigo mismo o con el otro monómero. Un valor de $r_a > 1$ significa que la especie propagante $[M_a^*]$ prefiere añadir el monómero M_a antes que añadir el M_b . Un valor de $r_a < 1$, significa que añade preferentemente M_b . Un valor de $r_a = 0$ significa que la especie $[M_a^*]$ siempre añade el monómero M_b . Es también evidente que cuando ambas reacciones de reactividad sean iguales a uno, a cada extremo propagante le da lo mismo reaccionar consigo mismo o con el otro, pero que en los demás casos hay una tendencia definida que puede ir alterando la composición inicial de la mezcla de monómeros a lo largo del tiempo.

La ecuación de composición (36) puede expresarse en función de las fracciones molares de la alimentación y de la composición del copolímero. Y así, si se introduce la fracción molar (instantánea) de M_a en la alimentación (f_a) y en el copolímero que se está formando (F_a), como:

$$f_a = \frac{[M_a]}{[M_a] + [M_b]} \quad (37)$$

y

$$F_a = \frac{d[M_a]}{d[M_a] + d[M_b]} \quad (38)$$

la ecuación (36) puede convertirse en una nueva expresión para la ecuación instantánea de composición:

$$F_a = \frac{r_a f_a^2 + f_a f_b}{r_a f_a^2 + 2f_a f_b + r_b f_b^2} \quad (39)$$

La ecuación (39) también puede expresarse en función de las fracciones molares de M_b , ya que solo participan dos monómeros y la suma de las fracciones molares en la alimentación y en el copolímero debe ser igual a uno. De nuevo la ecuación (39) relaciona la composición del copolímero que se está formando en un instante dado a expensas de las concentraciones relativas de monómero que existen en ese momento en la alimentación.

2.5.3. Tipos de copolimerizaciones

La observación de la ecuación de composición permite la predicción de una serie de comportamientos en función de que las relaciones de reactividad adopten una serie de valores determinados. Si $r_a r_b = 1$, este caso se conoce como *polimerización ideal*. En este caso una de las relaciones de reactividad es el inverso de la otra:

$$r_a = \frac{1}{r_b} \quad (40)$$

Sustituyendo esta condición en la ecuación (36), se obtiene:

$$\frac{d[M_a]}{d[M_b]} = \frac{r_a[M_a]}{[M_b]} \quad (41)$$

o, en función de fracciones molares, sustituyendo en la ecuación (39),

$$F_a = \frac{r_a f_a}{r_a f_a + f_b} \quad (42)$$

En el caso particular de que $r_a=r_b=1$, ambos monómeros tienen igual preferencia hacia las especies propagantes, colocándose de una manera completamente al azar en la cadena, obteniéndose un copolímero cuya composición global es idéntica a la de la alimentación. Otro caso relevante es cuando ambas relaciones de reactividad son nulas $r_a=r_b=0$, lo que hace que su producto sea también nulo. Ello es tanto como decir que ambas especies propagantes prefieren añadir el otro monómero antes que el propio. Como consecuencia de ello los monómeros entran en el copolímero de forma perfectamente alternada y por tanto en cantidades equimolares. La ecuación de composición se reduce a:

$$\frac{d[M_a]}{d[M_b]} = 1 \quad (43)$$

o, lo que es igual $F_a=0.5$. Otro caso particular reseñable responde al hecho de que ambas relaciones de reactividad sean mayores que 1. En ese caso, ambas especies propagantes tienen una mayor preferencia por su propio monómero, conduciendo a la formación de bloques de la misma unidad. Por último, puede reseñarse la existencia de otros casos particulares, tales como $r_a \gg r_b$ o $r_a \gg 1$ y $r_b \ll 1$. En estas circunstancias, las especies más reactivas tienden a adicionar su propio monómero hasta agotar el mismo, favoreciéndose una homopolimerización. Cuando el monómero más reactivo se acaba, comienza la homopolimerización del otro monómero que había permanecido prácticamente sin reaccionar.

La mayoría de las parejas de monómeros copolimerizables presentan valores de las relaciones de reactividad cuyo producto se sitúa entre cero y uno. La Fig. 17 ilustra la evolución de la composición del copolímero generado en cada instante a medida que la composición de la alimentación va variando como consecuencia de los diferentes valores relativos de las relaciones de reactividad.

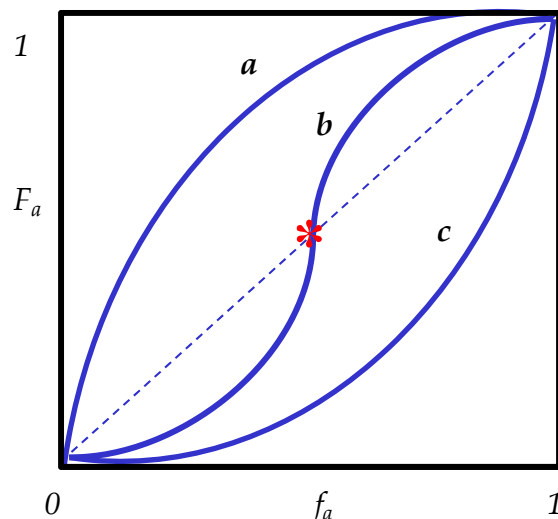


Fig. 17. Evolución de la composición instantánea del copolímero en tres situaciones distintas: **a)** $r_a > 1, r_b < 1$; **b)** $r_a < 1, r_b < 1$; **c)** $r_a < 1, r_b > 1$. El asterisco indica la composición azeotrópica

Cuando r_a y r_b son menores que 1, las curvas F_a vs f_a , cortan a la línea bisectriz ($r_a=r_b=1$) de dichas representaciones en un punto, coordenadas en las que la composición del copolímero y de la alimentación es la misma. Una composición que se inicia con esa composición de la alimentación transcurriría sin que dicha alimentación sufriera cambios a lo largo del tiempo, obteniéndose un copolímero muy homogéneo en composición, con un valor de esta idéntico a la alimentación. Las condiciones en las que ocurre este tipo de copolimerizaciones, se denomina azeotrópicas.

Las condiciones en las que ocurre este tipo de copolimerizaciones azeotrópicas vienen dadas por la sustitución de la expresión:

$$\frac{d[M_a]}{d[M_b]} = \frac{[M_a]}{[M_b]} \tag{44}$$

o, lo que es lo mismo, $F_a=f_a$, en la ecuación de composición (39), obteniéndose:

$$f_a = \frac{1 - r_b}{2 - r_a - r_b} \quad (45)$$

Para la mayoría de los monómeros comerciales, existen tabuladas una gran cantidad de relaciones de reactividad calculadas por diferentes metodologías experimentales para un gran número de copolimerizaciones¹⁰⁰. Esto permite la modelización teórica de la copolimerización de muchos sistemas, aportando una herramienta de mucha utilidad a la hora de seleccionar los monómeros más convenientes y adecuados para la formación de un copolímero con la topología y propiedades químico-físicas deseadas.

2.5.4. Variación de la composición con la conversión

Como anteriormente se ha mencionado, la ecuación de composición del copolímero está obtenida en función de las concentraciones instantáneas de los monómeros existentes en la alimentación sin reaccionar. A medida que la reacción progresa, la alimentación varía ya que, en general, alguno de los monómeros entra preferentemente en el copolímero, produciéndose un enriquecimiento de la mezcla o alimentación en el monómero más reactivo. Este hecho ocurre para todas las copolimerizaciones excepto para las que se dan en condiciones azeotrópicas. Desde el punto de vista práctico, y dado que generalmente las copolimerizaciones deben llevarse hasta conversiones elevadas, es interesante simular como va variando la composición del copolímero a medida que la reacción progresa.

No suele ser interesante el que un copolímero contenga una gran variedad de diferentes composiciones, ya que lo normal es que sean mutuamente inmiscibles.

Esta inmiscibilidad favorece la existencia de sistemas separados en fases y esto es poco conveniente desde un punto de vista mecánico, de transparencia, de procesabilidad, de homogeneidad, etc.

Un método para analizar la variación de la composición con la conversión consiste en la aplicación de un balance de materia a los fenómenos de desaparición de uno de los comonómeros en la alimentación y su correspondiente inserción en el copolímero.

Supóngase un sistema que contiene un número total de M moles, sumados los de ambos comonómeros; supóngase también que el copolímero que se forma es más rico en uno de los comonómeros que la propia alimentación, es decir, se está asumiendo que $F_a > f_a$. Al cabo de un período de tiempo infinitesimal, cuando dM moles de los monómeros han copolimerizado, el copolímero contendrá $F_a dM$ moles de M_a y en la alimentación quedarán $(M-dM)(f_a-df_a)$ moles de M_a . La aplicación de un balance de materia al monómero M_a permite igualar la variación de la composición en la alimentación con los moles de M_a copolimerizados durante ese tiempo:

$$Mf_a - (M - dM)(f_a - df_a) = F_a dM \quad (46)$$

Despreciando el producto $df_a dM$, al ser el producto de dos infinitésimos, se puede integrar la ecuación (46) entre los valores que adoptan las variables correspondientes en el inicio de la copolimerización y en un instante cualquiera:

$$\int_{M_0}^M \frac{dM}{M} = \ln \frac{M}{M_0} = \int_{(f_a)_0}^{f_a} \frac{df_a}{F_a - f_a} \quad (47)$$

siendo M_0 y $(f_a)_0$ los valores iniciales de M y f_a respectivamente.

La ecuación (48) fue integrada por primera vez por Meyer y Lowry con el siguiente resultado:

$$1 - \frac{M}{M_0} = 1 - \left[\frac{f_a}{(f_a)_0} \right]^\alpha \left[\frac{f_b}{(f_b)_0} \right]^\beta \left[\frac{(f_a)_0 - \delta}{f_a - \delta} \right]^\gamma \quad (48)$$

donde aparecen nuevos parámetros que son únicamente dependientes de las relaciones de reactividad:

$$\alpha = \frac{r_b}{(1 - r_b)} \quad (49)$$

$$\gamma = \frac{(1 - r_a r_b)}{(1 - r_a)(1 - r_b)} \quad (50)$$

$$\beta = \frac{r_a}{(1 - r_a)} \quad (51)$$

$$\delta = \frac{1 - r_b}{2 - r_a - r_b} \quad (52)$$

Cabe resaltar que la expresión de δ coincide con las condiciones de polimerización azeotrópica. Ello hace que la integral, ecuación (47) y la ecuación integrada (48), no tengan solución, demostrando así la predicción de que en copolimerizaciones azeotrópicas la composición del copolímero no varía con la conversión.

En la Fig. 18 aparece un estudio real sobre la copolimerización de acrilato de metilo ($r_a=0.80$) y estireno ($r_b=0.19$). Dado que ambas relaciones de reactividad son inferiores a la unidad, el sistema posee una composición azeotrópica a un valor de $f_a=0.802$. Para esta composición (línea de puntos de la figura), la composición del copolímero es invariante con la conversión.

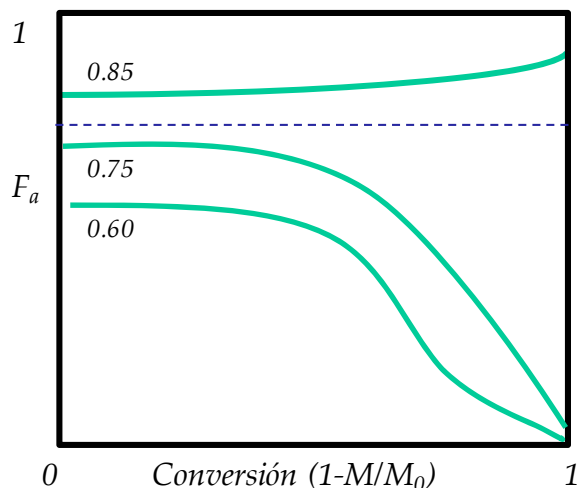


Fig. 18. Evolución de la composición instantánea de un copolímero de acrilato de metilo y estireno con la conversión a partir de diferentes composiciones iniciales del primero en la alimentación. La línea de puntos marca la composición azeotrópica

Gracias a los innumerables estudios realizados sobre la copolimerización, se han ido detectando ciertas discrepancias entre relaciones de reactividad obtenidas experimentalmente bajo el prisma del modelo terminal. Estas desviaciones se localizan en sistemas que contienen monómeros con una polaridad muy diferente o con sustituyentes voluminosos. Se trata en general de sistemas con una tendencia a la alternancia. Asimismo, la reversibilidad de ciertos sistemas, donde uno de los dos monómeros tiene tendencia a despropagarse, genera mecanismos controlados termodinámicamente que el modelo terminal no incluye en su desarrollo, ya que éste es puramente cinético. Por estas razones se han desarrollado otros modelos más complejos^{96, 99} por ejemplo, el modelo de la penúltima unidad y el modelo con participación de un complejo, para tener en cuenta las desviaciones mencionadas anteriormente.

2.6. Vías para la síntesis de MIPs

Los MIPs pueden ser sintetizados siguiendo dos posibles vías, en función del tipo de interacción que tenga lugar entre la molécula molde y los monómeros funcionales para formar el complejo de prepolimerización: *vía covalente* y *vía no covalente*.

Los MIPs obtenidos por *vía covalente* se basan en la interacción covalente entre la molécula molde y uno o varios monómeros funcionales usados en la polimerización. De esta forma, al extraer la molécula molde, estos grupos funcionales quedan libres y son susceptibles de volver a unirse con ella durante el proceso de reconocimiento molecular. Dentro de la síntesis de MIPs por vía covalente, existen muchas variedades. Una variante interesante y, últimamente muy utilizada en el reconocimiento selectivo de iones, es la que se basa en una reacción de complejación entre los monómeros funcionales y la molécula molde, que en este caso es un ión metálico que forma el complejo de prepolimerización por reacción de complejación con los monómeros funcionales¹⁰².

Normalmente, los principales problemas que presenta este tipo de MIPs son la dificultad de extraer la molécula molde así como el alto tiempo de respuesta necesario para el reconocimiento molecular.

Los MIPs obtenidos por *vía no covalente* se basan en interacciones no covalentes entre la molécula molde y los monómeros funcionales.

En este caso la concentración de **monómero funcional** juega un papel crucial en la adecuada formación del complejo de prepolimerización: un exceso de monómero funcional puede incrementar el número de interacciones no específicas, con la consiguiente disminución de la selectividad; a su vez, una baja concentración

de monómero funcional puede hacer que el fenómeno de impronta sea muy bajo, pudiendo llegar a ser nulo. Por tanto, la relación entre la molécula molde y el monómero debe ser optimizada en cada caso. En la Fig. 19 están representados los monómeros de tipo acrílico y vinílico más utilizados en la síntesis de MIPs.

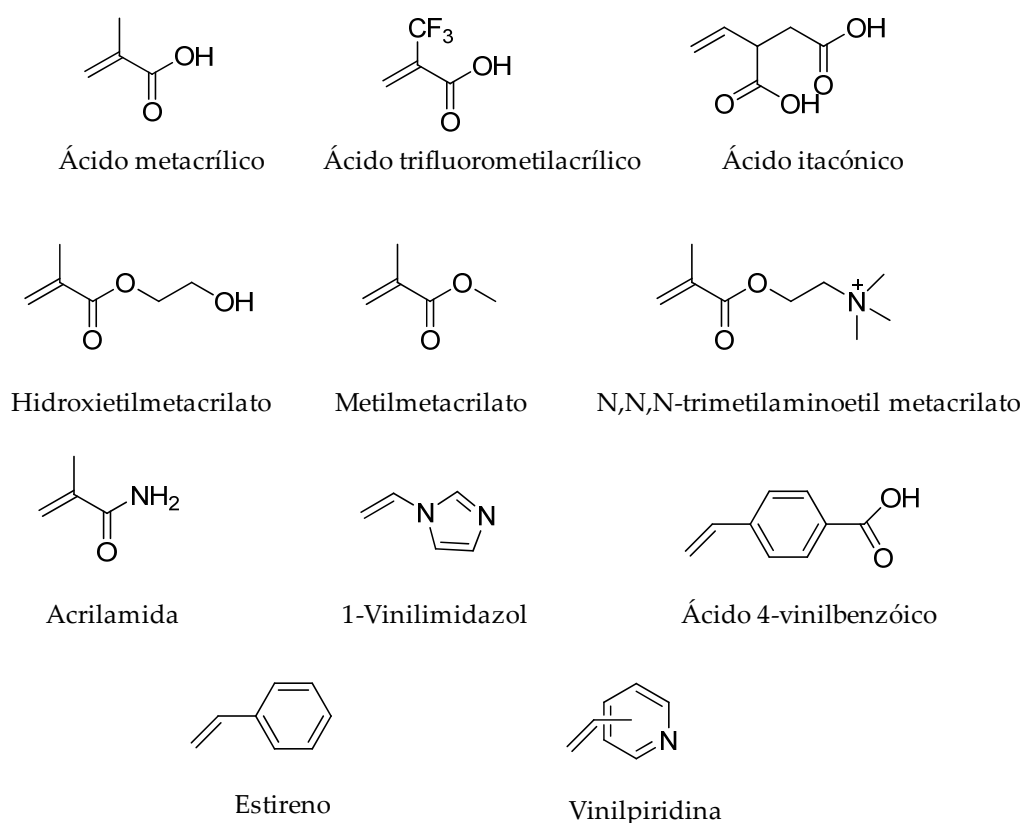
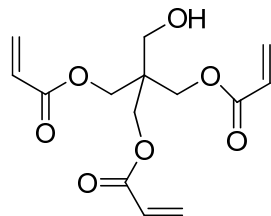


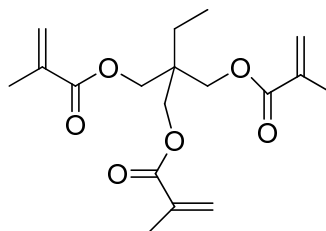
Fig. 19. Mónomeros funcionales usualmente empleados en la síntesis de MIPs

El **entrecruzador** es el responsable de la estructura final del MIP: estabiliza los sitios selectivos durante la polimerización, confiere rigidez y, por tanto estabilidad a los disolventes ya que evita la deformación o desestructuración de los sitios de unión debido a que el hinchamiento de polímeros altamente entrecruzados es nulo. También confiere a los polímeros estabilidad mecánica y térmica. Debido a esto el porcentaje de entrecruzador también es un parámetro a tener en cuenta. En la Fig. 20

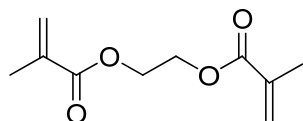
se pueden ver los entrecruzadores de tipo acrílico y vínilico más comúnmente empleados en la síntesis de MIPs.



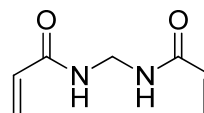
Pentaeritritol triacrilato (PETRA)



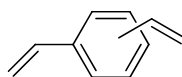
Trimetilpropano trimetacrilato (TRIM)



Etilenglicol dimetacrilato (EGDMA)



N,N'-Metilendiacrilamida



Divinilbenceno

Fig. 20. Entrecruzadores más empleados en la síntesis de MIPs

Por último, el **porógeno** o mezcla de los mismos (disolventes que forman poros al evaporarse) juegan un papel importantísimo en la formación y estabilización de la estructura porosa del MIP, además de permitir el medio de solubilización tanto de la molécula molde, los monómeros y las cadenas poliméricas en crecimiento que se van formando durante el proceso de polimerización. Asimismo, debe proveer un ambiente favorable para que se incrementen las interacciones no covalentes. Por tanto, también tienen que ser estudiados experimentalmente de forma adecuada.

La impronta molecular no covalente presenta una serie de ventajas que hacen que sea la más empleada:

- Las interacciones entre los monómeros y la molécula molde se obtienen de manera sencilla, basta simplemente con mezclarlos, lo que elimina la necesidad de etapas de síntesis previas a la formación del MIP.
- La extracción del molde es más sencilla al ser enlaces de menor energía.
- Su espectro de utilización puede extenderse a un elevado número de moléculas molde, tanto hidrofílicas como hidrofóbicas, ya que no se necesitan complejas reacciones de síntesis entre los monómeros funcionales y la molécula molde.

2.7. Técnicas para la síntesis de MIPs

Para la obtención de un MIP se puede utilizar cualquier tipo de reacción de polimerización de las comentadas en esta memoria (reacciones de polimerización por etapas y reacciones en cadena) así como diferentes estrategias para su formación. Las más usuales son las que se discutirán a continuación:

2.7.1. Polimerización en masa

Este es un tipo de polimerización en fase homogénea y consiste en mezclar todos los componentes de la polimerización (monómeros funcionales, entrecruzador e iniciador de radicales) junto con la molécula molde, en ausencia de disolvente.

Aquí, todos los componentes de la polimerización deben ser miscibles entre sí durante toda la polimerización.

2.7.2. Polimerización en disolución

Consiste en realizar la polimerización en presencia de un disolvente o mezcla de disolventes. Normalmente las polimerizaciones en disolución suelen llevarse a cabo a concentraciones monoméricas medias y altas: el porcentaje de monómeros suele estar entre el 25% y el 60% en masa con respecto a la masa de disolvente. En este tipo de polimerización todos los componentes de la polimerización deben ser miscibles en el disolvente o mezcla de disolventes. En la polimerización en disolución el disolvente es utilizado con diversos fines, dependiendo del tipo de polímero que se vaya a sintetizar.

En el caso de MIPs, al ser polímeros entrecruzados, el disolvente tiene dos funciones muy importantes. La primera es solvatar a las cadenas poliméricas en crecimiento en todo momento, para que puedan crecer en todas las direcciones del espacio hasta conectar unas con otras formando una red tridimensional, homogénea y entrecruzada con un determinado tamaño de poro. Esta red está compuesta por una única macromolécula de peso molecular infinito, donde la fracción sol (restos de cadenas poliméricas pequeñas que no se han incorporado durante la polimerización a la red tridimensional o gel y que pueden ser eliminadas por lavado del material) es mínima, y en la mayoría de los casos nula. La segunda función del disolvente es mantener separadas, en mayor o menor medida, a las cadenas poliméricas durante su crecimiento. Esta separación es la que da lugar a las propiedades porosas (tipo y tamaño de poro) del material y depende del tipo, cantidad, tamaño y propiedades físico-químicas de los disolventes utilizados durante la síntesis.

Además, el disolvente o mezcla de disolventes usados influye en las características morfológicas y estructurales de los materiales poliméricos finales, ya que son las interacciones entre las cadenas poliméricas en crecimiento y las moléculas de disolvente las que condicionan que la polimerización transcurra en todo momento por vía homogénea o, en un momento determinado, continúe su camino de forma heterogénea, además de ser responsable en una gran medida de la estructura porosa final del material debido a su evaporación.

En la síntesis de MIPs mediante esta metodología las implicaciones del disolvente pueden dar lugar a dos casos extremos y toda una gama de casos intermedios, en cuanto a la morfología y estructura del material final, pudiendo producirse en un mismo sistema polimérico situaciones que den lugar a mezclas de todos los posibles materiales existentes entre los dos extremos:

- *Caso (1)*: las interacciones polímero-disolvente son adecuadas durante toda la polimerización. Así, las cadenas poliméricas son bien solvatadas y crecen extendidas en todas las direcciones del espacio hasta conectar unas con otras, formando al final de la polimerización una red tridimensional transparente y homogénea (o molécula infinita).
- *Caso (2)*: las interacciones polímero-disolvente son muy bajas produciéndose la separación de fases y precipitación antes de que llegue a producirse la interconexión entre cadenas. Debido a que en este caso las cadenas poliméricas se encuentran totalmente separadas en el momento de producirse la separación de fases y la precipitación, siempre se obtienen suspensiones de materiales poliméricos entrecruzados (completamente insolubles en cualquier disolvente) con distintos tamaños y morfologías (partículas esféricas, microgeles, agregados, etc.).

➤ **Caso (3):** las interacciones polímero-disolvente durante la polimerización son de carácter intermedio. Este caso es una situación intermedia entre los casos (1) y (2) y, da lugar a que la precipitación se produzca después de que gran parte de las cadenas poliméricas en crecimiento hayan conectado entre sí (dependiendo del valor de las interacciones polímero disolvente). Por tanto, justo antes de producirse la precipitación, coexisten en el medio estructuras tridimensionales parcialmente entrecruzadas y extendidas a lo largo de todo el sistema (estructura continua de muy elevado peso molecular y rígida que ocupa toda la disolución y que no puede precipitar) y moléculas poliméricas individuales o pequeños retículos poliméricos predispuestos para la precipitación. Por ello, el material que se obtiene es un gel o resina sólida heterogénea y por tanto opaca, formada por una red polimérica tridimensional la cual tiene atrapadas en su interior partículas poliméricas precipitadas. La morfología de los materiales poliméricos obtenidos en los casos intermedios depende de cuánto tiempo se esté dando un fenómeno u otro: formación de la red tridimensional o precipitación de las cadenas poliméricas individuales. La Fig. 21 muestra un esquema de los distintos materiales poliméricos que se pueden obtener para MIPs en función de las interacciones polímero-disolvente a lo largo de la polimerización.



Fig. 21. Materiales poliméricos obtenidos en función de las interacciones polímero disolvente a lo largo de la polimerización en disolución

2.7.3. Polimerización por precipitación

El análisis de las interacciones polímero-disolvente nos lleva a la conclusión de que la modulación de dichas interacciones por debajo de un máximo da lugar a la posibilidad de controlar la formación de una serie de materiales, tanto en tamaño como en morfología; siendo este el fundamento de la polimerización por precipitación.

Los materiales que principalmente pueden obtenerse al producirse la precipitación son: microgeles, suspensiones de micro y nanopartículas esféricas y monodispersas, y micropartículas producidas por fenómenos de homocoagulación (agregación de un pequeño número de nanopartículas para producir una micropartícula). La Fig. 22 muestra el mecanismo de la polimerización por precipitación y las diferentes morfologías o estructuras poliméricas que se pueden formar.

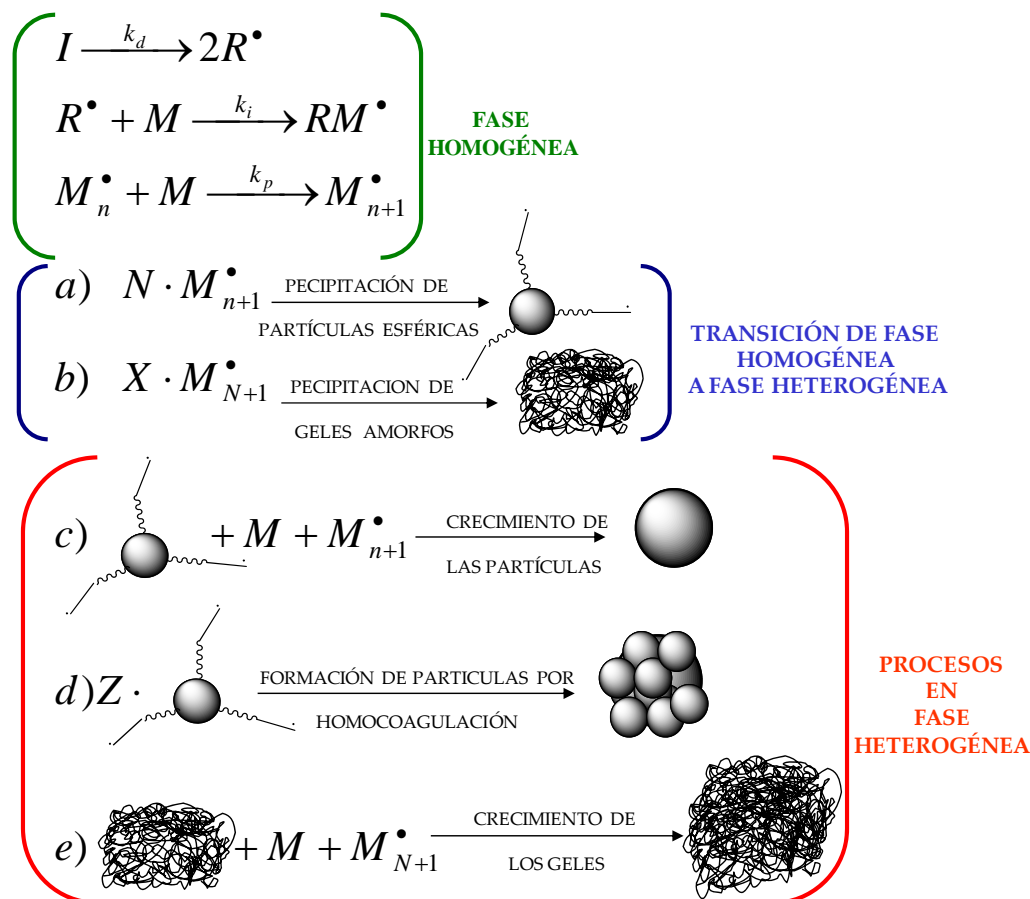


Fig. 22. Mecanismo de la polimerización por precipitación y diferentes estructuras y morfologías poliméricas que se pueden obtener. Iniciador (I), monómeros (M), cadenas poliméricas en crecimiento (M_{N+1} , M_{n+1}). N y n son los subíndices que indican el número de monómeros que tiene una cadena ($N > n$), Z es el número de partículas que agregan para generar el homocoágulo y X es el número de cadenas poliméricas que interactúan para producir la precipitación

La aplicación más importante de la polimerización por precipitación está en el diseño y obtención de partículas esféricas y monodispersas, libres de surfactantes y estabilizadores, con distintos tamaños, distintas composiciones químicas (hidrofóbicas, hidrofílicas, etc.) y entrecruzadas, con grados de entrecruzamiento que suelen ir desde el 3% al 100%. Este entrecruzamiento confiere a las partículas propiedades especiales, tales como ser completamente insolubles en cualquier disolvente o tener mayor o menor capacidad de hinchamiento en un determinado

disolvente, dependiendo del grado de entrecruzamiento (para entrecruzamientos por encima del 20% la capacidad de hinchamiento es muy baja). Además, este hinchamiento es reversible y controlable en función de las propiedades químico-físicas (polaridad) del disolvente, pH, temperatura, etc. Todo esto hace que este tipo de partículas tengan infinidad de aplicaciones en muchos campos de la ciencia: encapsulación y liberación controlada de fármacos, sistemas de extracción en fase sólida, catálisis, diseño de fases sensoras, relleno de columnas cromatográficas, etc.

En la polimerización por precipitación suelen utilizarse concentraciones monoméricas muy diluidas, no más del 3% en masa de monómeros con respecto a la masa de disolvente, evitando así la posible gelificación producida por una elevada concentración de cadenas poliméricas en crecimiento. Para el caso de la polimerización por precipitación, el disolvente o mezcla de disolventes tiene que permitir la solubilización inicial de todos los componentes de la polimerización y de las cadenas poliméricas hasta un determinado tamaño, o lo que es lo mismo un determinado peso molecular. De esta forma, cuando el polímero en crecimiento alcanza ese peso molecular se produce una separación de fases que da lugar a la precipitación, originando partículas de diferentes tamaños y morfologías. Posteriormente, la polimerización continúa en la interfase partícula-disolvente atendiendo a fenómenos de polimerización heterogénea. La cinética de la polimerización por precipitación se podría dividir en dos partes: antes de la separación de fases y precipitación, donde todo transcurre de la misma forma que una polimerización en fase homogénea, y después de la separación de fases y precipitación, en este caso la cinética transcurre de forma heterogénea (ver Fig. 22).

Hay que destacar que la polimerización por precipitación puede llevarse a cabo sin agitación. En este caso, cuando las partículas precipitan, se agrupan y tienden a decantar en un tiempo determinado que dependerá de su tamaño. Esto

hace que el crecimiento de las partículas en fase heterogénea sea bajo, debido a que el contacto dinámico entre las partículas y la fase líquida, donde aún existen monómeros y macrorradicales, es bajo.

La polimerización por precipitación también se puede llevar a cabo con agitación (normalmente agitación rotatoria de todo el sistema de polimerización). En este caso, se evita la agrupación y decantación de las partículas después de la precipitación, favoreciéndose el contacto dinámico entre las partículas y el medio líquido. Este contacto dinámico favorece la adsorción de los monómeros y macrorradicales existentes en la fase líquida y, por tanto, favorece el crecimiento de las partículas después de la precipitación, aumentando también el rendimiento de la polimerización.

En el caso de la polimerización por precipitación sin agitación los diámetros de partícula para la formación de partículas esféricas y monodispersas suelen ir desde los 100 nm hasta las 2 μm y los rendimientos no suelen superar el 65%, mientras que en la polimerización con agitación los diámetros de las partículas suelen ir normalmente desde 1 μm a 5 μm y los rendimientos suelen ser de hasta el 95%.

2.7.4. Polimerización por dispersión

La polimerización por dispersión se lleva a cabo con la mezcla polimérica, un disolvente (o mezcla de ellos) en el que la mezcla monomérica es soluble pero no el polímero que se va formando, un iniciador de radicales soluble en el disolvente y un estabilizador o surfactante. El polímero se forma en la fase continua (disolvente y mezcla monomérica), pero a medida que se forma precipita, formando pequeñas

partículas que se agregan formando partículas coloidales de polímero con monómero en su interior que son estabilizadas por el surfactante. Posteriormente, la polimerización prosigue dentro de estas partículas coloidales como una polimerización en fase heterogénea.

2.7.5. Polimerización en suspensión

Se produce combinando dos fases a priori inmiscibles, una de las fases se denomina fase discontinua y la otra fase continua. Cuando la fase discontinua es hidrofóbica y la fase continua hidrofílica (normalmente agua) la suspensión se denomina normal y cuando la fase discontinua es hidrofílica y la fase continua es hidrofóbica se denomina inversa. La fase discontinua está compuesta por la mezcla de polimerización y siempre se encuentra en una proporción mucho menor que la fase continua; normalmente entre el 2% y el 20% con respecto al volumen total. Así, mediante el uso de agentes químicos (surfactantes) y aplicando energía, la fase discontinua se distribuye en forma de pequeñas gotículas en la fase continua. Estas gotículas se mantienen separadas durante la polimerización mediante el uso de agitación y aditivos. La característica que define a la polimerización en suspensión del resto de polimerizaciones en fase heterogénea es que el iniciador de radicales es soluble en la fase discontinua y no en la fase continua. Debido a ello, el lugar de la polimerización son las gotas de fase discontinua, que se convierten así en partículas de polímero a medida que el proceso avanza. Una característica cinética de este proceso es que siendo una polimerización en fase heterogénea, cada gota de fase discontinua puede tratarse como un pequeño reactor homogéneo y por tanto, pueden aplicarse los argumentos desarrollados para la polimerización radical homogénea.

2.7.6. Polimerización en miniemulsión

Una miniemulsión es un sistema donde se crean, mediante un aporte alto de energía (normalmente mediante el uso de un ultrasonido de alta energía u homogeneizador celular) pequeñas gotas con una alta estabilidad en una fase continua. El truco para obtener la estabilidad de las gotas es la adición de un agente que se disuelve en la fase discontinua pero que es totalmente insoluble en la fase continua. Al principio de la homogeneización, la polidispersidad de las gotas es bastante alta, pero mediante constantes procesos de fusión y fisión de las gotas, inducidos por el aporte de energía, la polidispersidad decrece hasta que la miniemulsión alcanza su estado termodinámico más estable. En la miniemulsión, la tensión superficial alcanza valores altos indicando que la cubierta de surfactante en las gotas es muy baja¹⁰³. Normalmente, una incompleta cobertura de las gotas por parte del surfactante es una característica importante de la miniemulsión y muestra que en estos casos el surfactante se utiliza de forma muy eficiente. Se ha observado que la cobertura de surfactante depende del tamaño de las gotas; las gotas más pequeñas son las que necesitan mayor número de moléculas de surfactante para ser estabilizadas. El tamaño exacto de las gotas puede ser selectivamente ajustado mediante el tipo y cantidad de surfactante utilizado. Surfactantes aniónicos y catiónicos permiten el control de poblaciones de gotas monodispersas de entre 30 y 200 nm y el uso de surfactantes no iónicos (distintos oligómeros y polímeros) se pueden usar para modular el tamaño de gota entre 100 y 800 nm.

La miniemulsión tiende a crecer y desestabilizarse al cabo de días o semanas por distintos mecanismos: sedimentación, coalescencia, floculación y *Ostwald ripening*. Debido al elevado tiempo de desestabilización, ésta no es relevante a la hora de utilizar la miniemulsión para llevar a cabo polimerizaciones, ya que estas pueden llevarse a cabo en pocas horas.

Las nanogotas formadas en la miniemulsión presentan una alta estabilidad. Además la ausencia de intercambio de material entre gotas (en el caso de baja solubilidad de la fase dispersa en la fase dispersante) se ha demostrado experimentalmente¹⁰³ mediante el estudio de las propiedades ópticas de una mezcla que se obtiene, combinando una miniemulsión cuyas nanogotas contienen un reactivo, con otra miniemulsión cuyas nanogotas contienen una molécula que, al reaccionar con el reactivo contenido en las nanogotas de la primera miniemulsión, produce un compuesto altamente coloreado. Al mezclar estas dos miniemulsiones no se observó la aparición de color. Esto indica que las gotas coexisten sin que ocurran procesos de fisión/fusión y de intercambio de material entre gotas.

Debido a que en miniemulsión el tamaño de partícula no cambia, cada gota puede ser tratada como un pequeño reactor en el cual se pueden aplicar los argumentos desarrollados para la polimerización homogénea.

Debido a sus características (llegar al tamaño nano con partículas que mantienen su independencia en el tiempo durante la polimerización, monodispersas y altamente estables) la miniemulsión es una potente herramienta en el diseño y síntesis de nanopartículas con diferentes características químicas y físicas, así como en el diseño de nanopartículas híbridas.

2.7.7. Polimerización por implantación (grafting imprinting)

En todos los casos anteriores los compuestos iniciales estaban disueltos en una fase líquida. En este tipo de polimerización alguno de estos compuestos está soportado químicamente sobre una fase sólida, propiciando la polimerización sobre su superficie. Esta técnica consiste en el injerto o recubrimiento de la superficie

porosa de una partícula de sílice de tamaño, porosidad, forma y distribución de poros perfectamente conocida y controlable. De esta forma se obtiene una partícula perfectamente caracterizada pero cuya porosidad está recubierta por un MIP (véase la Fig. 23 y Fig. 24). Esto se consigue mediante la unión covalente del iniciador de radicales a la superficie porosa de la partícula de sílice, obteniendo partículas de MIP en poco tiempo que presentan excelentes propiedades de transferencia de masa¹⁰⁴⁻¹⁰⁶.

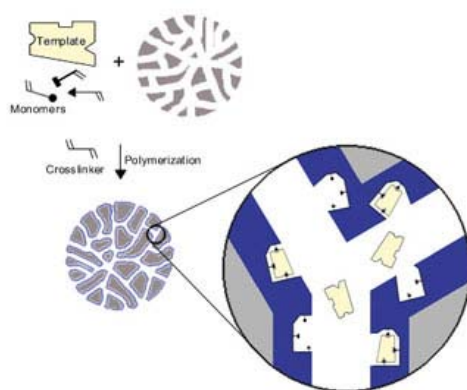


Fig. 23. Simulación de la técnica de “*grafting imprinting*”

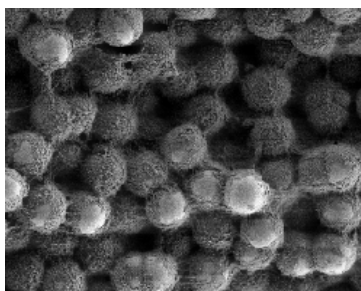


Fig. 24. Fotografía de SEM de partículas de MIP obtenidas mediante “*grafting imprinting*”

2.7.7. Polimerización jerarquizada (*hierarchical imprinting*)

La polimerización jerarquizada proporciona un nuevo formato de MIPs con un mejor control estructural. Ésta se basa en el perfecto control de la localización de los huecos específicos en la superficie polimérica, que es la zona de mayor accesibilidad del polímero, lo que la hace una técnica muy interesante cuando se quieren determinar analitos de gran tamaño o de diferente polaridad a la del polímero usado, ya que éstos pueden acceder solo a los poros superficiales del MIP. Para ello (véase la Fig. 25), la molécula molde se inmoviliza químicamente en la superficie de los poros de una partícula porosa de sílice, posteriormente se rellenan estos poros con los demás compuestos necesarios para la síntesis del MIPs (monómeros, iniciador de radicales, porógenos, etc.) y se lleva a cabo la polimerización dentro de los poros de la partícula. Posteriormente, se procede a la disolución de la sílice resultando un MIP impreso superficialmente con la molécula molde que estaba unida al soporte sólido y que tiene la forma exacta a la que poseían sus poros^{107, 108}.

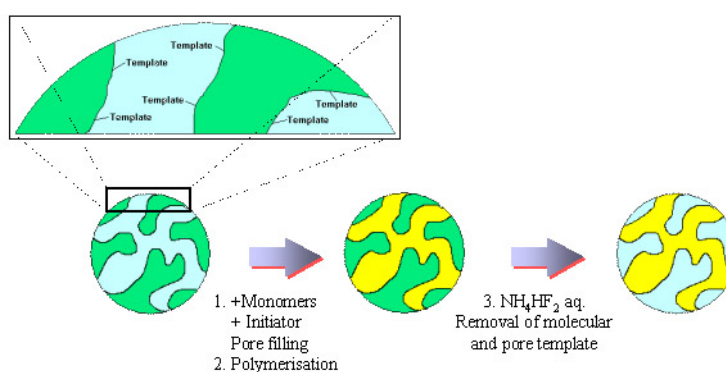


Fig. 25. Simulación de la técnica de “*Hierarchical Imprinting*” en el que se pueden ver las partículas de sílice y de las partículas poliméricas obtenidas tras la disolución de la misma

2.8. Caracterización química de los MIPs

Debido a la naturaleza insoluble de los MIPs, las técnicas aplicadas para su caracterización química deben ser compatibles con muestras en estado sólido. Las aproximaciones analíticas habitualmente utilizadas para este fin se describen a continuación:

- **Análisis elemental.** Se utiliza como técnica de rutina para determinar el porcentaje en masa de carbono, hidrógeno, nitrógeno, etc. Se usa en análisis de copolímeros para calcular la relación de los monómeros cuando uno de ellos incluye en su estructura heteroátomos, pero no ofrece sensibilidad suficiente para determinar cantidades traza de molécula molde que aún estén presentes en el MIP.
- **Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR).** Al igual que en el análisis elemental, la FTIR proporciona información sobre la composición del polímero, por ejemplo, de los grupos funcionales. De manera limitada debido a que no tiene sensibilidad suficiente, puede aportar información sobre la existencia de interacciones no covalentes como por ejemplo, puentes de hidrógeno.
- **^{13}C -RMN en estado sólido.** Proporciona información sobre las distintas clases de átomos de carbono presentes en la red polimérica y determina el número de dobles enlaces que quedan sin reaccionar en el polímero (grado de curación). Es una técnica de reciente aplicación, poco utilizada y cara.

2.9. Caracterización morfológica de los MIPs

La mayoría de las técnicas aplicadas en el análisis morfológico de un MIP son aquellas ya establecidas para la caracterización de sólidos porosos. Según sea la técnica empleada, la información recogida permitirá determinar el volumen medio de los poros, su distribución y/o la superficie de área específica.

- **Penetrabilidad del disolvente.** Midiendo la cantidad de disolvente que puede penetrar en un polímero, se puede estimar el volumen específico de poro.
- **Porosimetría de adsorción de nitrógeno.** Consiste en exponer una masa fija de polímero seco a distintas presiones de nitrógeno; midiendo la cantidad de gas adsorbido en función de la presión, se pueden construir las isothermas de adsorción BET (Brunauer-Emmett-Teller). Estas isothermas proporcionan información sobre el área de superficie específica, el volumen específico de poro, la distribución del tamaño de poros y el diámetro medio de poros. Esta técnica es particularmente adecuada para la evaluación de *microporos* (< 2 nm) y *mesoporos* (entre 2 nm y 50 nm).
- **Porosimetría de intrusión de mercurio.** Consiste en forzar mediante presión la penetración de mercurio en una masa fija de polímero seco. Proporciona la misma información que la porosimetría anterior, pero es más sensible para la evaluación de *macroporos*.
- **Cromatografía de exclusión molecular inversa (ISEC).** Es una porosimetría por interacción sólido-líquido. Al contrario que las porosimetrías, la ISEC permite la evaluación de la estructura porosa de los polímeros cuando están húmedos, lo cual resulta de gran interés en lo que a los MIPs se refiere, ya que la mayoría de sus aplicaciones implican estar en contacto con disolventes. En

esta técnica, el MIP se presenta como fase estacionaria sobre la que se separan cromatográficamente, a un flujo constante, polímeros solubles de distribución de pesos moleculares conocidos.

✦ **Microscopía.** La superficie del polímero puede evaluarse tanto mediante espectroscopía electrónica de barrido (SEM) como mediante microscopía de fuerza atómica (AFM). La SEM permite obtener información sobre la morfología de las partículas poliméricas y los macroporos superficiales. El proceso de preparación de la muestra es simple, pero las muestras no son recuperables. La AFM proporciona un perfil tridimensional cuantitativo de la superficie del polímero, que permite diferenciar las fases cristalinas y las amorfas; a pesar de ello es una técnica poco utilizada.

2.10. Caracterización de los distintos sitios de enlace en MIPs

Como se explicó en la sección 2.1 del apartado NANOTECNOLOGÍA Y CIENCIA DE LOS MATERIALES APLICADAS AL DESARROLLO DE FASES SENSORAS ÓPTICAS Y NUEVOS MATERIALES, la extracción del template genera en los MIPs unas cavidades complementarias en tamaño, forma y funcionalidad a la de la propia molécula molde. Aunque el concepto de impronta molecular pueda sugerir una distribución homogénea de sitios de enlace en estos materiales, las evidencias experimentales demuestran la existencia de una distribución muy heterogénea de estos sitios y con muy diferente afinidad hacia la molécula molde. Además, como se explicará un poco más adelante, la existencia de esta heterogeneidad en los sitios de unión complica mucho la medida de las propiedades de enlace de un MIP, ya que estas propiedades se hacen muy dependientes del rango de concentración en el que fueron evaluadas.

2.10.1. Origen de la heterogeneidad en MIPs

Para explicar la existencia de esta heterogeneidad, intrínseca en la generación de MIPs no covalentes, se han propuesto varias razones¹⁰⁹:

1. La naturaleza, normalmente amorfa, del polímero y las distintas conformaciones en los sitios creados por el template. La polimerización que tiene lugar en torno al complejo de prepolimerización es un proceso en el que las cadenas de copolímero entrecruzado quedan distribuidas al azar en torno a la molécula molde. Como resultado de las diferentes posibilidades de formación del sitio de unión, se generan diferentes grados de entrecruzamiento para cada sitio de enlace formado, cada uno de los cuales con una constante de afinidad^{109, 110}.
2. Diversidad en la composición del complejo de prepolimerización en disolución. Es asumible que cada complejo template-monomero/s funcional/es de lugar, tras la polimerización, a un sitio de unión específica. Si se usa un exceso de monómero funcional con objeto de desplazar el equilibrio de formación de complejos de prepolimerización hacia una mayor formación de dichos complejos (principio de Le Chatelier), la mayoría de los monómeros funcionales estarán libres y orientados al azar en la mezcla de polimerización. Asumiendo que se irán formando sucesivos agregados template-monomero funcional, caracterizados por sucesivas constantes de formación, entonces se podrá formar una gran variedad de estructuras incluyendo a los monómeros funcionales libres, dando lugar a la aparición de un amplio espectro de sitios de unión con diferente funcionalidad y distintas constantes de asociación.
3. Formación de clústeres. Este proceso tiene lugar cuando dos o más moléculas de template interactúan en el seno de la mezcla de prepolimerización,

generando sitios de unión más amplios e inespecíficos que cuando se generan con una sola molécula.

4. Colapso de los sitios de unión tras la extracción con disolventes del template. El material impreso puede sufrir una contracción de volumen tras la salida de las moléculas molde en el proceso de limpieza. Tras la contracción, los grupos funcionales del hueco impreso se aproximan unos a otros, modificando totalmente su distribución espacial.
5. Hay que tener en cuenta además las interacciones inespecíficas que van a tener lugar siempre en la superficie del polímero, así como las retenciones no selectivas debido a la porosidad característica de los MIPs sintetizados por polimerización en solución.

La Fig. 26 ilustra los distintos e hipotéticos sitios de unión que originan las colas características en los picos cromatográficos y los obtenidos mediante FIA al emplear MIPs como fases estacionarias.

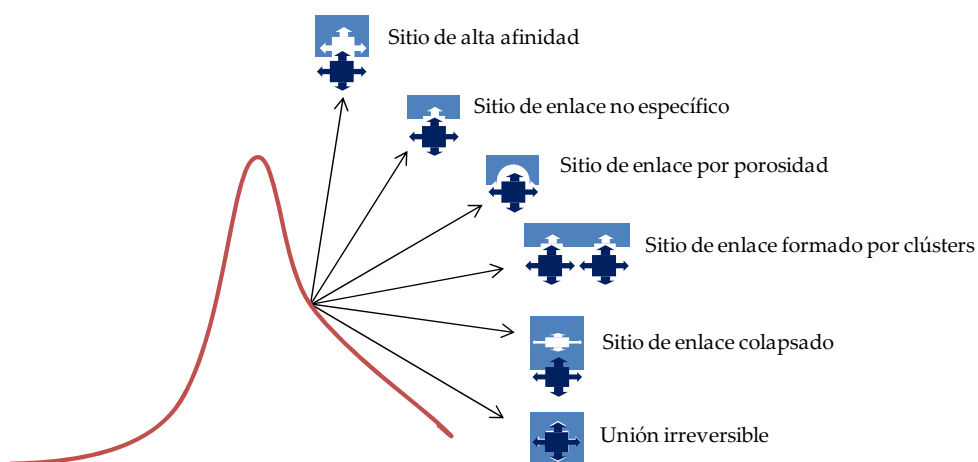


Fig. 26. Cola típica de picos cromatográficos y FIA como resultado de la heterogeneidad de los sitios de enlace en MIPs

2.10.2. Influencia de la heterogeneidad

La heterogeneidad de los polímeros de impronta molecular no siempre está reñida con las propiedades de enlace y la aplicabilidad de estos materiales. Los MIPs no covalentes han sido y continuarán siendo utilizados en un amplio rango de aplicaciones, incluyendo separaciones, desarrollo de sensores, catálisis, etc. Quizás, el principal problema derivado de la existencia de esta heterogeneidad sea la dificultad a la hora de caracterizar un MIP, ya que hace a las propiedades de enlace de un MIP altamente dependiente del rango de concentración en el que se evalúan¹¹¹. Así, cuando se trabaja con altas concentraciones de analito, los sitios de unión que son ocupados preferentemente son los de baja afinidad, mientras que cuando se está trabajando con bajas concentraciones, los sitios ocupados serán los de alta afinidad. Este hecho realza la necesidad de comprender y entender los diferentes parámetros de enlace que exhibe un MIP y que puedan ser usados para poder llevar a cabo comparaciones entre diferentes materiales. Asimismo, se hace imprescindible la existencia de métodos que permitan caracterizar experimentalmente estos MIPs y que tengan en cuenta su heterogeneidad.

2.10.3. Forma de la distribución heterogénea de sitios de unión en MIPs

Una vez admitido el hecho de que existe una distribución heterogénea de sitios de unión en un MIP, lo siguiente es evaluar qué forma tiene esa distribución.

Se ha propuesto que la forma que mejor define las propiedades de enlace observadas en un MIP, teniendo en cuenta las principales contribuciones de heterogeneidad, es la de una ancha distribución unimodal^{112, 113} (Fig. 27).

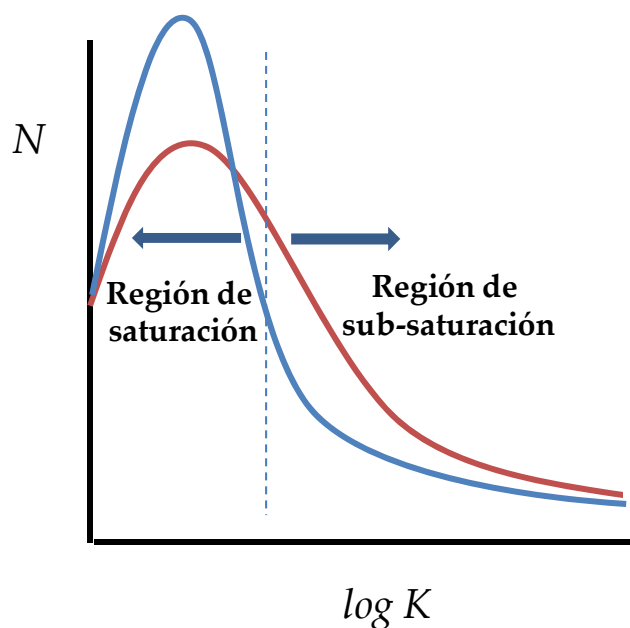


Fig. 27. Distribución unimodal propuesta para definir la heterogeneidad de afinidad presente en MIPs (—) y NIPs (polímeros no impresos o de control) (—)

Este tipo de distribuciones se conocen comúnmente como *distribuciones de afinidad (DA)*, en las que se representa el número de sitios (N) que tienen una constante de afinidad (K). El eje de abscisas se expresa en unidades de $\log K$ con objeto de que sea proporcional a la energía de enlace (ΔG) y es por ello que este eje se conozca como *distribución de energías por sitio de unión*. En la DA se pueden diferenciar claramente dos zonas: un pico unimodal y una zona de caída exponencial. Estas regiones diferentes en la DA están relacionadas con las diferentes partes que encontraremos en las isothermas experimentales de adsorción. La zona de caída exponencial se corresponde con la zona de bajas concentraciones o de sub-saturación donde, como ya se dijo antes, se ocupan los sitios de más alta energía de afinidad y por tanto, los más selectivos. Este es, típicamente, el subconjunto de sitios medidos y utilizados en la mayoría de aplicaciones de los MIPs. La región menos común de la DA es el pico unimodal y se corresponde con las zonas de alta concentración de

analito en las que el polímero se encuentra cerca de la saturación y se ocupan los sitios de baja afinidad.

2.10.4. Métodos experimentales para la caracterización de la heterogeneidad y las propiedades de enlace de un MIP

Una de las claves para el análisis de las propiedades de enlace en un MIP es que los datos experimentales sean recogidos una vez se haya alcanzado el equilibrio de unión entre el template y el polímero, para posteriormente generar la correspondiente **isoterma de adsorción**. Generalmente, este procedimiento se lleva a cabo mediante la incubación en serie de una cantidad conocida de polímero con un volumen fijo de disoluciones de diferente concentración de analito (típicamente se suele emplear una cantidad de MIP de 2-3 mg por cada ml de disolución) durante un periodo de tiempo necesario para alcanzar el equilibrio termodinámico de adsorción (dependerá del sistema, usualmente de 2-24 h) y a una temperatura determinada. Este tipo de experimentos se conocen como *experimentos en batch* (véase Fig. 28)

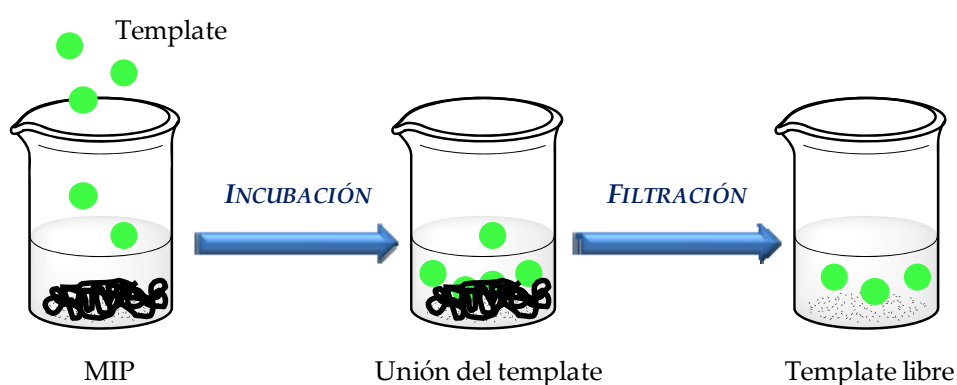
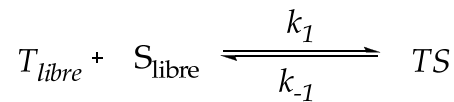


Fig. 28. Esquema típico del procedimiento operativo en los experimentos en batch

El tiempo de incubación, para la mayoría de los ensayos, es el tiempo necesario para que se produzca una unión del 90% del template. Una vez se ha alcanzado el equilibrio, el polímero se separa por filtración o se puede extraer cuidadosamente el sobrenadante, para calcular la concentración de template libre en cada vial de análisis¹¹⁴.

La concentración de template libre, $[C_{libre}] = C$, se determina a partir del sobrenadante usando una curva de calibración, previamente establecida, realizando medidas de absorción UV-Vis, fluorescencia, fosforescencia o radioactividad; mientras que la concentración de template unido tras el equilibrio, $[TS] = R$, se calcula como diferencia entre la concentración total de template, $[C_{total}]$, y la encontrada libre en el sobrenadante, ($R = [C_{total}] - C$). En condiciones de equilibrio, la reacción reversible entre una molécula de template libre en disolución, T_{libre} , y un sitio libre de una determinada energía de afinidad, S_{libre} , para dar lugar al par *template unido-sitio ocupado* (TS) es la siguiente:



donde k_1 y k_{-1} son las constantes cinéticas de adsorción y desorción, respectivamente. En el equilibrio y según la ley de acción de masas:

$$\frac{[T_{libre}][S_{libre}]}{[TS]} = \frac{C(N_t - R)}{R} = \frac{k_{-1}}{k_1} = K_d \quad (53)$$

$[S_{libre}] = (N_t - R)$, donde N_t hace referencia al número total de sitios activos accesibles en el MIP por unidad de volumen y K_d es la constante de equilibrio de desorción. Está ecuación puede ser reordenada de la siguiente forma:

$$\frac{R}{N_t} = \frac{C}{K_d + C} \quad (54)$$

que es la ecuación de una hipérbola cuadrangular con una asíntota horizontal correspondiente a un 100% de saturación de los N_t sitios de unión disponibles en el MIP. Debido a que los polímeros son sólidos, a partir de la relación $B = R/N_t$, que está referida a la ocupación del MIP en forma fraccional, se puede obtener la cantidad de template unido por cada gramo de polímero. A través de la ecuación anterior se puede deducir también que K_d representa la concentración de template libre a la cual el 50% de los sitios de unión del MIP están ocupados (es decir, $B = 0.5$). Cada valor de B obtenido y su correspondiente valor de C pueden ser representados para generar la isoterma de adsorción correspondiente, que como ya se dijo antes, presentará la forma de una hipérbola cuadrangular (Fig. 29).

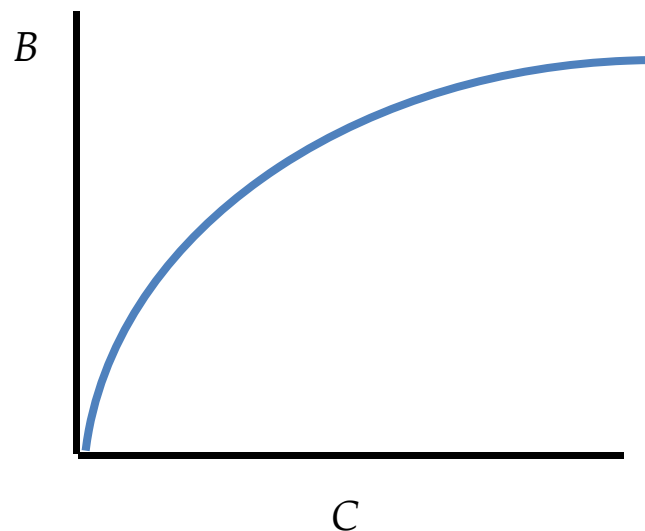


Fig. 29. Hipérbola cuadrangular típica de las isotermas de adsorción al representar B vs. C

2.10.5. Modelos de adsorción. Generalidades

En los últimos años se han utilizado diferentes modelos de isothermas de adsorción para caracterizar la superficie y las propiedades de enlace de un MIP¹¹¹. De hecho, la capacidad y habilidad de enlace de diferentes MIPs pueden ser comparadas y puestas de manifiesto por simple superposición de sus respectivas isothermas de adsorción, eso sí, realizadas en las mismas condiciones experimentales. De todas formas, se hace necesario un análisis más cuantitativo y profundo de las propiedades de enlace, análisis que puede ser llevado a cabo por comparación de los parámetros de enlace obtenidos a partir de la isoterma, como son el número de sitios de unión (N) y la constante de asociación (K). El cálculo de estos parámetros requiere la aplicación de un modelo de adsorción específico. De todos los aplicados a MIPs, los más importantes y utilizados son los modelos de isothermas de adsorción de Langmuir, bi-Langmuir, Freundlich y Langmuir-Freundlich^{113, 115, 116}. La selección de un modelo u otro dependerá básicamente de su habilidad para reproducir con precisión la isoterma experimental obtenida.

Debido a la complejidad a la hora de calcular la distribución real de sitios de enlace en sistemas tan heterogéneos, se han utilizado varias simplificaciones y métodos de aproximación¹¹¹. Algunos de los más utilizados en MIPs están representados en la Fig. 30; cada uno de los cuales se aproxima a la distribución real con diferentes grados de precisión.

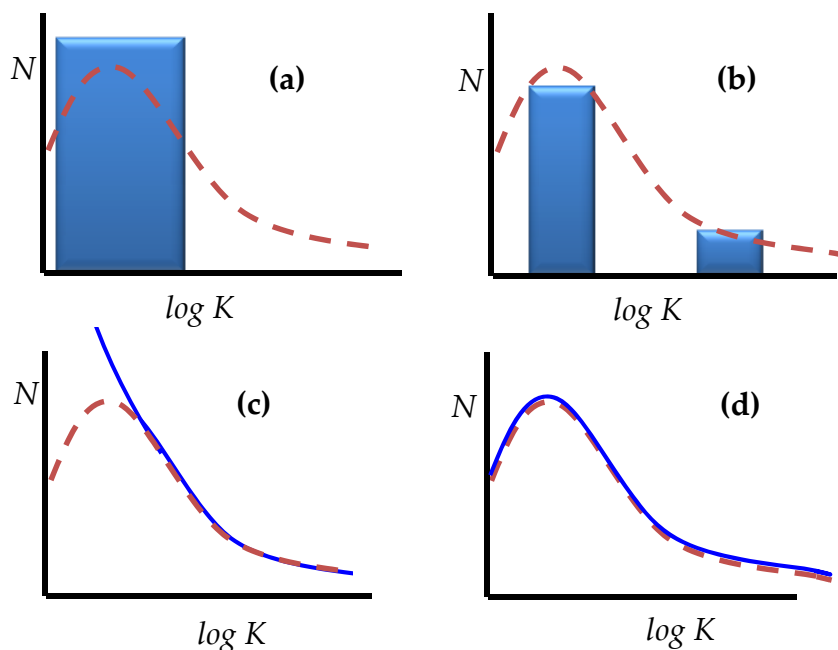


Fig. 30. Modelos discretos **(a)** Langmuir y **(b)** bi-Langmuir) y continuos **(c)** Freundlich y **(d)** Langmuir-Freundlich) mostrados como barras y líneas sólidas, respectivamente, superpuestos sobre la distribución unimodal propuesta para MIPs (línea discontinua)

A la vista de la Fig. 30 resulta intuitivo pensar que los modelos de isothermas de adsorción puedan ser clasificados en dos tipologías generales: modelos de distribución *discreta* y *continua*. Los de Langmuir y bi-Langmuir pueden ser introducidos en el grupo de modelos discretos mientras que los de Freundlich y Langmuir-Freundlich, formarían parte de los modelos continuos. Los discretos simplifican la distribución de sitios de unión en un número finito de diferentes clases de sitios. Mientras que el modelo de Langmuir asume que solo hay un tipo de sitios de unión, el de bi-Langmuir lo hace para solo dos subconjuntos de sitios diferentes. Por otro lado, tanto el modelo de Freundlich como el de Langmuir-Freundlich son ejemplos de modelos de distribución continua, en los que una función continua describe la existencia de un número infinito de tipos de sitios de unión.

2.10.6. Modelos de distribución discreta

Estos modelos de adsorción resultan interesantes ya que son fácilmente de implementar y generan de una forma muy sencilla y rápida los correspondientes parámetros de enlace: el número de sitios de unión (N) y la constante de afinidad (K). Estos dos modelos de isoterma de adsorción están fundamentados en tres premisas¹⁰⁹:

- a) No puede formarse más de una monocapa de moléculas adsorbidas.
- b) Todos los sitios de enlace disponibles en el MIP son energéticamente equivalentes y pueden acomodar, como máximo, una molécula de template.
- c) La habilidad de la molécula molde de adsorberse en un determinado sitio de unión no depende de la ocupación de sitios adyacentes.

La teoría de Langmuir se basa en que la adsorción tiene lugar en sitios homogéneos del polímero. Esta teoría asume que cuando una molécula de molde ocupa un sitio, no puede haber ninguna otra adsorción en ese mismo sitio. Por tanto, teóricamente se alcanzará el valor de saturación cuando no pueda haber más adsorción de moléculas. Este valor permite el cálculo de la capacidad máxima de enlace superficial del polímero. En otras palabras, para una superficie con N sitios homogéneos de constante de adsorción K , la concentración de template unido, B , con respecto al número de sitios de unión puede ser expresada como:

$$B = \frac{NKC}{1 + KC} \quad (55)$$

que es la expresión matemática de la *isoterma de Langmuir*, donde B es la cantidad de molécula molde adsorbida (usualmente normalizada por la masa de polímero empleada) y C es la concentración de molde libre en disolución. N representa la

densidad de sitios de enlace o capacidad de saturación de la monocapa y K es la constante de adsorción.

La ecuación de la isoterma de Langmuir puede ser fácilmente transformada en formato lineal para obtener los parámetros de ajuste mediante una simple regresión lineal. Esta forma lineal de proceder se conoce como análisis de Scatchard:

$$\frac{C}{B} = \frac{1}{NK} + \frac{1}{N}C \quad (56)$$

las constantes N y K se obtienen fácilmente representando C/B vs. C .

En la práctica, los MIPs están caracterizados por una distribución heterogénea de sitios de unión, por los que las premisas en las que se basa la isoterma de Langmuir están lejos de la realidad para estos sistemas. Este hecho se pone de manifiesto cuando se realiza la representación de Scatchard para un caso determinado y, en lugar de generar una línea recta, se obtienen gráficos con curvaturas que corroboran la existencia de esta alta heterogeneidad.

Por tanto, se hace necesario una ecuación de la isoterma mucho más compleja que proporcione un ajuste más preciso a los datos experimentales. Se puede plantear una situación un poco más real en la que se considera que la superficie del polímero está formada por m conjuntos de centros homogéneos de enlace, cada uno de los cuales tiene una constante de adsorción diferente. En este caso, la ecuación (55) puede ser reescrita de la siguiente forma:

$$B = \sum_{i=1}^m \frac{N_i K_i C}{1 + K_i C} \quad (57)$$

donde N_i es el número total de conjuntos de centros de enlace, $N_t = \sum_{i=1}^m N_i$

De esta forma, la isoterma de Langmuir describe la adsorción en un MIP haciendo uso de una isoterma global que es la suma finita de cada conjunto independiente de sitios homogéneos. El modelo más simple para describir el comportamiento de un MIP, haciendo uso de esta expresión, es considerar que la superficie del polímero está formada por dos conjuntos diferentes de sitios, un subconjunto formado por sitios de alta energía de afinidad y otro subconjunto que comprende a los sitios de más baja energía, siendo ambos subconjuntos independientes el uno del otro. Estaríamos ante *la isoterma de adsorción de bi-Langmuir*:

$$B = \frac{N_1 K_1 C}{1 + K_1 C} + \frac{N_2 K_2 C}{1 + K_2 C} \quad (58)$$

Dependiendo del número de subconjuntos que se tengan en cuenta, podríamos tener las isotermas de adsorción de tri-Langmuir, tetra-Langmuir, etc. Para conseguir medidas más o menos precisas, utilizando estos modelos de isotermas, ha de darse la condición de que uno de los productos $N_j K_j \gg N_i K_i$ ($i \neq j$).

Desafortunadamente y, a pesar de la simpleza en los cálculos que ofrecen estas expresiones, el comportamiento real de la distribución de afinidad en un MIP difiere mucho de la aproximación de Langmuir ya que no se puede reducir esta situación real a la existencia de unos pocos subconjuntos de sitios homogéneos.

2.10.7. Modelos de distribución continua

Debido a los defectos que presentan los modelos de distribución discreta a la hora de caracterizar la heterogeneidad y explicar el comportamiento en la adsorción que tiene lugar en los MIPs, se han comenzado a aplicar, cada vez más, los denominados modelos de distribución continua^{111, 115}. Estos modelos presentan la

ventaja de que se ajustan de forma mucho más precisa que los anteriores a la ancha distribución unimodal de afinidad que experimentalmente muestran los MIPs. Además, a través de este tipo de modelos, se pueden generar los parámetros de enlace con mucha más precisión y exactitud, permitiendo una medida cuantitativa de la distribución de afinidad y heterogeneidad. Dentro de todas las clases de modelos de adsorción continua, en el campo de los MIPs los más utilizados son los de Freundlich y el modelo híbrido de Langmuir –Freundlich.

- a) **Isoterma de Freundlich.** Esta isoterma de adsorción es la más comúnmente utilizada en MIPs. Fue presentada en 1926 por Herbert Max Finley Freundlich¹¹⁷ como una isoterma de adsorción empírica para la adsorción no ideal de moléculas sobre superficies heterogéneas, así como para la generación de multicapas. Según este modelo, el calor de adsorción en cada sitio de unión es diferente debido a la heterogeneidad superficial. En otras palabras, asume que no hay equivalencia entre los distintos centros de enlace desde el punto de vista energético. La isoterma de Freundlich describe una relación exponencial entre B y C según la siguiente ecuación matemática:

$$B = aC^m \quad (59)$$

Los parámetros de ajuste a y m dan una medida de los parámetros de enlace físicos. El factor preexponencial a está relacionado con la capacidad (N_t) y la afinidad media (K_0). De todas formas, las contribuciones individuales de N_t y K_0 no pueden ser extraídas directamente de este parámetro. El segundo parámetro de ajuste m es conocido como índice de heterogeneidad. Los valores de m varían entre 0 y 1, siendo valores próximos a 1 indicativos de homogeneidad y de heterogeneidad cuanto más se aproximen a 0.

El modelo de Freundlich es más fácilmente aplicable si se representa la isoterma experimental en formato logarítmico ($\log B$ vs. $\log C$). De esta forma, los sistemas que se ajusten a la isoterma de Freundlich caerán en una línea recta de pendiente m y ordenada en el origen $\log a$.

$$\log B = \log a + m \log C \quad (60)$$

Esta forma de representar la isoterma experimental tiene una serie de ventajas prácticas¹¹³:

1. Requiere menos datos experimentales para generar un ajuste preciso que con respecto al formato exponencial.
2. Desviaciones de la linealidad pueden ser utilizadas para identificar fuentes de error en la isoterma de adsorción; la existencia de discontinuidades sugieren errores sistemáticos, mientras que la presencia de dispersión de datos es indicativa de errores aleatorios.
3. Simplifica el cálculo de la distribución de afinidad (DA).

A pesar de todas las ventajas anteriormente citadas, la isoterma de Freundlich por sí sola no suministra suficiente información para la exacta solución de la DA de un sistema determinado^{118, 119}. Para ello, se han desarrollado diferentes métodos de aproximación que se ajusten a la distribución de decaimiento exponencial característicos de la DA (Fig. 27) utilizando la información generada por la isoterma de Freundlich.

Shimizu *y col.*¹¹³ propusieron una expresión analítica que permite calcular las DA de aquellos MIPs que mejor se ajusten a la ecuación de Freundlich:

$$N(K) = 2.303am(1-m^2)K^{-m} \quad (61)$$

donde a y m son los parámetros de ajuste de la isoterma de Freundlich, K es la constante de afinidad (que puede ser asumida como igual a $1/C$) y $N(K)$ es el número de sitios con una determinada constante de afinidad.

Utilizando esta expresión es posible representar las DA (o más bien dicho, la zona de decaimiento exponencial de la DA) de diferentes MIPs (o del MIP y su correspondiente NIP (polímero no impreso)) y compararlos en términos de afinidad y heterogeneidad. El procedimiento global sería muy sencillo: se obtiene la isoterma experimental y se representa en términos de $\log B$ vs. $\log C$ (ecuación (60)). A partir de la pendiente y la ordenada en el origen de la representación se extraen los parámetros de ajuste a y m . Finalmente, con estos parámetros de ajuste se calcula la distribución de decaimiento exponencial de la DA (ecuación (61)) y se representa.

En teoría, la expresión para el cálculo de la DA a partir de los parámetros de ajuste de Freundlich (ecuación (61)) permite llevar a cabo este cálculo sobre cualquier rango de concentraciones, o lo que es lo mismo, sobre cualquier rango de afinidades de enlace. En la práctica no es así y solo es válida dentro de los límites (K_{min} y K_{max}) establecidos por el rango de concentraciones en el que se llevó a cabo la isoterma de adsorción experimental:

$$K_{max} = \frac{1}{C_{min}} \quad \text{y} \quad K_{min} = \frac{1}{C_{max}} \quad (62)$$

Las DA calculadas a través del modelo de adsorción de Freundlich pueden ser presentadas en dos formatos (Fig. 31).

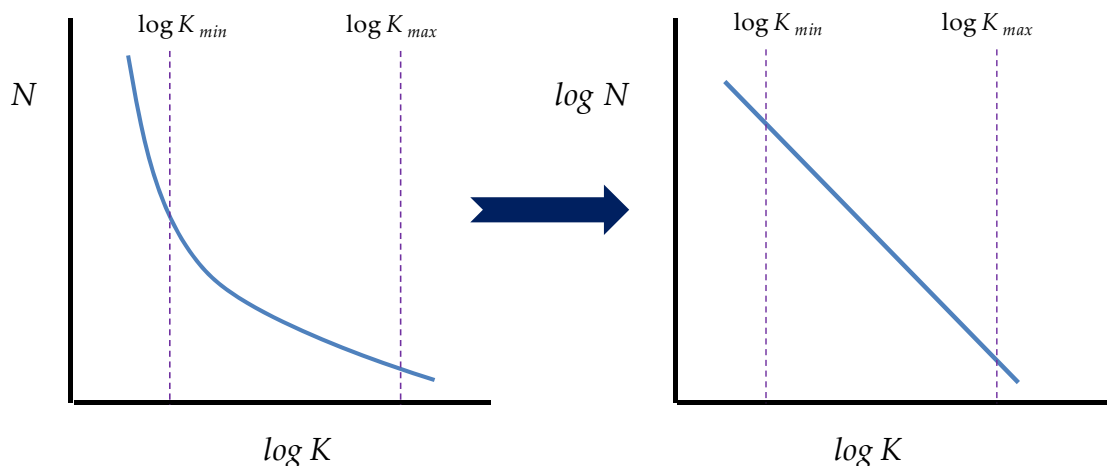


Fig. 31. DA basada en la isoterma de Freundlich representada en formato semilogarítmico (izquierda) y logarítmico (derecha)

El primer formato es el denominado semilogarítmico (N vs. $\log K$) en el que se muestra la zona de decaimiento exponencial de la DA. Al estar el eje de abscisas en formato $\log K$, este es proporcional a ΔG y por tanto esta forma de representación se conoce también como distribución de energía de sitios. El área bajo la curva es igual al número de sitios de enlace con una determinada energía de afinidad, entre dos límites. La segunda forma de representar la DA es en formato logarítmico ($\log B$ vs. $\log C$). Esta forma de representación es muy útil ya que la caída exponencial se convierte en una línea recta y facilita la comparación visual de las DA de diferentes polímeros. MIPs con heterogeneidades similares son fácilmente reconocibles ya que sus DA son líneas paralelas de pendiente m (índice de heterogeneidad).

Una consideración práctica muy importante a la hora de aplicar la ecuación (61) es elegir las unidades apropiadas. Así, las unidades con las que se elabore la isoterma de adsorción son las que determinarán, en última instancia, las unidades de la DA y las del resto de parámetros de enlace. Lo

más usual es que la isoterma de adsorción esté expresada en unidades de mol g⁻¹ para B y mol l⁻¹ para expresar C . Esto genera valores de m sin unidades y valores de a expresados en unidades de (l ^{m} mol^{1- m}) g⁻¹. Las DA calculadas de esta forma tendrán, por tanto, N en unidades de mol g⁻¹ y K en unidades de l mol⁻¹.

Mediante la integración de la ecuación (61) entre los límites K_1 y K_2 se pueden extraer dos nuevos e importantes parámetros. Son el número de sitios $N_{K_1-K_2}$ y la constante de afinidad media $K_{K_1-K_2}$.

$$N_{K_1-K_2} = a(1 - m^2)(K_1^{-m} - K_2^{-m}) \quad (63)$$

$$K_{K_1-K_2} = \left(\frac{m}{m-1}\right) \left(\frac{K_1^{1-m} - K_2^{1-m}}{K_1^{-m} - K_2^{-m}}\right) \quad (64)$$

Estos parámetros se pueden medir en cualquier intervalo de valores de K (K_1 y K_2) pero como se ha dicho anteriormente, siempre dentro de los límites K_{min} y K_{max} .

Una limitación del modelo de Freundlich para la obtención de todos estos parámetros es que solo es preciso dentro de los límites K_{min} y K_{max} . En cualquier caso, esta sería la zona de caída exponencial de la DA y la más interesante para conocer las propiedades de enlace de un MIP y poder compararlas con el NIP correspondiente o con otros MIPs. Este modelo no es capaz de predecir el comportamiento de la isoterma cuando se trabaja a altas concentraciones, es decir, no se ajusta a las condiciones de saturación y en algunos casos, se obtienen desviaciones en la isoterma al trabajar a muy bajas concentraciones, ya que en esta situación la isoterma se aproxima a la ley de Henry, con una correlación lineal directa entre B y C ¹²⁰.

Pese a estas limitaciones, el modelo de adsorción de Freundlich es el más extensamente usado en la caracterización de las propiedades de enlace de MIPs por su simpleza y precisión, dentro de los rangos de concentración donde suelen ser funcionales estos polímeros.

- b) **Isoterma de Langmuir-Freundlich.** La incapacidad de la isoterma de Freundlich de ajustarse al comportamiento de saturación en un MIP limita los tipos de parámetros de enlace que se pueden extraer de ella. Más concretamente, el modelo de Freundlich no puede generar parámetros de enlace globales como son el número total de sitios de unión (N_t) y la constante de afinidad media global (K_0). Para obtener medidas precisas de estos parámetros en sistemas heterogéneos, así como el índice de heterogeneidad, se requiere del uso de modelos híbridos que sean capaces de predecir y justificar el comportamiento de la adsorción en MIPs, tanto en condiciones de saturación como en las zonas de baja concentración. En este sentido, la isoterma de adsorción de Langmuir-Freundlich ha sido la más utilizada^{111, 118, 119, 121}.

Este modelo describe la relación entre B y C de acuerdo con la siguiente expresión:

$$B = \frac{N_t K_0^m C^m}{1 + K_0^m C^m} \quad (65)$$

donde N_t es el número total de sitios de unión, K_0 es la constante global de afinidad media y m es idéntico al parámetro de heterogeneidad de la isoterma de Freundlich. El parámetro a de la isoterma de Freundlich está relacionado con el parámetro K_0 a través de la expresión: $K_0 = a^{1/m}$.

Esta expresión matemática no es linealizable por lo que para obtener los parámetros de ajuste es necesario llevar a cabo un ajuste no lineal con un programa informático adecuado.

La principal diferencia entre esta isoterma y la de Freundlich es evidente a altas concentraciones de sustrato, ya que la isoterma de Langmuir-Freundlich es capaz de ajustarse al comportamiento de saturación.

Cuando se trabaja a bajas concentraciones, la ecuación de Langmuir-Freundlich se transforma en la de Freundlich. Por otro lado, para sistemas altamente homogéneos, con $m \approx 1$, esta isoterma se transforma en la de Langmuir.

En definitiva, este modelo es aplicable en un amplio rango de concentraciones, desde la región de saturación hasta la región de sub-saturación.

Para este modelo existe también una expresión que permite calcular la DA¹¹¹. Esta ecuación es algo más compleja que la referida a la isoterma de Freundlich, pero se aplica de forma similar.

$$N(K) = 2.3N_t m K_0^m K^{-m} \frac{(1 + 2K_0^m K^{-m} + K_0^{2m} K^{-2m} + 4K_0^m K^{-m} m^2 - K_0^{2m} K^{-2m} m^2 - n)}{(1 + K_0^m K^{-m})^4} \quad (66)$$

Los límites en los que es válida la DA calculada a través de la expresión anterior están definidos por el rango en el que se lleve a cabo la isoterma de adsorción experimental.

En general, aunque la isoterma de Langmuir-Freundlich es universalmente más aplicable que el resto de modelos, en la práctica no es muy necesaria. La mayoría de las isotermas de adsorción que presentan los

MIPs están medidas en la región de sub-saturación por lo que con aplicar el modelo de adsorción de Freundlich es más que suficiente para extraer y caracterizar las propiedades de enlace de un MIP.

Un test simple para comprobar si la isoterma de Langmuir-Freundlich es o no necesaria, consiste en representar la isoterma de adsorción experimental en formato logarítmico ($\log B$ vs. $\log C$). Podrían suceder tres casos:

1. Se obtiene una *línea recta* en todo el intervalo; en ese caso, lo más apropiado es utilizar el modelo de *Freundlich*.
2. Se obtiene una *curva* en todo el rango; el mejor ajuste aquí sería el de *Langmuir*.
3. Se obtiene un gráfico que presenta una *línea recta* a bajas concentraciones que se *curva* en la zona de altas concentraciones; para esta situación lo más útil es utilizar la isoterma de *Langmuir-Freundlich*.

3. Materiales nanoestructurados híbridos Orgánicos-Inorgánicos

En los últimos años se ha producido un gran avance investigador en el desarrollo de materiales nanoestructurados multifuncionales en muy diversos formatos (nanopartículas, nanofibras, etc.)¹²²⁻¹²⁶ para ser aplicado es muy diversos campos científicos. Dentro del término material híbrido nanoestructurado quedan englobados un gran número de materiales nanométricos multifuncionales con un amplio abanico de propiedades. Así, se ha demostrado que, debido a su escala, su diseño ordenado y si multifuncionalidad, este tipo de materiales nanoestructurados

son herramientas muy poderosas que pueden ser utilizadas con éxito en la resolución de problemas complejos en muchos campos de elevado interés actual, como son: la biomedicina, la biocatálisis, la microelectrónica, el desarrollo de biosensores, etc.

Debido a estos hechos y desde una perspectiva multidisciplinar, se están haciendo grandes esfuerzos en la investigación y el desarrollo de materiales híbridos multifuncionales en lo que respecta al desarrollo de fases sensoras. La hibridación de estos materiales se suele hacer combinando diferentes tipos de materiales como son los orgánicos, inorgánicos o biomoléculas. En lo que respecta al desarrollo de fases sensoras, son muchas las posibilidades que ofrecen los materiales híbridos. Entre los más representativos en la actualidad son los que incorporan propiedades magnéticas para facilitar su implementación en fibras ópticas o sensores tipo microchip. Por ello, en esta memoria nos vamos a centrar en este tipo de materiales, que son los que se van a describir de forma genérica en este apartado.

3.1. Nanopartículas magnéticas entrecruzadas preparadas mediante polimerización en miniemulsión en dos pasos

Esta técnica consiste en miniemulsionar un ferrofluido, que puede ser previamente preparado dispersando nanopartículas hidrofóbicas de magnetita (γ - Fe_3O_4) recubiertas con ácido oleico (γ - Fe_3O_4 -OA), en un disolvente orgánico (HCCl_3). A su vez, esta dispersión se emulsiona en una fase continua que contiene una adecuada concentración de surfactante, como puede ser dodecilsulfato sódico (SDS), para posteriormente evaporar el disolvente del ferrofluido y, en un segundo paso, adicionar los monómeros, entrecruzador e iniciador apropiados y llevar a cabo la polimerización. Esta polimerización tendrá lugar en la bicapa de surfactante que se forma en la superficie de la partícula debido a los dos surfactantes usados: el usado

para formar el ferrofluido (ácido oleico), y el usado para hacer la miniemulsión (SDS) (ver Fig. 32).

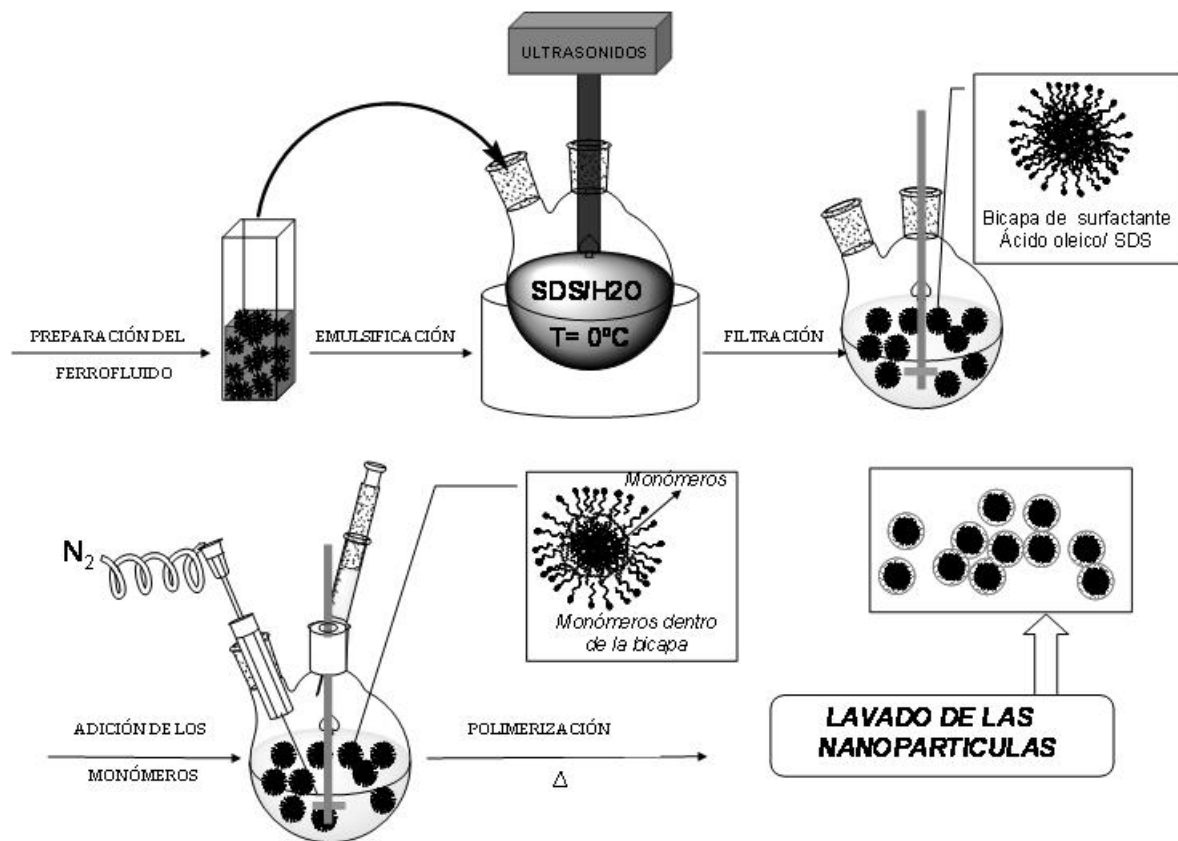


Fig. 32. Esquema de la polimerización en miniemulsión en dos pasos para la obtención de nanopartículas magnéticas

3.2. Polímeros de impronta molecular magnéticos

La introducción de propiedades magnéticas en los polímeros de impronta molecular, en cualquiera de sus formatos (nanopartículas, micropartículas, en bloque, etc.) convierte a los MIPs en materiales híbridos. Esto se consigue adicionando al cóctel de polimerización partículas magnéticas, de forma que éstas se puedan suspender en el mismo y que queden atrapadas en la red polimérica

tridimensional tras la polimerización. Las propiedades magnéticas en los MIPs se introducen fundamentalmente por dos motivos:

- a)* Para recuperar el material de la disolución sin necesidad de usar técnicas de separación que requieren un mayor coste energético (por ejemplo, centrifugación).
- b)* Para depositar los MIPs en la punta de una fibra óptica mediante un colector magnético adecuado¹²⁷ y usarlos como fases sensoras ópticas.

BIBLIOGRAFÍA

1. Feynman, R. There's Plenty of Room at the Bottom. *Engineering and Science* **1960**, *23*, 22-36.
2. Valcárcel, M. Las nanoestructuras de carbono en la nanociencia y nanotecnología analíticas. *Discurso leído en el acto de su recepción como académico de número* **2010**.
3. Valcarcel, M.; Rios, A. The hierarchy and relationships of analytical properties. *Analytical Chemistry* **1993**, *65*, 781A-787A.
4. G.J. Nusz, S. M. M., A.C. Curry, C. Adam, A. Dahlin, F. Hoeoek, A. Wax, A. Chilkoti. Label-Free Plasmonic Detection of Biomolecular Binding by a Single Gold Nanorod. *Analytical Chemistry* **2008**, *80*, 984-989.
5. Suárez, B.; Simonet, B. M.; Cárdenas, S.; Valcárcel, M. Determination of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs in Urine by Combining an Immobilized Carboxylated Carbon Nanotubes Minicolumn for Solid-Phase Extraction with Capillary Electrophoresis-Mass Spectrometry. *Journal of Chromatography A* **2007**, *1159*, 203-207.
6. Valero Navarro, A.; Fernández Sánchez, J. F.; Segura Carretero, A.; Fernández Gutiérrez, A.; Oña, P.; Fernández, I. Iron-phtalocyaninato-complexes immobilised in nanostructure metal oxide for use as optical sensors of NO_x and CO: NMR and photo-physical studies. *J. Porphyrins & Phthalocyanines* **2009**, *13*, 616-623.
7. Medina-Castillo, A. L.; Mistlberger, G.; Fernandez-Sanchez, J. F.; Segura-Carretero, A.; Klimant, I.; Fernandez-Gutierrez, A. Novel Strategy To Design Magnetic, Molecular Imprinted Polymers with Well-Controlled Structure for the Application in Optical Sensors. *Macromolecules* **2010**, *43*, 55-61.
8. Janata, J.; Bezegh, A. Chemical sensors. *Analytical Chemistry* **1988**, *60*, R62-R74.

9. Roe, J. N.; Szoka, F. C.; Verkman, A. S. Fiber optic sensor for the detection of potassium using fluorescence energy-transfer. *Analyst* **1990**, *115*, 353-358.
10. Hulanicki, A.; Glab, S.; Ingman, F. Chemical sensors definitions and classification. *Pure and Applied Chemistry* **1991**, *63*, 1247-1250.
11. Valcárcel, M.; Luque de Castro, M. D. *Flow-through (bio)chemical sensors.*; Elsevier 1994.
12. Cammann, K. Continuous pollution-control by chemical sensors. *Sensors and Actuators B-Chemical* **1992**, *6*, 19-24.
13. Pereiro, R. Tesis Doctoral: *Estudio de nuevas fases sólidas reactivas para sensores ópticos de elementos de interés biomédico: análisis de aluminio y potasio*, Universidad de Oviedo, Oviedo, 1991.
14. Janata, J. *Principles of chemical sensors*; CRC Press: Boca Raton, FL, 1991.
15. Costa Fernández, J. M.; Sanz Medel, A. In *Fosforescencia molecular analítica: una aproximación práctica*; Fernández Gutiérrez, A., Schulman, S. G., Eds.; Editorial Universidad de Granada: Granada, España, 2001.
16. Edmonds, T. E. *Chemical Sensors*; Blackie & Son: UK 1988.
17. Kolle, C.; Gruber, W.; Trettnak, W.; Biebernik, K.; Dolezal, C.; Reiningger, F.; O'Leary, P. Fast optochemical sensor for continuous monitoring of oxygen in breath-gas analysis. *Sensors and Actuators B-Chemical* **1997**, *38*, 141-149.
18. Elamari, A.; Gisin, N.; Munoz, J. L.; Poitry, S.; Tsacopoulos, M.; Zbinden, H. Photon-counting optical-fiber sensor for the detection of ammonia in neurochemical applications. *Sensors and Actuators B* **1997**, *38*, 183-188.

-
19. Barone, P. W.; Parker, R. S.; Strano, M. S. In vivo fluorescence detection of glucose using a single-walled carbon nanotube optical sensor: Design, fluorophore properties, advantages, and disadvantages. *Analytical Chemistry* **2005**, *77*, 7556-7562.
 20. Seitz, W. R. In *Fibre optic chemical sensors and biosensors*; Wolfbeis, O. S., Ed.; CRC Press, 1991; Vol. 2.
 21. Rogers, K. R.; Lin, J. N. Biosensors for environmental monitoring. *Biosensors & Bioelectronics* **1992**, *7*, 317-321.
 22. Fernández-Sánchez, J. F. Tesis Doctoral: *Desarrollo de optosensores fluorescentes para la determinación de principios activos farmacológicos y contaminantes ambientales en muestras reales*, Universidad de Granada, Granada, 2003.
 23. Bourgeois, W.; Gardey, G.; Servieres, M.; Stuetz, R. M. A chemical sensor array based system for protecting wastewater treatment plants. *Sensors and Actuators B-Chemical* **2003**, *91*, 109-116.
 24. Riza, N. A.; Arain, M. A.; Perez, F. Harsh environments minimally invasive optical sensor using free-space targeted single-crystal silicon carbide. *IEEE Sensors Journal* **2006**, *6*, 672-685.
 25. De Jong, A. R.; Boumans, H.; Slaghek, T.; Van Veen, J.; Rijk, R.; Van Zandvoort, M. Active and intelligent packaging for food: Is it the future? *Food Additives and Contaminants* **2005**, *22*, 975-979.
 26. Kerry, J. P.; O'Grady, M. N.; Hogan, S. A. Past, current and potential utilisation of active and intelligent packaging systems for meat and muscle-based products: A review. *Meat Science* **2006**, *74*, 113-130.

27. Yam, K. L.; Takhistov, P. T.; Miltz, J. Intelligent packaging: Concepts and applications. *Journal of Food Science* **2005**, *70*, R1-R10.
28. Seitz, W. R. Chemical sensors based on fiber optics. *Analytical Chemistry* **1984**, *56*, A16-&.
29. Wolfbeis, O. S. *Fiber optic chemical sensors and biosensors*; CRC Press: Boca Raton, FL., 1991.
30. Ballantine, D. S.; Callahan, D.; Maclay, G. J.; Stetter, J. R. An optical wave-guide acid vapor sensor. *Talanta* **1992**, *39*, 1657-1667.
31. Takabayashi, Y.; Uemoto, M.; Aoki, K.; Odake, T.; Korenaga, T. Development and optimization of a lab-on-a-chip device for the measurement of trace nitrogen dioxide gas in the atmosphere. *Analyst* **2006**, *131*, 573-578.
32. Cottier, K.; Wiki, M.; Voirin, G.; Gao, H.; Kunz, R. E. Label-free highly sensitive detection of (small) molecules by wavelength interrogation of integrated optical chips. *Sensors and Actuators B-Chemical* **2003**, *91*, 241-251.
33. Nezel, T.; Spichiger-Keller, U. E.; Ludin, C.; Hensel, A. Gas-selective optical sensors for fire detectors. *Chimia* **2001**, *55*, 725-731.
34. Schult, K.; Katerkamp, A.; Trau, D.; Grawe, F.; Cammann, K.; Meusel, M. Disposable optical sensor chip for medical diagnostics: New ways in bioanalysis. *Analytical Chemistry* **1999**, *71*, 5430-5435.
35. Plant, R. L.; Burns, D. H. Quantitative, depth-resolved imaging of oxygen concentration by phosphorescence lifetime measurement. *Applied Spectroscopy* **1993**, *47*, 1594-1599.

-
36. Gewehr, P. M.; Delpy, D. T. Optical oxygen sensor based on phosphorescence lifetime quenching and employing a polymer immobilized metalloporphyrin probe .1. Theory and instrumentation. *Medical & Biological Engineering & Computing* **1993**, *31*, 2-10.
 37. Wolfbeis, O. S. Fluorescence optical sensors in analytical-chemistry. *Trac-Trends in Analytical Chemistry* **1985**, *4*, 184-188.
 38. Ruzicka, J.; Hansen, E. H. Optosensing at active surfaces - a new detection principle in flow-injection analysis. *Analytica Chimica Acta* **1985**, *173*, 3-21.
 39. Ruzicka, J.; Christian, G. D. Reversible optosensing in packed flow-through detectors - flow-injection or chromatography. *Analytica Chimica Acta* **1990**, *234*, 31-40.
 40. Ruzicka, J.; Marshall, G. D. Sequential injection - a new concept for chemical sensors, process analysis and laboratory assays. *Analytica Chimica Acta* **1990**, *237*, 329-343.
 41. Valcárcel, M.; Luque de Castro, M. D. *Análisis por Inyección en Flujo*; Editorial Universidad Córdoba / Monte de Piedad y Caja de Ahorros de Córdoba: Córdoba, 1984.
 42. Ruzicka, J.; Hansen, E. H. Homogeneous and heterogeneous systems - flow-injection analysis today and tomorrow. *Analytica Chimica Acta* **1988**, *214*, 1-27.
 43. Valcárcel, M.; Luque de Castro, M. D. *Non-Chromatographic Continuous Separation Techniques*; Royal Society of Chemistry: London (UK), 1991.
 44. Luque de Castro, M. D.; Valcarcel, M. Integration of separation and detection in continuous-flow systems. *Trac-Trends in Analytical Chemistry* **1991**, *10*, 114-121.
 45. Van Staden, J. F.; Joubert, A. E.; Van Vliet, H. R. Flow-injection determination of nitrate in natural-waters with copper-cadmium and copperized cadmium tubes in the

- reaction manifold system. *Fresenius Zeitschrift Fur Analytische Chemie* **1986**, 325, 150-152.
46. Ruz, J.; Lazaro, F.; Luque de Castro, M. D. Immobilized enzymes in flow-injection analysis - present and trends. *Journal of Automatic Chemistry* **1988**, 10, 15-19.
47. Hansen, E. H. Flow-injection enzymatic assays. *Analytica Chimica Acta* **1989**, 216, 257-273.
48. Fernández Romero, J. M.; Luque de Castro, M. D. Flow-injection configurations for enzyme activity determination. *Chim. Oggi*. **1998**, 17.
49. Valcarcel, M.; Rios, A. Selectivity in analytical-chemistry. *Analysis* **1990**, 18, 469-475.
50. Boisdé, G. Les capteurs chimiques a fibres optiques. Realités et perspectives. *Entropía* **1990**, 28, 155.
51. Wolfbeis, O. S. Fiber-optic chemical sensors and biosensors. *Analytical Chemistry* **2006**, 78, 3859-3873.
52. Wolfbeis, O. S. Fiber-optic chemical sensors and biosensors. *Analytical Chemistry* **2004**, 76, 3269-3283.
53. Wolfbeis, O. S. Fiber-optic chemical sensors and biosensors. *Analytical Chemistry* **2002**, 74, 2663-2677.
54. Matías, I. R.; Arregui, F. J.; Claus, R. O. In *Enciclopedia of Sensors*; Grimes, C. A., Dickey, E. C., M.V., P., Eds.; American Scientific Publishers: Stevenson Ranch, CA, USA., 2006; Vol. 9, pp 1-19.

-
55. Spichiger, U. E.; Citterio, D.; Bott, M. Analyte-selective optode membranes and optical evaluation techniques - Characterization of response behaviour by ATR-measurements. *Chemical, Biochemical, and Environmental Fiber Sensors VII* **1995**, 2508, 179-189.
 56. Toth, K.; Nagy, G.; Bui, T. T. L.; Jeney, J.; Choquette, S. J. Planar waveguide ion-selective sensors. *Analytica Chimica Acta* **1997**, 353, 1-10.
 57. Lavers, C. R.; Itoh, K.; Wu, S. C.; Murabayashi, M.; Mauchline, I.; Stewart, G.; Stout, T. Planar optical waveguides for sensing applications. *Sensors and Actuators B-Chemical* **2000**, 69, 85-95.
 58. Zeller, P. N.; Voirin, G.; Kunz, R. E. Single-pad scheme for integrated optical fluorescence sensing. *Biosensors & Bioelectronics* **2000**, 15, 591-595.
 59. Hotate, K. Fiber sensor technology today. *Japanese Journal of Applied Physics Part 1- Regular Papers Brief Communications & Review Papers* **2006**, 45, 6616-6625.
 60. Lee, B. Review of the present status of optical fiber sensors. *Optical Fiber Technology* **2003**, 9, 57-79.
 61. Matías, I. R. Tesis Doctoral: *Contribución al desarrollo de redes de sensores por fibra óptica para estructuras inteligentes*, Universidad Politécnica de Madrid, 1996.
 62. McGuinness, C. D.; Sago, K.; McLoskey, D.; Birch, D. J. S. A new sub-nanosecond LED at 280 nm: application to protein fluorescence. *Measurement Science & Technology* **2004**, 15, L19-L22.
 63. Marazuela Lamata, M. D. Tesis Doctoral: *Diseño, caracterización y aplicación analítica de (bio)sensores de fibra óptica para la determinación de CO₂, O₂ y metabolitos de interés clínico.*, Universidad Complutense de Madrid., Madrid, 1997.

64. Elosua, C.; Matias, I. R.; Bariain, C.; Arregui, F. J. Volatile organic compound optical fiber sensors: A review. *Sensors* **2006**, *6*, 1440-1465.
65. Fernandez-Sanchez, J. F.; Cannas, R.; Spichiger, S.; Steiger, R.; Spichiger-Keller, U. E. Novel nanostructured materials to develop oxygen-sensitive films for optical sensors. *Analytica Chimica Acta* **2006**, *566*, 271-282.
66. Fernandez-Sanchez, J. F.; Cannas, R.; Spichiger, S.; Steiger, R.; Spichiger-Keller, U. E. Optical CO₂-sensing layers for clinical application based on pH-sensitive indicators incorporated into nanoscopic metal-oxide supports. *Sensors and Actuators, B: Chemical* **2007**, *128*, 145-153.
67. Salinas-Castillo, A.; Fernandez-Sanchez, J. F.; Segura-Carretero, A.; Fernandez-Gutierrez, A. Solid-surface phosphorescence characterization of polycyclic aromatic hydrocarbons and selective determination of benzo(a)pyrene in water samples. *Analytica Chimica Acta* **2005**, *550*, 53-60.
68. Sanchez-Barragan, I.; Costa-Fernandez, J. M.; Pereiro, R.; Sanz-Medel, A.; Salinas, A.; Segura, A.; Fernandez-Gutierrez, A.; Ballesteros, A.; Gonzalez, J. M. Molecularly imprinted polymers based on iodinated monomers for selective room-temperature phosphorescence optosensing of fluoranthene in water. *Analytical Chemistry* **2005**, *77*, 7005-7011.
69. Fischer, H. The Persistent Radical Effects: A Principle for Selective Radical Reactions and Living Radical Polymerizations. *Chemical Reviews* **2001**, *101*, 3581-3610.
70. Matyjaszewski, K.; Xia, J. Atom Transfer Radical Polymerization. *Chemical Reviews* **2001**, *101*, 2921-2990.
71. Brugger, P. A.; Ketterer, J.; Steiger, R.; Zbinden, F. In *US Patent* 6,156,419, 2000; Vol. 6,156,419.

-
72. Spichiger-Keller, U.; Spichiger, S.; Fernandez-Sanchez, J. F.; WO2006119986 (A1) 2006; Vol. WO2006119986.
 73. Brugger, P. A.; Staiger, M.; Steiger, R., EP1244114 ed.; Vol. WO02074039.
 74. Beer, R.; Steiger, R.; Schaer, M.; Zuppiroli, L.; EP 1492389 A; Vol. EP 1492389 A.
 75. Steiger, R.; Beer, R.; Fernandez-Sanchez, J. F.; Spichiger-Keller, U. E. Large area, nanoparticulate metal oxide coatings for consumer nanotechnologies. *Nanoscience and Technology, Pts 1 and 2* **2007**, 121-123, 1193-1197.
 76. Fernandez-Sanchez, J. F.; Roth, T.; Cannas, R.; Nazeeruddin, M. K.; Spichiger, S.; Graetzel, M.; Spichiger-Keller, U. E. Novel oxygen sensitive complexes for optical oxygen sensing. *Talanta* **2007**, 71, 242-250.
 77. Fernandez-Sanchez, J. F.; Nezel, T.; Steiger, R.; Spichiger-Keller, U. E. Novel optical NO₂-selective sensor based on phthalocyaninato- iron(II) incorporated into a nanostructured matrix. *Sensors and Actuators, B: Chemical* **2006**, 113, 630-638.
 78. Henry, O. Y. F.; Cullen, D. C.; Piletsky, S. A. Optical interrogation of molecularly imprinted polymers and development of MIP sensors: a review. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2005**, 382, 947-956.
 79. Valero-Navarro, A.; Salinas-Castillo, A.; Fernandez-Sanchez, J. F.; Segura-Carretero, A.; Mallavia, R.; Fernandez-Gutierrez, A. The development of a MIP-optosensor for the detection of monoamine naphthalenes in drinking water. *Biosensors & Bioelectronics* **2009**, 24, 2305-2311.
 80. Valero-Navarro, A.; Damiani, P. C.; Fernandez-Sanchez, J. F.; Segura-Carretero, A.; Fernandez-Gutierrez, A. Chemometric-assisted MIP-optosensing system for the

- simultaneous determination of monoamine naphthalenes in drinking waters. *Talanta* **2009**, 78, 57-65.
81. Kubo, H.; Nariai, H.; Takeuchi, T. Multiple hydrogen bonding-based fluorescent imprinted polymers for cyclobarbitol prepared with 2,6-bis(acrylamido)pyridine. *Chemical Communications* **2003**, 2792-2793.
82. Wandelt, B.; Turkewitsch, P.; Wysocki, S.; Darling, G. D. Fluorescent molecularly imprinted polymer studied by time-resolved fluorescence spectroscopy. *Polymer* **2002**, 43, 2777-2785.
83. Chen, Y. C.; Barzier, J. J.; Yan, M. D.; Prahl, S. A. In *Nanosensing: Materials and Devices*; Islam, M. S., Dutta, A. K., Eds.; Spie-Int Soc Optical Engineering: Bellingham, 2004; Vol. 5593, pp 513-520.
84. Polyakov, M. V. Adsorption properties and structure of silica gel. *Zhur. Fiz. Khim.* **1931**, 2, 799.
85. Dickey, F. The preparation of specific adsorbents. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **1949**, 35, 227-229.
86. Wulff, G.; Sarhan, A. Use of polymers with enzyme-analogous structures for resolution of racemates. *Angewandte Chemie-International Edition* **1972**, 11, 341-&.
87. Takagishi, T.; Klotz, I. M. Macromolecule-small molecule interactions; introduction of additional binding sites in polyethyleneimine by disulfide cross-linkages. *Biopolymers* **1972**, 11, 483-491.
88. Arshady, R.; Mosbach, K. Synthesis of Substrate-Selective Polymers by Host-Guest Polymerization. *Makromol. Chem.* **1981**, 182, 687-692.

-
89. Kozuka, H.; Takagishi, T.; Kuroki, N. Dependence of the extent of binding of methyl-orange on the concentration of macromolecules. *Journal of Polymer Science Part C-Polymer Letters* **1984**, *22*, 357-364.
 90. Andersson, L.; Sellergren, B.; Mosbach, K. Imprinting of amino acid derivatives in macroporous polymers. *Tetrahedron Letters* **1984**, *25*, 5211-5214.
 91. Vlatakis, G.; Andersson, L. I.; Muller, R.; Mosbach, K. Drug assay using antibody mimics made by molecular imprinting. *Nature* **1993**, *361*, 645-647.
 92. Haupt, K. Imprinted polymers-Tailor-made mimics of antibodies and receptors. *Chemical Communications* **2003**, 171-178.
 93. Svenson, J.; Nicholls, I. A. On the thermal and chemical stability of molecularly imprinted polymers. *Analytica Chimica Acta* **2001**, *435*, 19-24.
 94. Mie, G.; Hengstenberg, J.; Staudinger, H.; Johner, H.; Luthy, M.; Signer, R. The polymer formaldehyde, an exemplar of cellulose. *Naturwissenschaften* **1927**, *15*, 379-380.
 95. Staudinger, H.; Bruson, H. A. High polymer compounds. *Justus Liebigs Annalen Der Chemie* **1926**, *447*, 97-110.
 96. Areizaga, J.; Milagros Cortazar, M.; Elorza, J. M.; Iruin, J. J. *Polímeros*; Editorial Síntesis: Madrid, 2002.
 97. Min, K.; Gao, H. F.; Matyjaszewski, K. Preparation of homopolymers and block copolymers in miniemulsion by ATRP using activators generated by electron transfer (AGET). *Journal of the American Chemical Society* **2005**, *127*, 3825-3830.

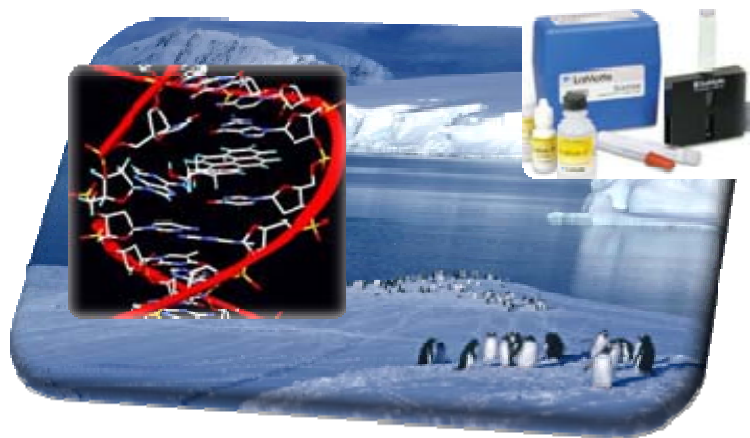
98. Flory, P. J. *Principles of polymer chemistry*, 5 ed.; Cornell University Press: Ithaca, N., 1992.
99. Odian, G. *Principles of polymerization*; Ed. Wiley-Interscience: New Jersey, 2004.
100. Brandrup, J. I.; Grulke, E. A.; Abe, A.; Bloch, D. R. *Polymer handbook*, 4th ed.; Interscience, W.: New Jersey, 1999.
101. Hagiopol, C. *Copolymerization. Towards a systematic approach*; Kluwer Academic, Plenum Publishers: New York, 1999.
102. Garcia-Calzon, J. A.; Diaz-Garcia, M. E. Characterization of binding sites in molecularly imprinted polymers. *Sensors and Actuators B-Chemical* **2007**, *123*, 1180-1194.
103. Elaissari, A. H. *Colloidal Polymers, Synthesis and Characterization*: New York, 2003.
104. Sulitzky, C.; Ruckert, B.; Hall, A. J.; Lanza, F.; Unger, K.; Sellergren, B. Grafting of molecularly imprinted polymer films on silica supports containing surface-bound free radical initiators. *Macromolecules* **2002**, *35*, 3314-3314.
105. Sellergren, B.; Ruckert, B.; Hall, A. Layer-by-layer grafting of molecularly imprinted polymers via iniferter modified supports (vol 14, pg 1204, 2002). *Advanced Materials* **2002**, *14*, 1335-1335.
106. Titirici, M. M.; Sellergren, B. Thin molecularly imprinted polymer films via reversible addition-fragmentation chain transfer polymerization. *Chemistry of Materials* **2006**, *18*, 1773-1779.

-
107. Titirici, M. M.; Hall, A. J.; Sellergren, B. Hierarchical imprinting using crude solid phase peptide synthesis products as templates. *Chemistry of Materials* **2003**, *15*, 822-824.
 108. Titirici, M. M.; Sellergren, B. Peptide recognition via hierarchical imprinting. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2004**, *378*, 1913-1921.
 109. Garcia-Calzon, J. A.; Diaz-Garcia, M. E. Characterization of binding sites in molecularly imprinted polymers. *Sensors and Actuators B-Chemical* **2007**, *123*, 1180-1194.
 110. Stanley, B. J.; Szabelski, P.; Chen, Y. B.; Sellergren, B.; Guiochon, G. Affinity distributions of a molecularly imprinted polymer calculated numerically by the expectation-maximization method. *Langmuir* **2003**, *19*, 772-778.
 111. Umpleby II, R. J.; Baxter, S. C.; Rampey, A. M.; Rushton, G. T.; Chena, Y.; Shimizu, K. D. Characterization of the heterogeneous binding site affinity distributions in molecularly imprinted polymers. *Journal of Chromatography B* **2004**, *804*, 141-149.
 112. Umpleby, R. J.; Bode, M.; Shimizu, K. D. Measurement of the continuous distribution of binding sites in molecularly imprinted polymers. *Analyst* **2000**, *125*, 1261-1265.
 113. Umpleby, R. J.; Baxter, S. C.; Chen, Y.; Shah, R. N.; Shimizu, K. D. Characterization of Molecularly Imprinted Polymers with the Langmuir-Freundlich Isotherm. *Analytical Chemistry* **2001**, *73*, 4584-4591.
 114. Sellergren, B. *Molecularly imprinted polymers, man-made mimics of antibodies and their applications in Analytical Chemistry, techniques and instrumentation in Analytical Chemistry*; Elsevier: Amsterdam, 2001.

115. Andersson, L. I.; Muller, R.; Vlatakis, G.; Mosbach, K. Mimics of the binding sites of opioid receptors obtained by molecular imprinting of enkephalin and morphine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1995**, *92*, 4788-4792.
116. Chen, Y.; Kele, M.; Sajonz, P.; Sellergren, B. r.; Guiochon, G. Influence of Thermal Annealing on the Thermodynamic and Mass-Transfer Kinetic Properties of d- and l-Phenylalanine Anilide on Imprinted Polymeric Stationary Phases. *Analytical Chemistry* **1999**, *71*, 928-938.
117. Freundlich, H. *Capillary and colloid chemistry*; Ed. Methuen and Co.: London, 1926.
118. Sips, R. On the structure of a catalyst surface. *Journal of Chemical Physics* **1948**, *16*, 490-495.
119. Sips, R. On the structure of a catalyst surface 2. *Journal of Chemical Physics* **1950**, *18*, 1024-1026.
120. Chen, Y. B.; Kele, M.; Quinones, I.; Sellergren, B.; Guiochon, G. Influence of the pH on the behavior of an imprinted polymeric stationary phase - supporting evidence for a binding site model. *Journal of Chromatography A* **2001**, *927*, 1-17.
121. Hwang, C. C.; Lee, W. C. Chromatographic characteristics of cholesterol-imprinted polymers prepared by covalent and non-covalent imprinting methods. *Journal of Chromatography A* **2002**, *962*, 69-78.
122. Yin, Y. H.; Xu, S.; Chang, D.; Zheng, H.; Li, J. L.; Liu, X. P.; Xu, P. H.; Xiong, F. L. One-pot synthesis of biopolymeric hollow nanospheres by photocrosslinking. *Chemical Communications*, *46*, 8222-8224.

-
123. Dai, Q.; Nelson, A. Magnetically-responsive self assembled composites. *Chemical Society Reviews*, 39, 4057-4066.
 124. Liu, J. G.; Huang, B. L.; Li, X. Y.; Li, P.; Zeng, X. Y. Magnetic Silver-Coated Ferrite Nanoparticles and Their Application in Thick Films. *Journal of Electronic Materials*, 39, 2702-2710.
 125. Yallapu, M. M.; Foy, S. P.; Jain, T. K.; Labhasetwar, V. PEG-Functionalized Magnetic Nanoparticles for Drug Delivery and Magnetic Resonance Imaging Applications. *Pharmaceutical Research*, 27, 2283-2295.
 126. Karagoz, B.; Bayramoglu, G.; Altintas, B.; Bicak, N.; Arica, M. Y. Poly(glycidyl methacrylate)-Polystyrene Diblocks Copolymer Grafted Nanocomposite Microspheres from Surface-Initiated Atom Transfer Radical Polymerization for Lipase Immobilization: Application in Flavor Ester Synthesis. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 49, 9655-9665.
 127. Chojnacki, P.; Mistlberger, G.; Klimant, I. Separable magnetic sensors for the optical determination of oxygen. *Angewandte Chemie-International Edition* 2007, 46, 8850-8853.

PARTE EXPERIMENTAL



BLOQUE EXPERIMENTAL I

**TEST RÁPIDO Y SENCILLO PARA LA DETECCIÓN DE
HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS (HAPs)
EN AGUAS DE LA ANTÁRTIDA**

BI. TEST RÁPIDO Y SENCILLO PARA LA DETECCIÓN DE HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS (HAPs) EN AGUAS DE LA ANTÁRTIDA

BI.1. Test de screening. Generalidades y características

Un test de screening se define como “aquella que es capaz de llevar a cabo la selección de aquellas muestras cuyo contenido es similar o mayor que uno previamente establecido como umbral¹”. Por lo tanto, solo sobre aquellas muestras que probablemente estén contaminadas será necesario llevar a cabo un análisis más exhaustivo, utilizando para ello una técnica analítica convencional, lo que permitirá así obtener una información analítica más exacta². Un esquema de funcionamiento de los test de screening se muestra en la Fig. BI. 1.

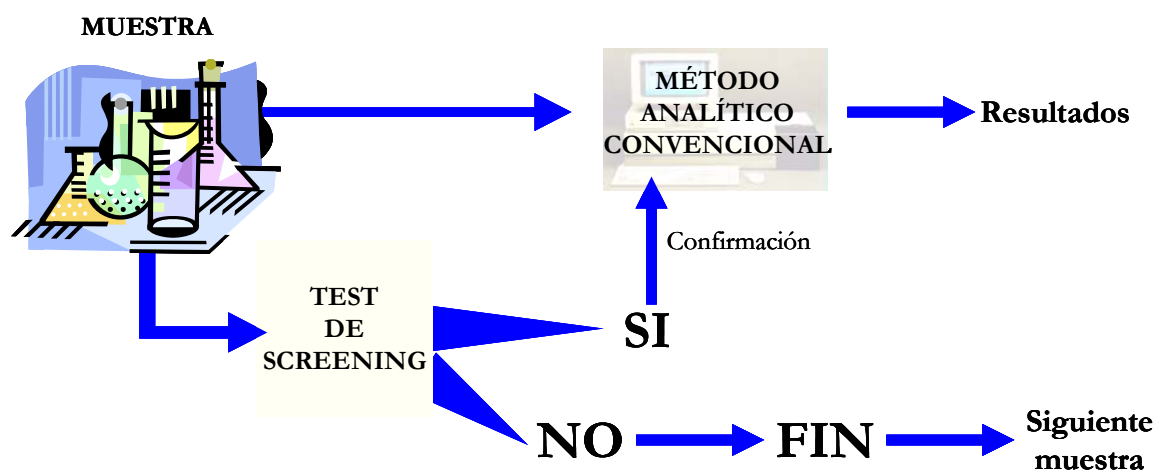


Fig. BI. 1. Esquema de funcionamiento de los test de screening

Entre las ventajas de los test de screening se debe destacar su rapidez, simplicidad, minimización de errores debido a tratamientos previos de la muestra y, muy importante, el ahorro de tiempo y dinero, pues solamente las muestras que proporcionen una respuesta positiva al test necesitarán ser confirmadas con otra

técnica más sofisticada, eliminándose todas aquellas que den respuestas negativas al test.

Realmente, no existen diferencias significativas entre “análisis” y “test de screening” pero se pueden detallar algunas características relevantes que diferencian un test de un análisis convencional (véase la Fig. BI. 2). Si bien todos los test no cumplen todas las características, al menos deben cumplir tres o más de ellas².

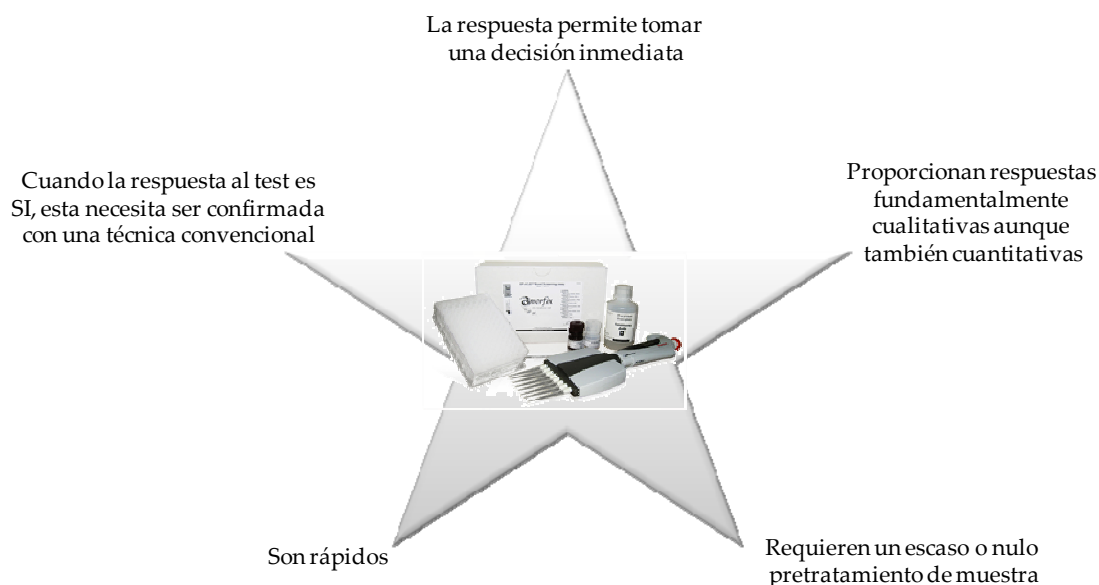


Fig. BI. 2. Características más relevantes de los test de screening

Una de las características más relevantes de los test es el tipo de respuesta binaria, esto es SÍ/NO, asociada a los mismos. De este tipo de respuesta se debe resaltar su carácter cualitativo. No obstante, puede considerarse que en algunos procesos también proporcionan cierto carácter cuantitativo, pero, al igual que en las respuestas proporcionadas por los métodos convencionales, estas respuestas SÍ/NO también se encuentran sometidas a errores. Así podemos destacar:

- **Falsos negativos:** Se producen cuando el resultado del test es NO pero debería ser SÍ. Por ejemplo, una muestra de orina de un deportista que ha consumido

un agente dopante daría negativo (NO) en el test, considerándose por lo tanto que no se ha dopado y sin embargo sí lo ha hecho.




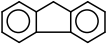

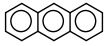
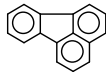

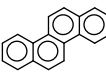
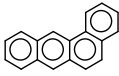
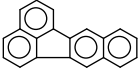
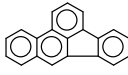
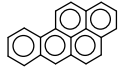
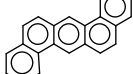
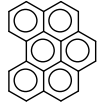
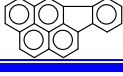
➤ **Falsos positivos:** Se producen cuando el resultado del test es SÍ pero debería ser NO. Por ejemplo, un deportista que no ha consumido ningún agente dopante pero la muestra de orina analizada da positivo al realizarle el test, considerándose que el deportista se ha dopado y sin embargo no lo ha hecho.

Es muy importante resaltar que por regla general, son los falsos negativos los que suponen una mayor peligrosidad en la aplicación de los test, por ser muestras que se desecharán sin ser analizadas por métodos convencionales a pesar de contener el analito o analitos buscados. Sin embargo, los falsos positivos proporcionan, como único inconveniente, la necesidad de su análisis por un método convencional, y por tanto, el gasto de tiempo, reactivo, etc., que ello conlleva.

BI.2. Generalidades de los HAPs

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) son una clase compleja de compuestos constituidos por dos o más anillos aromáticos que pueden estar unidos linealmente, angularmente o bien condensados. En la amplia bibliografía existente acerca de este tipo de compuestos se utilizan otras denominaciones como la de compuestos aromáticos polinucleares, compuestos aromáticos policíclicos, materias orgánicas policíclicas o compuestos orgánicos policíclicos, entre otras. En la presente Memoria se ha optado por emplear la más utilizada en la actualidad que es la de hidrocarburos aromáticos policíclicos, y como abreviatura HAP.

Tabla BI. 1. Nombre y propiedades de los HAPs de la EPA

Nombre	Estructura química	Abreviatura	Peso molecular	Punto fusión (°C)	Actividad cancerígena
<i>Naftaleno</i>		NAPH	128.2	81	-
<i>Acenaftileno</i>		ACEN	152.2	92-93	-
<i>Acenafteno</i>		ACE	154.2	95	-
<i>Fluoreno</i>		FLU	166.2	115-116	-
<i>Fenantreno</i>		PHE	178.2	100	-
<i>Antraceno</i>		ANT	178.2	216	-
<i>Fluoranteno</i>		FLT	202.3	107	0
<i>Pireno</i>		PYR	202.3	150	0
<i>Criseno</i>		CHRY	228.3	254	+
<i>Benzo(a)antraceno</i>		BaA	228.3	156	+
<i>Benzo(k)fluoranteno</i>		BkF	252.3	217	-
<i>Benzo(b)fluoranteno</i>		BbF	252.3	168	++
<i>Benzo(a)pireno</i>		BaP	252.3	179	++++
<i>Dibenzo(a,h)antraceno</i>		DBaH	278.4	266	+++
<i>Benzo(g,h,i)perileno</i>		BghiP	276.3	278	+
<i>Indeno(1,2,3-c,d)pireno</i>		IcdP	276.3	-	+

- sin determinar; 0, inactivo; +, levemente activo; ++, moderadamente activo; +++, muy activo; +++++, extremadamente activo.

Los HAPs más simples son los homocíclicos, que solo contienen carbono e hidrógeno en su estructura, pero son cientos los HAPs que existen con uno o varios grupos sustituyentes tales como alquilo, amino, cloro, ciano, hidroxilo, oxo o tio. En otro subgrupo se sitúan los derivados heterocíclicos de los HAPs, que contienen uno o varios heteroátomos en su estructura aromática, tales como nitrógeno, oxígeno o azufre.

Por tanto, en la actualidad, al hablar de HAPs se engloba a un gran número de compuestos, siendo los más estudiados e interesantes los que fueron seleccionados por la Agencia de Protección Medioambiental Americana (EPA)³. Estos HAPs son dieciséis y son los que se han tenido en cuenta en este trabajo. La Tabla BI.1. muestra los HAPs seleccionados por la EPA ordenados por orden creciente de peso molecular así como su estructura, nombre, abreviatura y algunas características.

De todos los HAPs seleccionados por la EPA y debido a su importante actividad cancerígena, algunos HAPs suelen ser seleccionados como representativos de toda la familia. Además, se da el hecho de que la presencia de estos HAPs representativos es un indicio muy probable de la existencia de otras moléculas de la misma familia. Este es el caso del benzo(a)pireno^{4,5} o del pireno⁶.

Los HAPs pueden formarse por fuentes naturales o antropogénicas, aunque las últimas son, con diferencia, las que más contribuyen a la mayor presencia de este tipo de compuestos en la naturaleza.

Las fuentes naturales más relevantes de formación de HAPs son: volcanes, incendios forestales, en el proceso de carbonización y a través de síntesis vegetales o bacterianas. Así, la fracción de HAPs encontrados en sedimentos jóvenes marinos se cree que fue originada, en su mayor parte, por fuegos en bosques y praderas y que posteriormente fueron dispersadas por el viento.

Las emisiones por fuentes antropogénicas son las más abundantes en términos de emisiones globales anuales. Estas fuentes incluyen la pirólisis o combustión

incompleta de combustibles fósiles (carbones, hollín, esquistos, petróleos y derivados) y también por combustión de basuras y maderas. Además de éstas, existen otras fuentes como los derrames de crudos petrolíferos o refinados que contienen de forma natural a estos compuestos y por transformación del petróleo y carbón en sus industrias⁷. Otras fuentes de contaminación son los alimentos cocinados a la parrilla, fritos, asados o ahumados⁵, así como el humo del tabaco⁴.

Por tanto, se puede afirmar que los HAPs pueden encontrarse en casi todas las partes: en el aire, en la tierra, en el agua y los alimentos. Los valores de los HAPs en aguas superficiales se pueden encontrar entre 0.1 y 830 ng l⁻¹, aunque los valores habituales oscilan entre 2 y 50 ng l⁻¹. La concentración en este tipo de aguas es mayor que en aguas de bebida o subterráneas, debido a la presencia de sólidos suspendidos donde se adsorben los HAPs. Las aguas de manantial son filtradas de forma natural al pasar por diversos terrenos quedando allí retenidos los HAPs.

BI.3. Carcinogénesis de los HAPs

Los HAPs han sido compuestos ampliamente estudiados en los últimos tiempos debido a su potencialidad carcinogénica y/o mutagénica. Así, hace más de dos siglos, se observó cáncer de piel en los deshollinadores y posteriormente en los trabajadores de factorías de alquitrán, por lo que el contacto frecuente con el hollín y alquitrán fue relacionado con la incidencia del cáncer de piel. Investigaciones posteriores indicaron que la actividad cancerígena de estos materiales podía estar relacionada con la presencia de HAPs en su composición y esto fue corroborado mediante experimentación con animales, demostrando que los HAPs son cancerígenos y/o mutagénicos.

Entre los años 60 y 70, se estudiaron un gran número de HAPs homocíclicos para establecer su metabolismo tanto in vitro como in vivo. El conocimiento de las

rutas metabólicas permite desvelar la formación de enlaces covalentes entre los HAPs, el ADN y proteínas, previo proceso de exposición a éstos. Los HAPs, pues, son productos precarcinogénicos ya que no producen generalmente cáncer en el lugar aplicado sino en tejidos distantes de donde se produce la actividad metabólica.

En la biotransformación de estos carcinógenos se forman compuestos electrófilos muy reactivos capaces de interactuar con el ADN y otras moléculas nucleofílicas⁸. Pullman fue el primero que asoció la carcinogeneidad con la estructura señalando que aquella se relacionaba con la presencia en la molécula de un doble enlace reactivo, situado en la llamada región K, sugiriendo que el proceso primario en la inducción del cáncer es una reacción de adición de compuestos presentes en el medio celular a la región K de la molécula (véase Fig. BI. 3).

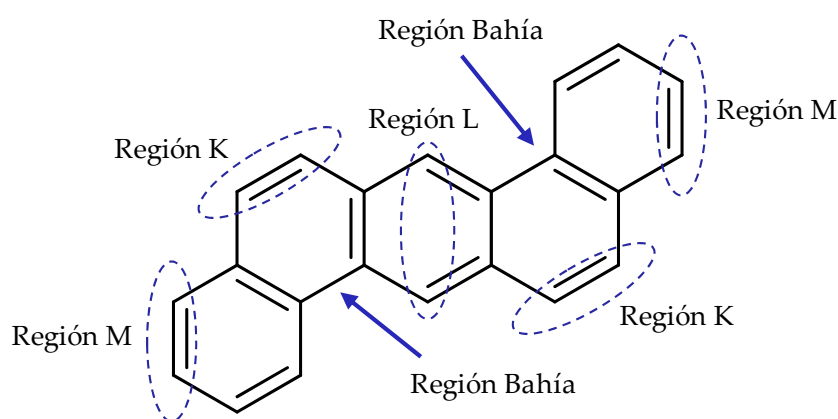


Fig. BI. 3. Regiones moleculares típicas del dibenzo(a,h)antraceno

En el caso del BaP y a través de una activación metabólica multietapa mediante enzimas específicas, especialmente el citocromo P450, se origina el 7,8-epóxido correspondiente, quién a su vez mediante epóxido-hidrolasas forma dioles estereoisómeros que, posteriormente, se transforman en 7,8-dihidrodiol-9,10-epóxido (véase Fig. BI. 4). Éste puede existir en cuatro posibles estereoisomerías de las que el

producto con mayor actividad cancerígena es el (+)benzo[a]pireno-7,8-diol-9,10-epóxido. La reacción entre el carbono bencílico del epóxido y una posición nucleofílica del ADN da lugar a la formación de aductos. Estos aductos de ADN son los de mayor trascendencia, puesto que se cree que estas sustancias provocan reacciones que conducen a la mutación celular y/o transformaciones malignas, siendo éste un posible mecanismo que explica los efectos cancerígenos de los HAPs en el cuerpo humano⁹.

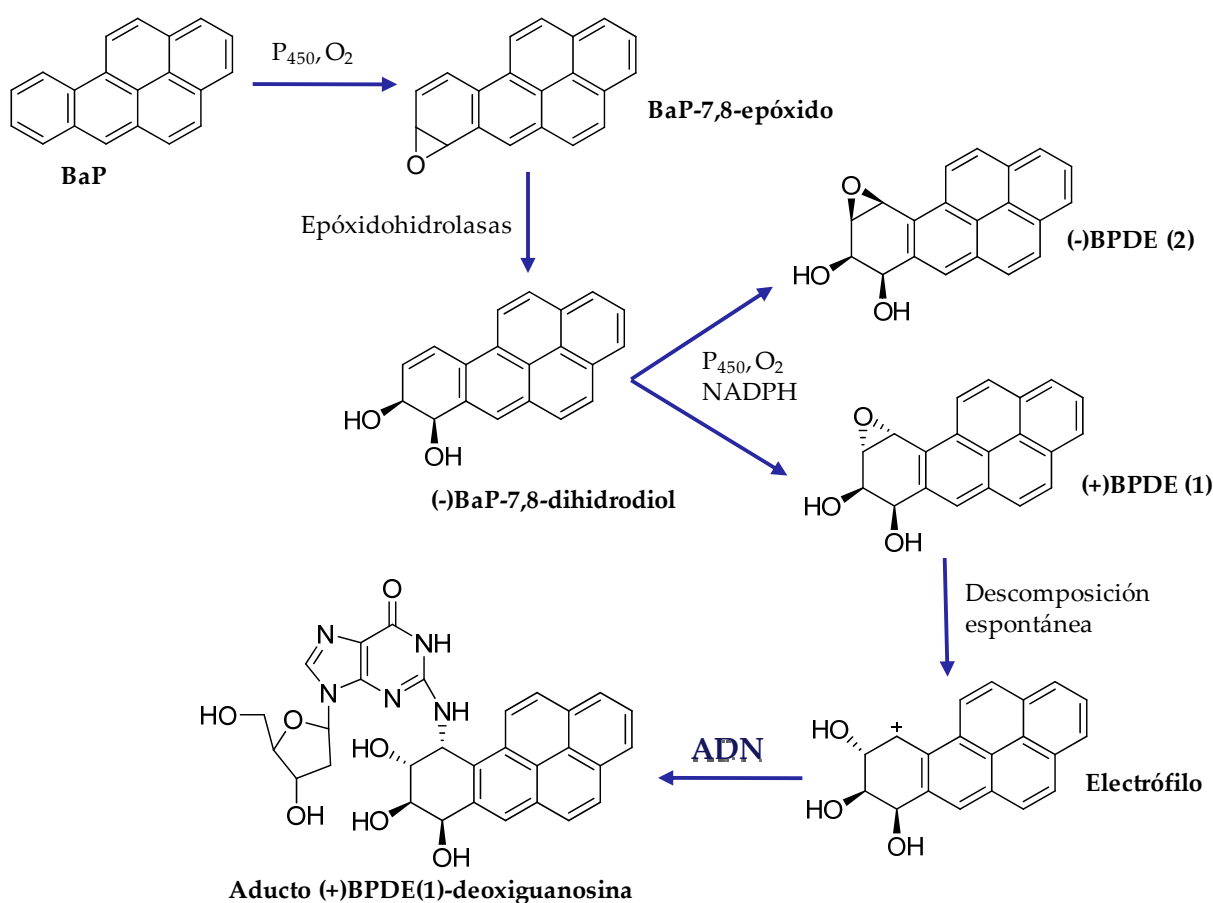


Fig. BI. 4. Activación enzimática del benzo(a)pireno

Existe otra teoría (teoría de la región bahía) que correlaciona carcinogenicidad con las estructura de esta zona de la molécula y con la facilidad de formación de iones carbonio en los epóxidos dioles originados. En cualquier caso, las propiedades

carcinogénicas de los HAPs dependen de su estructura; así, el benzo(a)pireno es muy cancerígeno mientras que su isómero, el benzo(e)pireno, no lo es.

BI.4. Diseño del optosensor y sistema de medida

El optosensor empleado para llevar a cabo este trabajo fue previamente diseñado por nuestro grupo de investigación¹⁰. Como ya se comentó en la sección 3 del apartado SENSORES ÓPTICOS, para desarrollar un optosensor convencional es necesario acoplar la fase ópticamente activa con un sistema FIA (ver Fig. BI. 5).

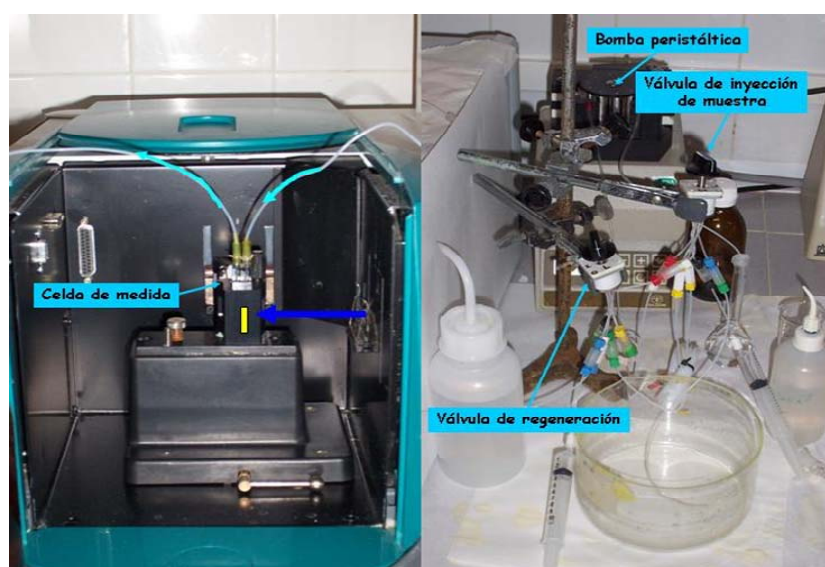


Fig. BI. 5. Imagen real del optosensor convencional empleado

El sistema de detección utilizado consta de una célula de flujo situada en el compartimento de muestra del espectroluminómetro. En la cubeta, la resina se retiene mecánicamente por una malla de tela y se hace coincidir la fase sensora con el haz de excitación y el monocromador de emisión del instrumento (véase la Fig. BI. 6).

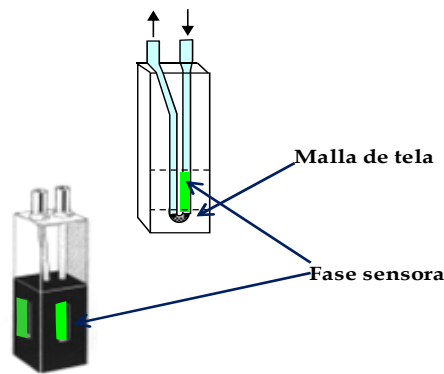


Fig. BI. 6. Esquema de la cubeta de flujo empleada

Las medidas de fluorescencia se obtienen en forma de un *FIograma* (registro de la intensidad relativa de fluorescencia con el tiempo), del que se puede extraer la *respuesta del optosensor* como diferencia entre la intensidad relativa de fluorescencia (I.R.F.) obtenida cuando el analito está retenido en la fase sensora (señal) y la I.R.F. obtenida por la dispersión de la luz de la propia fase sensora (ruido). El *tiempo de respuesta del optosensor* se define como el tiempo que transcurre desde que se inyecta el analito hasta que se obtiene la mayor señal (véase Fig. BI. 7).

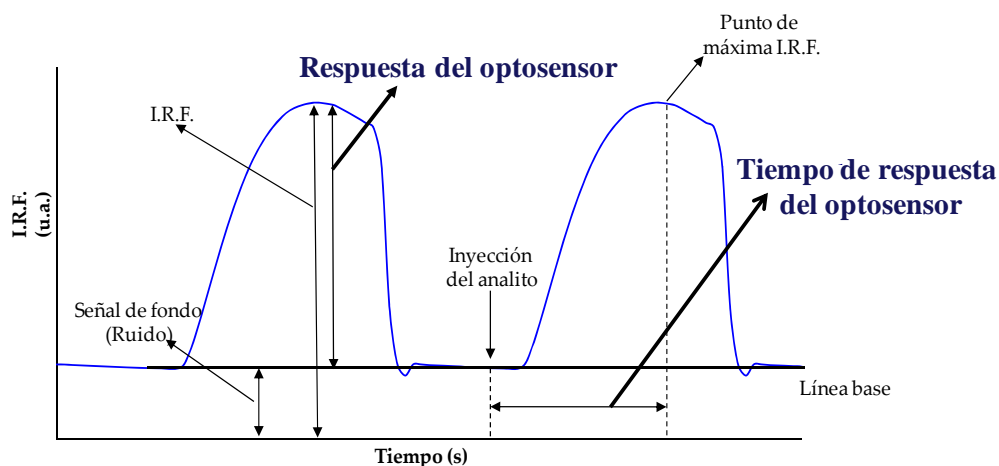


Fig. BI. 7. Definición gráfica de respuesta del optosensor y tiempo de respuesta del optosensor

BI.5. Objetivos del bloque I

El objetivo principal de este bloque experimental es el de desarrollar un *test rápido y sencillo de screening para la detección de HAPs* de una forma fiable y barata en aguas de la Antártida. Para ello se seleccionará BaP, que es una molécula representativa de la presencia de otros HAPs, y así poder basarnos en el optosensor convencional que nuestro grupo de investigación desarrolló en 2005. Este optosensor permite la detección fluorimétrica de BaP en agua con un límite de detección de 3 ng l⁻¹. La concentración límite tolerable de BaP en aguas de consumo humano, establecida por la Unión Europea y la Organización Mundial de la Salud (OMS), es de 10 ng l⁻¹, por lo que dicha concentración será la concentración umbral para el test de screening. Se llevará a cabo una puesta a punto del método utilizando aguas dopadas artificialmente con BaP, para después aplicarlo a aguas procedentes de diferentes puntos de la región antártica. Con objeto de demostrar la fiabilidad del test propuesto, se hará una comparación entre los resultados obtenidos y los generados mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS).

BI.6. Capítulo del bloque I

En este bloque experimental se ha llevado a cabo el siguiente capítulo:

Capítulo 1: Rapid, sensitive screening test for polycyclic aromatic hydrocarbons applied to Antartic water. *Chemosphere* 67 (2007) 903-910.

A rapid, sensitive screening test for polycyclic aromatic hydrocarbons applied to Antarctic water

A. Valero-Navarro^a, J.F. Fernández-Sánchez^{a,*}, A.L. Medina-Castillo^a,
F. Fernández-Ibáñez^b, A. Segura-Carretero^{a,*}, J.M. Ibáñez^c, A. Fernández-Gutiérrez^a

^a Department of Analytical Chemistry, Faculty of Sciences, University of Granada, c/Fuentenueva s/n., E-18071 Granada, Spain

^b Dpto. de Geodinámica, F. de Ciencias, Campus Fuentenueva s/n., Universidad de Granada, E-18071 Granada, Spain

^c Instituto Andaluz de Geofísica, Universidad de Granada, Campus de Cartuja s/n., E-18071 Granada, Spain

Received 28 July 2006; received in revised form 2 November 2006; accepted 5 November 2006

Available online 8 January 2007

Abstract

We describe a rapid, sensitive, fluorescence screening test for polycyclic aromatic hydrocarbons in water samples that avoids more costly time-consuming methods. The screening test works by detecting benzo[*a*]pyrene. It runs without the need for any pre-concentration step, thus rendering it suitable for routine use in water-quality-control laboratories. The test recognizes contaminated samples rapidly (150 s) and inexpensively with a cut-off level of 10 ng l⁻¹, which is the value that the European Union and World Health Organization (WHO) have laid down in its assessment of the quality of water for human consumption. This was first ascertained by analysing tap and waste-water samples before studying environmental water samples from the Antarctic region. The reliability of the screening test was 2% false positives and 4% false negatives in 200 samples of tap and waste-water. The applicability was confirmed by the fact that the predictions of the screening test coincided exactly with results obtained with gas chromatography-mass spectrometry assays. We also discuss the polluted Antarctic samples and the possible sources of the contamination involved.

© 2006 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Antarctica; Fluorescence; Screening test; Benzo[*a*]pyrene; Polluted water; Hydrocarbon contamination; Polycyclic aromatic hydrocarbons

1. Introduction

Human activity in the Antarctic continent has been increasing for the last 50 years. The number of tourists is constantly growing. The average number of tourists visiting the Deception Island volcano, for example, is now around 20000 a year. Another important human presence resides in the scientific stations, in which thousands of researchers and technicians carry out their work and daily activity. At present this considerable number of people travels by combustion-engined vehicles (aeroplanes, ships, tractors, etc.). The stations' maintenance also requires the use of oil combustion. Combustion produces a large set

of pollutant residuals such as CO₂, sulphur derivatives and hydrocarbons in general. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are highly carcinogenic and exist in many forms throughout the environment and thus it is of considerable interest to have reliable analytical methods for detecting their presence (Erustes et al., 2001).

The two main sources of PAHs in the environment are anthropogenic, arising from the incomplete combustion of fossil fuels for energy production and from the incomplete combustion of refuse. They are also introduced into the environment via natural combustion processes such as volcanic eruption and forest and prairie fires (Kim et al., 2003). At present, there is no systematic control of the effect of PAHs on the Antarctic environment. If the level of pollution is small in a region the effect is negligible but when a certain threshold is exceeded it may become dangerous for animal health. Therefore, it should be a

* Corresponding authors. Tel.: +34 958 248593; fax: +34 958249510.

E-mail addresses: jffernan@ugr.es (J.F. Fernández-Sánchez), ansegura@ugr.es (A. Segura-Carretero).

common procedure to make continuous checks into the level of these and other contaminants using a rapid test for potential sources of pollution in the Antarctic.

PAHs are estimated to remain in the atmosphere for several months because they are unreactive in the particulate form (Butler and Crossley, 1981) and are stabilised by the presence of soot (Yokley et al., 1986), so atmospheric long-range transport is responsible for the advection of PAHs as aerosols to every region of the world. It is even possible to find them in the polar regions (Weber and Goerke, 2003). After condensation and coagulation PAHs are largely associated with fine carbon particles (Venkataraman et al., 1994) and are consequently eliminated from the atmosphere and deposited in the earth (Jaffrezo et al., 1994). Because of their low water solubility and high partition coefficients they are strongly sorbed onto the surface of particles associated with the organic compounds of solid-phase matrices and can be deposited within the underlying sediments (Kim et al., 1999). Therefore an investigation into PAH concentrations in aquatic environments is required to provide information concerning the anthropogenic impact on the environment and to serve as an indicator of contaminant loading (Doong and Lin, 2004).

Benzo[*a*]pyrene (BaP) is one of the most carcinogenic of the PAHs and is also considered to be an indicator of the presence of other PAHs in a wide variety of matrices, such as water (WHO, 1984), foodstuffs (Kazerouni et al., 2001; EU, 2005), vegetable oils (Vázquez Troche et al., 2000), urine (Johnson and Greenberg, 1999), ambient air (European Union, 2004) and human tissues (Melikian et al., 1999). Due to its low water solubility the concentration of BaP in water is usually very low (ng l^{-1} levels, ppt). Several analytical techniques have been devised to detect such low concentrations of BaP in water. To achieve the required sensitivity most of the analytical methods published in the literature need a pre-concentration procedure such as liquid-liquid extraction (Johnson and Greenberg, 1999; Nogami et al., 2000; Kazerouni et al., 2001; Padros and Pelletier, 2001; Tan et al., 2001) or solid-phase extraction (Ackerman and Hurtubise, 1999), which makes them both laborious and time-consuming, always a disadvantage when dealing with routine controls in environmental laboratories.

In an attempt to solve these problems different types of easily automatized sensors to quantify BaP have been developed (Panne et al., 2000a,b; Whitcomb and Campiglia, 2001), but all of them require previous solid-phase extraction and thus still remain time-consuming and usually require sophisticated instrumentation. For this reason, Fernández-Sánchez et al. (2004) proposed a new sensor that is able to quantify BaP in drinking water with a detection limit of 3.0 ng l^{-1} and without requiring any pre-concentration step.

It is not always essential, however, to be aware of the exact quantity of pollutants in the sample, their presence alone being sufficient to contribute to a better knowledge

of the environment (Lima et al., 2004). This also simplifies the process, reduces costs and shortens the time of analysis (San Vicente De La Riva et al., 2002). Methods that provide a binary yes/no response, which indicates if the target analytes are present above or below a pre-set concentration, are known as screening tests. Their potential in analytical chemistry has been pointed out by Valcárcel et al. (1999, 2002).

Bearing in mind that in routine analysis a large number of the samples may not be polluted, rapid analytical methods such as screening tests are of increasing interest. They can be described as tests to select only those samples with analyte levels “similar to” or “higher than” a previously established threshold. In this way only those “probably polluted” samples must be further examined with more exact instrumental methods (San Vicente De La Riva et al., 2002).

In the literature it is possible to find different screening tests for heavy metals (San Vicente De La Riva et al., 2002; Meseguer-Lloret et al., 2004) phosphate ion (Grassi et al., 2004), benzene, toluene, ethylbenzene and xylenes (Serrano and Gallego, 2004), water hardness (Lima et al., 2004), phenothiazines (Nascentes et al., 2002), tetracyclines (Alfredsson et al., 2005) and organic aciduria (Yoshida et al., 2005) but no screening test appears to have been published to date to control the levels of PAHs in water samples.

The aim of this study has been to take advantage of the work carried out by our research group into the analysis of BaP to develop a rapid, sensitive fluorescence screening test for PAHs to apply to Antarctic water samples. The results of the screening test were confirmed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). We then went on to look into the nature of the polluted samples from the Antarctic and hypothesise about their sources. We chose two Antarctic regions for this test, Deception Island volcano and Caleta Cierva at the Antarctic Peninsula. Deception Island volcano allows us to study the possible influence of volcanic and human activity over PAH levels. We compared our results with water samples from two other different regions in the world: Ushuaia (Argentina) and the neighbourhood of the city of Granada (Spain), where we expected to find high PAH levels.

2. Materials

2.1. Reference materials and reagents

Analytical-grade reagents were used to prepare all the solutions. Sodium di-hydrogen phosphate 1-hydrate were from Sigma (Spain) and used as received. A solution of $0.1 \text{ M H}_2\text{PO}_4^- / \text{HPO}_4^{2-}$ buffer was prepared at pH 7.0.

A PAH kit containing the sixteen PAHs (acenaphthylene, anthracene, benzo[*a*]anthracene, benzo[*a*]pyrene, benzo[*b*]fluoranthene, benzo[*ghi*]perylene, benzo[*k*]fluoranthene, chrysene, dibenzo[*a,h*]anthracene, fluoranthene, indene(123-*cd*)pyrene, naphthalene, phenanthrene, acenaphthene and

pyrene), which are considered as being the most relevant by the American Environmental Protection Agency (EPA), were supplied by Supelco (Spain). Stock solutions of BaP (Sigma) (500 ng l^{-1}) were prepared daily in 1,4-dioxane (Sigma) and kept at 4°C . PAHs have to be handled with extreme caution; adequate gloves, low-maintenance respirators and disposable spatulas and weighing dishes must be used (see Precautionary Handling Procedures section). The wastes were collected in suitable residue containers for processing according to international norms.

The non-ionic resin Amberlite XAD 4 (Sigma) was sieved and used at $80\text{--}120 \mu\text{m}$ grain size.

Water was doubly distilled with a Milli-Q System (Millipore, Bedford, MA, USA).

2.2. Precautionary handling procedures

BaP is an experimental carcinogen, mutagen, tumorigen, neoplastigen and teratogen. It is believed to cause bladder, skin and lung cancer. So it has to be handled with extreme caution by trained workers; safety glasses and neoprene or nitrile rubber gloves must be worn when working with the solutions, and good ventilation, low-maintenance respirators with filter type P3 and disposable spatulas and weighing dishes when handling it in solid form. The wastes must to be solved or mixed with a combustible solvent and collected in suitable residue containers for processing according to international norms. They must never be discharged into surface water (2000/60/ECC, Council Decision 2455/2001/EC, O.J. L331 of 15/12/2001).

2.3. Instrumentation

Flow-injection, solid-surface fluorescence measurements were made with an Aminco Bowman Series 2 luminescence spectrometer fitted with a continuous high-power xenon lamp. A $25 \mu\text{l}$ Hellma 176.052-QS flow-through cell was packed with Amerlite XAD 4 and placed in the conventional sample compartment of the detector in a single-line flow-injection system.

The flow system consisted of a Gilson Minipuls 3 peristaltic pump, two Rheodyne 5020 rotary valves (Supelco, Spain) and PTFE tubing of 0.8 mm id to connect the pump with the valves and flow-cell.

2.4. Screening procedure

To detect BaP in water we designed an automatic flow-injection system (Fig. 1). A peristaltic pump was used to generate the flow stream, which consisted of 15 mM $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ buffer solution at pH 7 and a flow-rate of 2.0 ml min^{-1} . Two rotary valves (A and B) with loops of 4 and 0.25 ml were used to introduce the standards/samples and regenerate the active surface, respectively. Thus, when both valves were in position 1 (loading) only the carrier solution reached the flow-through cell, after which, valve A had to be switched to position 2 (injection) to allow

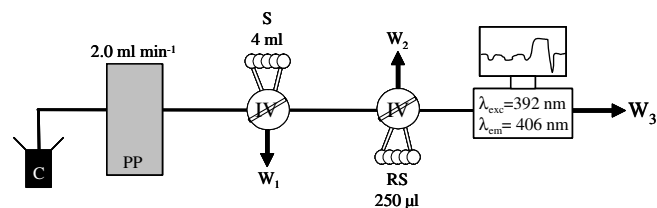


Fig. 1. Schematic diagrams of the set-up used for the screening of water samples for PAHs: C, carrier; PP, peristaltic pump; IV, injection valve; S, sample; RS, regenerative solution; W, waste.

4 ml of the sample to be injected into the carrier stream. The BaP was kept in the flow cell and fluorescence was measured at $\lambda_{\text{exc/em}} = 392/406 \text{ nm}$ with a detector voltage of 600 V and slits of 4 nm for excitation and emission. Finally, valve A was switched back to position 1 at the same time as valve B was switched to position 2 (injection) and $250 \mu\text{l}$ of the regenerative solution (acetone) stripped any retained BaP from the solid phase before proceeding with the next sample. The height of the fluorescence signal provided the binary (yes/no) response.

2.5. GC–MS procedure

The water samples together with five reference samples (one blank reference sample, three PAH reference samples and one PAH confirmation sample) were analysed by GC–MS. The blank reference sample contained only bi-distilled water and the three PAH reference samples contained 10 , 50 and $500 \mu\text{g l}^{-1}$ of individual 16 EPA-PAHs. These were used to obtain the calibration curve of the chromatographic method. PAH reference sample containing $11.5 \mu\text{g l}^{-1}$ of each EPA-PAH was used to corroborate the calibration curve.

The GC–MS method used for determining PAHs in water samples was based on the method proposed by Crozier et al. (2001) but SPE was replaced by SPME using a fibre consisting of polydimethylsiloxane/divinylbenzene (PDMS/DVB), which was immersed in 1 ml of sample and then coupled to the gas-chromatographer.

3. Results and discussion

3.1. Sample screening method

Previous studies made by our research group (Fernández-Sánchez et al., 2004) have shown the possibility of selectively measuring BaP in drinking water using a flow-through sensor. This optosensor was used to develop the screening test.

The primary objectives of sample screening systems are to obtain a reliable response, to reduce the preliminary operations of the conventional analytical processes and to minimize the need of separative instruments. Therefore, a

reliable screening method will be used mainly as a filter to select those samples in a starting set containing the analytes above a predetermined concentration level (Valcárcel et al., 1999). The cut-off level is a critical parameter for screening methods; such a level is normally imposed by legal requirements when related to toxic compounds for human health. Nevertheless, the detection limit of the techniques should also be taken into account (Serrano and Gallego, 2004). The detection limit of the proposed method for BaP in water samples is 3 ng l^{-1} and the European Union and World Health Organization (WHO) have laid down that in assessing the quality of water for human consumption BaP may not exceed 10 ng l^{-1} (WHO, 1984). Thus, the proposed sample-screening method provides a low enough detection limit to classify all water types (drinking water included). The cut-off level was set at the imposed concentration by legal requirements for human health (10.0 ng l^{-1}).

The sample-screening method uses the fluorescence intensity obtained when BaP is retained onto Amberlite XAD 4 to discriminate between contaminated and uncontaminated water samples. Fig. 2 shows the fluorescence profile for three uncontaminated samples: distilled, tap and Antarctic (sample DEC3) waters. It also shows two distilled and tap-water samples that were spiked with 10 ng l^{-1} (10 ppt) of BaP together with a sample of real contaminated water from the Antarctic region (sample reference U1), which contains a higher BaP concentration than 10 ng l^{-1} .

Fig. 2 shows that when the sample is injected the fluorescence intensity decreases. This is due to the organic solvent present in the sample, which compresses the Amberlite resins and thus causes a decrease in the background signal. When all the sample has passed through the flow-cell, 120 seconds after injection, if the fluorescence signal is similar to that before the injection there is no BaP in the sample. If, on the other hand, it is higher, it is because BaP from the sample is now retained upon the resins. The intensity of the fluorescence emission indicates whether the sample is contaminated or not.

3.2. Reliability of the screening method

Several protocols can be used to establish the reliability of a screening test. We have established the confidence level of our proposed screening system by using the basis of the percentage of false positives and false negatives through a simple chemometric study (Valcárcel et al., 1999) because it is simple and intuitive and is also the most popular method used in analytical chemistry to establish the reliability of a screening test (Nascentes et al., 2002; San Vicente De La Riva et al., 2002; Lima et al., 2004; Meseguer-Lloret et al., 2004; Alfredsson et al., 2005). A false positive corresponded to a water sample containing a BaP concentration lower than the cut-off but giving a positive response, whereas a false negative corresponded to a water sample with an analyte concentration higher than that of the cut-off but giving a negative response.

Two hundred water samples were used to establish the reliability of the screening test. Thus, 25 samples at each of eight concentration levels between 0 and 30 ng l^{-1} were tested: 0, 1.5 (1/2DL), 3 (DL), 6 (2DL), 10 (cut-off level), 15 (5DL), 21 (7DL) and 30 (10DL) ng l^{-1} .

Fig. 3 shows the percentage of false positives and negatives. No false positives were obtained for 0, 1.5 and 3 ng l^{-1} (all samples provided the right response) whilst there were 8% at 6 ng l^{-1} (2 of 25 samples provided a false positive response). The figure for false negatives was 4% at 15 ng l^{-1} (only 1 sample of 25 gave a false negative) and 0% for concentrations of 20 ng l^{-1} and above. Thus, taking into account that the cut-off value used is the concentration of BaP proposed by the European Union and World Health Organization, which indicates if water is contaminated or not, the proposed method could be used for the screening of BaP in water samples.

Furthermore, bearing in mind that BaP is an indicator of the presence of other PAHs (WHO, 1984; Johnson and Greenberg, 1999; Melikian et al., 1999; Vázquez Troche et al., 2000; Kazerouni et al., 2001; EU, 2004, 2005), the screening of BaP could be extended to screen other PAHs.

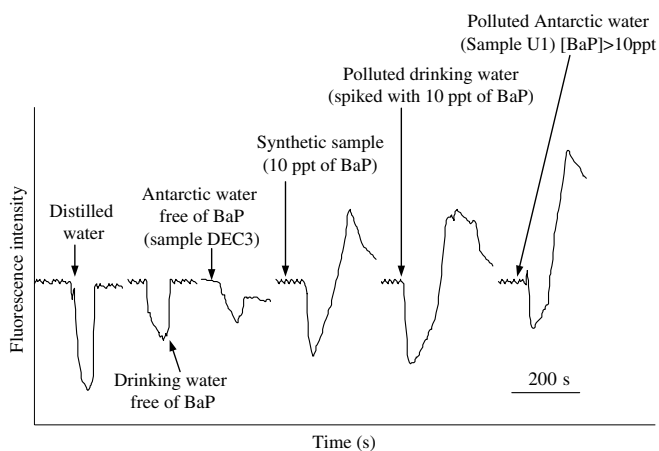


Fig. 2. Fluorescence profiles for uncontaminated and polluted synthetic and real water samples.

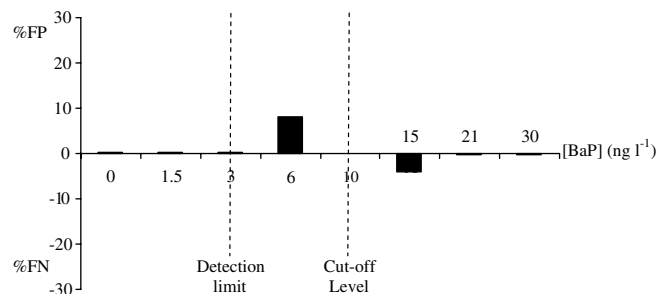


Fig. 3. Reliability of the screening method. Standard solutions ($n = 25$ for every concentration level) of BaP: % FP, percentage of false positives; % FN, percentage of false negatives.

3.3. Confirmation of reliability by analysing real samples

To confirm the reliability of screening with real samples we analysed six drinking-water samples from the city of Granada and various surrounding villages and a wastewater sample from an irrigation ditch at Atarfe, in the same region. None of them were found to contain PAHs so all the samples were injected before (0 ng l^{-1} BaP) and after spiking (10 ng l^{-1}) with BaP (7 replicas at each concentration). The 49 non-spiked samples gave 0% false-positive results and only 5 of the 49 spiked samples (10%) gave a false negative response (Table 1). These results demon-

strate the predictable ability of the proposed test when applied to real samples.

It is important to have in mind that the percentage of false-positive could be reduced by increasing the number or replicas.

3.4. Analysis of water samples from the Antarctic region and Ushuaia

The proposed screening test was finally used to analyse 11 water samples from the Antarctic region. We selected the volcanic island of Deception and Caleta Cierva cove in the Antarctic peninsula (Fig. 4). Apart from these two areas we sampled the thaw water of a glacier close to the city of Ushuaia in Argentina. All of them were sampled during the austral summer of 2003–2004.

Deception Island is the most active volcano in the South Shetland Islands and one of the most active volcanoes of the Antarctic continent. The last eruption took place in 1970 and affected some of the bases on the island. At present its activity mainly consists of fumarolic fields and thermal anomalies. At the moment there two scientific stations functioning for at least four months of the year: the Argentinean Base “Decepción” and the Spanish Base “Gabriel de Castilla”. In the past there were two other stations in operation (Chilean and British bases) and a whaling factory was sited there throughout the first quarter of the twentieth century. Besides this, Deception Island is one of the most lively tourist areas in the whole of Antarctica. On average more than 20000 people a year arrive on board cruises and remain for hours on the island. In the high season Deception Island receives more than six visiting ships per day, including tourist, scientific and military ships.

A permanent scientific base (Argentinean Base “Primavera”) has been functioning at Caleta Cierva for more than 50 years. A temporary Spanish camp was also deployed

Table 1
Results of the reliability of the proposed test by analysing real tap and waste waters

Tap and waste-water samples		Total number (<i>n</i>)	Positives	Negatives
Location	Kind of sample			
Granada city	Blank	7	0	7
	10 ng l^{-1} BaP	7	5	2
Las Gábias	Blank	7	0	7
	10 ng l^{-1} BaP	7	7	0
Atarfe	Blank	7	0	7
	10 ng l^{-1} BaP	7	6	1
Gójar	Blank	7	0	7
	10 ng l^{-1} BaP	7	6	1
Albolote	Blank	7	0	7
	10 ng l^{-1} BaP	7	7	0
Ogíjares	Blank	7	0	7
	10 ng l^{-1} BaP	7	7	0
Atarfe (waste)	Blank	7	0	7
	10 ng l^{-1} BaP	7	6	1
All	Blank	49	0	49
	10 ng l^{-1} BaP	49	44	5

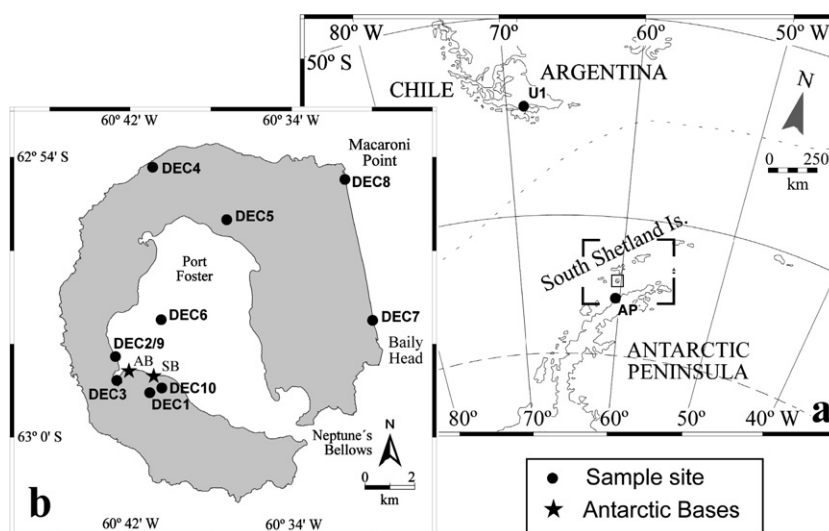


Fig. 4. Geographic location of Antarctic samples. (a) General map of the Antarctic peninsula and southernmost America. (b) Deception Island samples location map. AB: Argentinean Base “Decepción”, SB: Spanish Base “Gabriel de Castilla”.

there during the Antarctic summer of 2003–2004. This area is also visited by many tourists and researchers.

Ushuaia is the southernmost city in the world and the most frequently used starting point to arrive at Antarctica. It is an isolated city, with no neighbouring villages or industries and is surrounded by mountains where many Alpine glaciers still remain active. Its present population is around 50 000 inhabitants but this is augmented by thousands of tourists during the year. Such an influx of tourism implies considerable air and sea traffic around the city.

A total of 12 samples were obtained in the Antarctic region for the present experiment. One corresponded to thaw waters from a glacier near to Ushuaia. As far as Deception Island is concerned, ten of the samples were of thaw waters from several glaciers on the island, one (DEC6) was from the inner great bay (Port Foster) and two (DEC2 and DEC9) from spring waters taken from a fumarolic field near the Argentinean Base “Decepción”. These two latter samples were taken at the same point at an interval of 50 days. Sample DEC9 was taken during a high fumarolic and seismic-activity event in order to look for any influence that volcanic activity might have upon their composition.

Fig. 5 and Table 2 show the results of the screening test and Table 2 also shows the confirmation of the results obtained by GC–MS. Both experimental methods show that only one sample gave positive response. This means that only 1 of 12 samples need to be analysed with GC–MS to determine exactly its PAH concentration and composition.

The only polluted sample was obtained in Ushuaia city. Because Ushuaia is an isolated city, with no industry and with human activity focused within the town, airport and harbour, it may be proposed as the source of such contaminants that are released into the air and thence into the water. These contaminants are gathered in the surrounding glaciers, which reach heights of around 2000 m and extend downwards to sea level. The pollutants finally pass into the thaw waters.

Every Antarctic water sample contained PAH levels below the cut-off level of the test. However, there are three samples (DEC1, DEC10 and AP) that reveal the presence

Table 2
Antarctic region water-sample analysis by GC–MS

Sample reference	Screening response	Analysis by GC–MS
DEC1	No	[PHE] < 10 ng l ⁻¹ ; [ANT] < 10 ng l ⁻¹
DEC2	No	[PHE] < 10 ng l ⁻¹
DEC3	No	[PHE] < 10 ng l ⁻¹ ; [ANT] < 10 ng l ⁻¹
DEC4	No	[PHE] < 10 ng l ⁻¹ ; [ANT] < 10 ng l ⁻¹ ; [PYR] < 10 ng l ⁻¹
DEC5	No	[PHE] < 10 ng l ⁻¹ ; [ANT] < 10 ng l ⁻¹
DEC6	No	[PHE] < 10 ng l ⁻¹ ; [ANT] < 10 ng l ⁻¹
DEC7	No	[PHE] < 10 ng l ⁻¹ ; [ANT] < 10 ng l ⁻¹
DEC8	No	[PHE] < 10 ng l ⁻¹ ; [ANT] < 10 ng l ⁻¹
DEC9	No	[PHE] < 10 ng l ⁻¹ ; [ANT] < 10 ng l ⁻¹
DEC10	No	[PHE] < 10 ng l ⁻¹ ; [ANT] < 10 ng l ⁻¹
AP	No	[PHE] < 10 ng l ⁻¹ ; [ANT] < 10 ng l ⁻¹
U1	Yes	[BaP] > 10 ng l ⁻¹ ; [IcdP] < 50 ng l ⁻¹ ; [BghiP] < 70 ng l ⁻¹ ; [PHE] < 10 ng l ⁻¹ ; [ANT] < 10 ng l ⁻¹ ; [BaA] < 10 ng l ⁻¹ ; [CHRY] < 10 ng l ⁻¹ ; [BkF + BbF] < 10 ng l ⁻¹

Abbreviations: PHE = phenanthrene; ANT = anthracene; BaP; benzo[a]pyrene; PYR = pyrene; IcdP = indene(123-*cd*)pyrene; BghiP = benzo(ghi)perylene; BaA = benzo[a]anthracene; CHRY = chrysene; BkF = benzo[*k*]fluoranthene and BbF = benzo[*b*]fluoranthene.

of PAHs at a concentration slightly lower than 10 ng l⁻¹ (Fig. 5). It is important to note that these were obtained in the vicinity of the active scientific stations Caleta Cierva Cove (AP), and the Spanish Base “Gabriel de Castilla” (DEC1 and DEC10). Therefore the use of combustion engines and other human activities themselves may be related to the source of PAHs in these areas.

3.5. Confirmation of the results by GC–MS

All the Antarctic water samples together with five reference samples were sent to the Scientific Instrumentation Centre of the University of Granada (CSI-UGR) for analysis by GC–MS to compare with the results of the screening test. The procedure used to carry out the GC–MS analyses is commented in the experimental section. It meets the standards of sensitivity and selectivity required by the European Guidelines on Water for Human Consumption.

Table 2 shows the results provided by CSI-UGR. Sample DEC 1 contains PHE at a concentration lower than 10 ppt; samples DEC1, 3, 5, 6, 7, 8, 9 and 10 and AP contain PHE and ANT at lower concentrations than 10 ppt; and sample DEC4 shows the presence of PHE, ANT and PYR at levels lower than 10 ppt. Thus, none of these samples are contaminated and all gave a negative response to the proposed screening test.

The only water tested at the CSI-UGR that turned out to be contaminated was the sample U1, which contained BaP at a higher concentration than 10 ppt, IcdP at a higher concentration than 50 ppt and BghiP at a higher concentration than 70 ppt, besides revealing the presence of PHE,

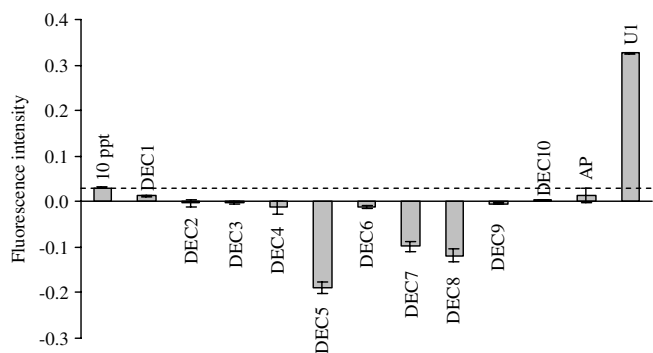


Fig. 5. Fluorescence response for 10 ng l⁻¹ BaP-doped sample and waters from the Antarctic region. (---) Cut-off level; fluorescence intensity at 10 ng l⁻¹ of BaP.

ANT, BaA, CHRY, BkF and BbF at levels lower than 10 ppt. This sample gave a positive response to the proposed screening test. So, once again, the applicability, accuracy and reliability of the proposed screening test have been corroborated.

As we commented above, BaP is considered to be an indicator of the presence of other PAHs. The CSI-UGR report shows that the only contaminated water contains BaP together with the other PAH pollutants, thus the detection of BaP in a real sample leads us to know whether the sample is contaminated by PAHs.

4. Conclusion

We have developed a rapid, sensitive fluorescence screening test for PAHs in water samples that avoids the use of more costly and time consuming methods. It runs without the need for any pre-concentration step, thus rendering it suitable for routine use in water-quality control and in environmental laboratories. The test recognises contaminated samples very quickly (150 s) and inexpensively with a cut-off level of 10 ng l^{-1} . The reliability of the screening test was ascertained by analysing tap and waste waters, showing 2% false positives and 4% false negatives in 200 samples. To demonstrate the applicability of the proposed test, Antarctic waters were analysed by using both the proposed screening test and GC–MS. The screening test coincides 100% with the results obtained with GC–MS. Thus, we consider that our test was completely successful in checking PAH levels in Antarctic waters.

From an environmental point of view, the following conclusions emerge:

- (a) Although we did not identify any sample with a PAH level exceeding the unhealthy threshold, samples collected in the vicinity of the scientific stations showed values close to this limit.
- (b) Despite the fact that population of these bases is only on average about 18 researchers and their operating period is four months a year, we found relatively high pollution levels around them. Therefore we might infer that as the population and working periods of the bases increase, the levels of pollutants will also grow to above healthy limits.
- (c) The volcanic activity of Deception Island does not seem to affect the pollutant levels, in particular as far as the PAH indicators are concerned. This has been observed by comparing the results for the rest of the samples from around the Deception Island volcano.

In conclusion, a control the level of pollutants in the areas surrounding human activity is to be recommended since it is expected that such contaminants will increase rapidly in the future, affecting not only humans but also all wild life.

Acknowledgement

The authors gratefully acknowledge the financial support of the Ministerio de Ciencia y Tecnología (ANT2001-3833), Junta de Andalucía (Proyecto de Excelencia RNM-666) and the Agencia Andaluza del Agua of the Consejería de Medioambiente de la Junta de Andalucía (agreement 2243). They also thank their English colleague A.L. Tate for revising their English text.

References

- Ackerman, A.H., Hurtubise, R.J., 1999. Solid-matrix fluorescence and phosphorescence and solid-phase microextraction of polycyclic aromatic hydrocarbons with hydrophobic paper. *Appl. Spectrosc.* 53, 770–775.
- Alfredsson, G., Branzell, C., Granelli, K., Lundström, Å., 2005. Simple and rapid screening and confirmation of tetracyclines in honey and egg by a dipstick test and LC–MS/MS. *Anal. Chim. Acta* 529, 47–51.
- Butler, J.D., Crossley, P., 1981. Reactivity of polycyclic aromatic hydrocarbons adsorbed on soot particles. *Atmos. Environ.* 15, 91–94.
- Crozier, P.W., Plomley, J.B., Matchuk, L., 2001. Trace level analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in surface waters by solid phase extraction (SPE) and gas chromatography–ion trap mass spectrometry (GC–ITMS). *Analyst* 126, 1974–1979.
- Doong, R.A., Lin, Y.T., 2004. Characterization and distribution of polycyclic aromatic hydrocarbon contaminations in surface sediment and water from Gao-ping River, Taiwan. *Water Res.* 38, 1733–1744.
- Erustes, J.A., Andrade-Eiroa, A., Cladera, A., Forteza, R., Cerdá, V., 2001. Fast sequential injection determination of benzo[*a*]pyrene using variable angle fluorescence with on-line solid-phase extraction. *Analyst* 126, 451–456.
- European Union, 2004. Directive 2004/107/EC of the European Parliament and of the Council of 15 December 2004 relating to arsenic, cadmium, mercury, nickel and polycyclic aromatic hydrocarbons in ambient air.
- European Union, 2005. Commission Regulation (EC) No 208/2005 of 4 February 2005 amending Regulation (EC) No. 466/2001 as regards polycyclic aromatic hydrocarbons.
- Fernández-Sánchez, J.F., Segura-Carretero, A., Cruces-Blanco, C., Fernández-Gutiérrez, A., 2004. Highly sensitive and selective fluorescence optosensor to detect and quantify benzo[*a*]pyrene in water samples. *Anal. Chim. Acta* 506, 1–7.
- Grassi, V., Dias, A.C.B., Zagatto, E.A.G., 2004. Flow systems exploiting in-line prior assays. *Talanta* 64, 1114–1118.
- Jaffrezo, J.L., Clain, M.P., Masclat, P., 1994. Polycyclic aromatic hydrocarbons in the polar ice of Greenland – geochemical use of these atmospheric tracers. *Atmos. Environ.* 28, 1139–1145.
- Johnson, C., Greenberg, A., 1999. Extraction and high-performance liquid chromatographic separation of selected pyrene and benzo[*a*]pyrene sulfates and glucuronides: preliminary application to the analysis of smokers' urine. *J. Chromatogr. B* 728, 209–216.
- Kazerouni, N., Sinha, R., Hsu, C.H., Greenberg, A., Rothman, N., 2001. Analysis of 200 food items for benzo[*a*]pyrene and estimation of its intake in an epidemiologic study. *Food Chem. Toxicol.* 39, 423–436.
- Kim, G.B., Maruya, K.A., Lee, R.F., Koh, C.H., Tanabe, C., 1999. Distribution and sources of polycyclic aromatic hydrocarbons in sediments from Kyeonggi Bay, Korea. *Mar. Pollut. Bull.* 38, 7–15.
- Kim, E.J., Oh, J.E., Chang, Y.S., 2003. Effects of forest fire on the level and distribution of PCDD/Fs and PAHs in soil. *Sci. Total Environm.* 311, 177–189.
- Lima, R.A.C., Santos, S.R.B., Costa, R.S., Marcone, G.P.S., Honorato, R.S., Nascimento, V.B., Araujo, M.C.U., 2004. Hardness screening of water using a flow-batch photometric system. *Anal. Chim. Acta* 518, 25–30.

- Melikian, A.A., Sun, P., Prokopczyk, B., El-Bayoumy, K., Hoffmann, D., Wang, X., Waggoner, S., 1999. Identification of benzo[*a*]pyrene metabolites in cervical mucus and DNA adducts in cervical tissues in humans by gas chromatography–mass spectrometry. *Cancer Lett.* 146, 127–134.
- Meseguer-Lloret, S., Campins-Falco, P., Cardenas, S., Gallego, M., Valcarcel, M., 2004. FI automatic method for the determination of copper(II) based on coproporphyrin I-Cu(II)/TCPO/H₂O₂ chemiluminescence reaction for the screening of waters. *Talanta* 64, 1030–1035.
- Nascentes, C.C., Cardenas, S., Gallego, M., Valcarcel, M., 2002. Continuous photometric method for the screening of human urines for phenothiazines. *Anal. Chim. Acta* 462, 275–281.
- Nogami, Y., Imaeda, R., Ito, T., Kira, S., 2000. Benzo(*a*)pyrene adsorbed to suspended solids in fresh water. *Environ. Toxicol.* 15, 500–503.
- Padros, J., Pelletier, E., 2001. Subpicogram determination of (+)-anti-benzo[*a*] pyrene diol-epoxide adducts in fish albumin and globin by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Anal. Chim. Acta* 426, 71–77.
- Panne, U., Dicke, C., Duesing, R., Niessner, R., Bidoglio, G., 2000a. Stimulated Raman scattering as an excitation source for time-resolved excitation–emission fluorescence spectroscopy with fiber-optical sensors. *Appl. Spectrosc.* 54, 536–547.
- Panne, U., Knoller, A., Kotzick, R., Niessner, R., 2000b. On-line and in-situ detection of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) on aerosols via thermodesorption and laser-induced fluorescence spectroscopy. *Fresenius J. Anal. Chem.* 366, 408–414.
- San Vicente De La Riva, B., Costa-Fernández, J.M., Pereiro, R., Sanz-Medel, A., 2002. Spectrafluorimetric method for the rapid screening of toxic heavy metals in water samples. *Anal. Chim. Acta* 451, 203–210.
- Serrano, A., Gallego, A., 2004. Direct screening and confirmation of benzene, toluene, ethylbenzene and xylenes in water. *J. Chromatogr. A* 1045, 181–188.
- Tan, W.G., Carnelley, T.J., Murphy, P., Wang, H.L., Lee, J., Barker, S., Weinfeld, M., Le, X.C., 2001. Detection of DNA adducts of benzo[*a*]pyrene using immunoelectrophoresis with laser-induced fluorescence – analysis of A549 cells. *J. Chromatogr. A* 924, 377–386.
- Valcárcel, M., Cardenas, S., Gallego, M., 1999. Sample screening systems in analytical chemistry. *Trends Anal. Chem.* 18, 685–694.
- Valcárcel, M., Cardenas, S., Gallego, M., 2002. Continuous flow systems for rapid sample screening. *Trends Anal. Chem.* 21, 251–258.
- Vázquez Troche, S., García Falcon, M.S., González Amigo, S., Lage Yuste, M.A., Simal Lozano, J., 2000. Enrichment of benzo[*a*]pyrene in vegetable oils and determination by HPLC-FL. *Talanta* 51, 1069–1076.
- Venkataraman, C., Lyons, J.M., Friedlander, S.K., 1994. Sire distributions of polycyclic aromatic-hydrocarbons and elemental carbon. 1. Sampling, measurement methods, and source characterization. *Environ. Sci. Technol.* 28, 555–562.
- Weber, K., Goerke, H., 2003. Persistent organic pollutants (POPs) in Antarctic fish: levels, patterns, changes. *Chemosphere* 53, 667–678.
- Whitcomb, J.L., Campiglia, A., 2001. Screening potential of solid-phase extraction and solid surface room temperature fluorimetry for polycyclic aromatic hydrocarbons in water samples. *Talanta* 55, 509–518.
- World Health Organization, 1984. Guidelines for Drinking-Water Quality, vol. 2. World Health Organization, Geneva.
- Yokley, R.A., Garrison, A.A., Wehry, E.L., Mamantov, G., 1986. Photochemical transformation of pyrene and benzo[*a*]pyrene vapor-deposited on 8 coal stack ashes. *Environ. Sci. Technol.* 20, 86–90.
- Yoshida, H., Araki, J., Sonoda, J., Nohta, H., Ishida, J., Hirose, S., Yamaguchi, M., 2005. Screening method for organic aciduria by spectrophotometric measurement of total dicarboxylic acids in human urine based on intramolecular excimer-forming fluorescent derivatization. *Anal. Chim. Acta* 534, 177–183.

BI.8. Conclusiones del bloque I

Se ha desarrollado un test de screening rápido y sencillo para detectar HAPs en aguas que evita el uso de metodologías costosas y que requieren un mayor tiempo de análisis. Para ello, se ha utilizado un optosensor, previamente diseñado por nuestro grupo de investigación, que permite llevar a cabo medidas de fluorescencia directamente sobre las muestras, sin necesidad de ninguna etapa previa de preconcentración o de tratamiento de muestra. El test reconoce muestras contaminadas con HAPs muy rápidamente (150 s), de forma muy sencilla y con una concentración umbral de 10 ng l⁻¹. El estudio de fiabilidad del test de screening se realizó analizando muestras de agua del grifo y aguas residuales, obteniéndose un 2% de falsos positivos y un 4% de falsos negativos, para un total de 200 muestras. Además, para demostrar la aplicabilidad de método, se llevó a cabo un análisis de muestras de agua obtenidas de diferentes puntos de la Antártida a las que se aplicó el test de screening desarrollado y los resultados se compararon con los obtenidos mediante GC-MS. Se obtuvo un 100% de coincidencia entre ambas metodologías, por lo que podemos concluir que nuestro test de screening ha detectado de forma exitosa los niveles de HAPs en aguas de las diferentes zonas antárticas chequeadas.

Desde un punto de vista ambiental, podemos extraer varias conclusiones importantes:

- (a) Aunque no se identificó ninguna muestra con niveles de HAPs que superasen el límite establecido, aquellas muestras recogidas cerca de las estaciones experimentales arrojaron valores muy cercanos.
- (b) A pesar del bajo número de personas por estación científica (unas 18) y del corto periodo de estancia (4 meses al año), se encontraron valores relativamente altos de HAPs a su alrededor. Es previsible que una mayor duración en la estancia y un

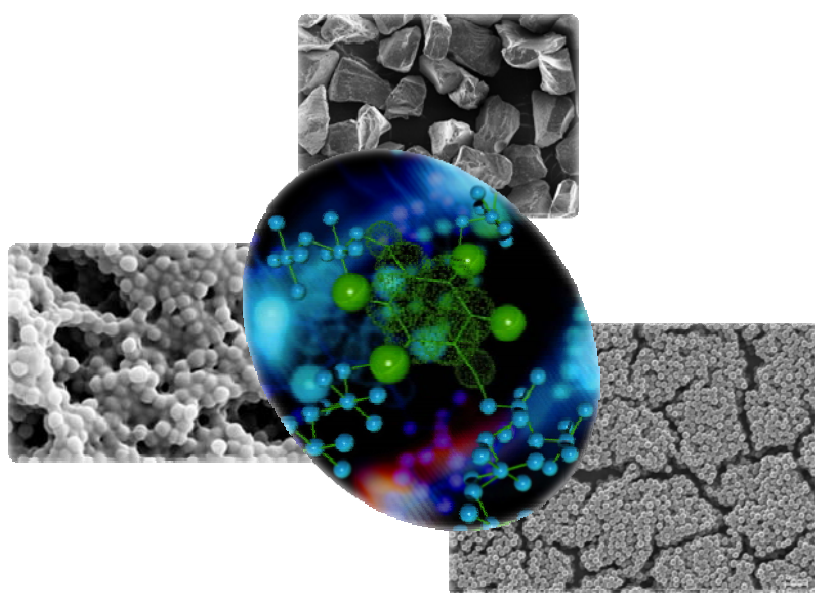
aumento del número de investigadores provocará un aumento de la concentración de HAPs.

En conclusión, es muy recomendable llevar a cabo un control de los niveles de contaminación en aquellas áreas antárticas donde se desarrolla cualquier tipo de actividad humana, ya que es de esperar que dicha concentración aumente progresivamente, afectando no solo a los seres humanos, sino también a la vida salvaje.

BI.9. Bibliografía del bloque I

1. Valcarcel, M.; Cardenas, S.; Gallego, M. Sample screening systems in analytical chemistry. *Trac-Trends in Analytical Chemistry* **1999**, *18*, 685-694.
2. San Vicente de la Riva, B. Tesis Doctoral: *Tesis Doctoral "Metodologías luminiscentes para la determinación de metales tóxicos en muestras de interés medioambiental"*, Universidad de Oviedo, Oviedo, **2001**.
3. <http://www.epa.egov/>
4. World Health Organization. Guidelines for Drinking-Water Quality. *Geneva*. **1984**, 2.
5. Kazerouni, N.; Sinha, R.; Hsu, C.H.; Greenberg, A.; Rothman, N. Analysis of 200 food items for benzo(a)pyrene and estimation of its intake in an epidemiologic study. *Food and Chemical Toxicology* **2001**, *39*, 423-436.
6. Johnson, C.; Greenberg, A. Extraction and high-performance liquid chromatographic separation of selected pyrene and benzo[a]pyrene sulfates and glucuronides:

- preliminary application to the analysis of smokers' urine. *Journal of chromatography B* **1999**, 728, 209-216.
7. Funk, W.; *Merk Spectrum* **1991**, 2, 18.
 8. Meléndez Colón, V.J.; Smith, C.A.; Seidel, A.; Luch, A.; Platt, K.L.; Baird, W.M. Formation of stable adducts and absence of depurinating DNA adducts in cells and DNA treated with the potent carcinogen dibenzo(a,l)pyrene or its diol epoxides. *Proceeding of the National Academy of Science of the USA* **1997**, 94, 13542-13547.
 9. Vo-Dinh, T. *Chemical Analysis: Chemical Analysis of Polycyclic Aromatic Compounds*; Ed. Wiley: New York, 1989.
 10. Salinas-Castillo, A.; Fernandez-Sanchez, J. F.; Segura-Carretero, A.; Fernandez-Gutierrez, A. Solid-surface phosphorescence characterization of polycyclic aromatic hydrocarbons and selective determination of benzo(a)pyrene in water samples. *Analytica Chimica Acta* **2005**, 550, 53-60.



BLOQUE EXPERIMENTAL II

DISEÑO Y SÍNTESIS DE MIPs PARA LA

**DETERMINACIÓN DE MONOAMINO NAFTALENOS EN
AGUA**

BII. DISEÑO Y SÍNTESIS DE MIPs PARA LA DETERMINACIÓN DE MONOAMINO NAFTALENOS EN AGUA

BII.1. Monoamino naftalenos. Generalidades, toxicidad e impacto ambiental

Los dos monoamino naftalenos (NCs) estudiados en este bloque experimental son la 1-naftilamina (1-NA) y 2-naftilamina (2-NA), cuyas estructuras moleculares están representadas en la Fig. BII. 1.

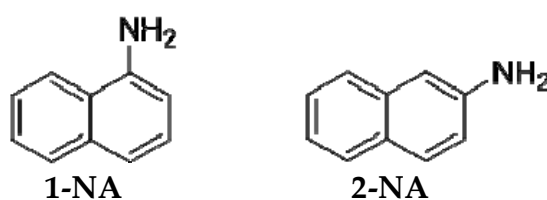


Fig. BII. 1. Estructuras moleculares de 1-NA y 2-NA

Ambas sustancias figuran en la lista de sustancias peligrosas (Hazardous Substance List) ya que están reglamentadas por la OSHA (Occupational Safety and Health Administration), y han sido citadas por el DOT (U.S. Department of Transportation), el NIOSH (The National Institute for Occupational Safety and Health), el DEP (Department of Environmental Protection), la IARC (International Agency for Research on Cancer), la NFPA (National Fire Protection Association) y la EPA (Environmental Protection Agency) como sustancias carcinogénicas y mutagénicas. La 1-NA es mutagénica (ocasiona cambios genéticos) y puede afectar a la fertilidad en humanos. En cuanto a la 2-NA, debido a su potencial carcinogénico, figura en la Lista de Sustancias Extremadamente Peligrosas para la Salud (Special Health Hazard Substance List).

Existen suficientes evidencias de carcinogenicidad en seres humanos con respecto a esta molécula¹. Estudios epidemiológicos han demostrado que la exposición ocupacional a la 2-NA, sola o presente como impureza en otros compuestos, causa cáncer de vejiga. Diversos estudios llevados a cabo por la Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer (IARC) en trabajadores de industrias químicas de aditivos y colorantes, expuestos principalmente a 2-NA, encontraron un aumento de este tipo de cáncer. En estos estudios, este aumento no se podía explicar por el hábito de fumar de los trabajadores. Los informes concluyeron que la causa del cáncer de vejiga se debía exclusivamente a la exposición a 2-NA.

Tanto 1-NA como 2-NA tienen vías similares de entrada al medio. Son emitidas fundamentalmente a través de las aguas residuales de la industria de tintes y pigmentos, donde se utilizan como intermedios químicos. Asimismo, pueden incorporarse al medio a través de aguas residuales y efluentes procedentes del alquitrán, de la gasificación del carbón y de instalaciones de tratamiento de pizarra. La 1-NA encuentra otra fuente de entrada a través de la degradación del herbicida naptalam (véase la Fig. BII. 2).

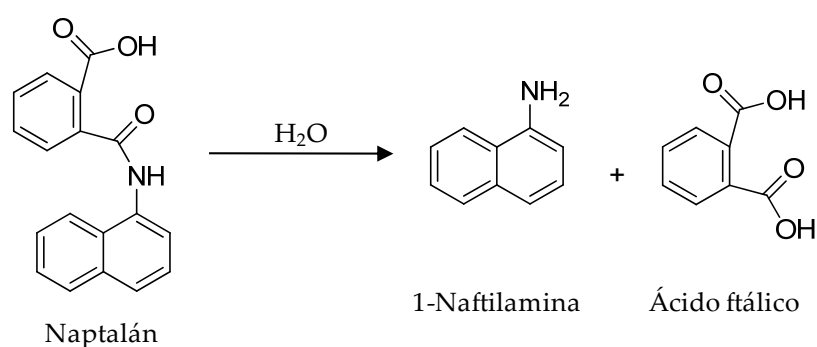


Fig. BII. 2. Degradación del naptalm

La combustión de los combustibles que contienen un alto contenido del nitrógeno es otra vía importante de incorporación de estas sustancias al ambiente;

pero sin duda, la vía que resulta un tanto más llamativa, es la liberación al medio de 1-NA y 2-NA a través del humo de los cigarrillos. Así, mientras la 2-NA puede ser generada durante la combustión del tabaco^{2, 3}, la 1-NA es un aditivo usado en la industria tabacalera⁴.

Al igual que el resto de HAPs, estas moléculas pueden encontrarse en casi todas partes. Los valores de los NCs en aguas superficiales se encuentran entre 0.1 y 830 ng l⁻¹, aunque los valores habituales oscilan entre 2 y 50 ng l⁻¹. La concentración en este tipo de aguas es mayor que en aguas de bebida o subterráneas, debido a la presencia de sólidos suspendidos donde se adsorben los NCs. Las aguas de manantial son filtradas de forma natural al pasar por diversos terrenos quedando allí retenidos los NCs. Análogamente, los procesos de tratamiento (decantación y filtración) de las aguas potables retiran partículas, que se encuentran en suspensión, reduciendo las concentraciones de estos hidrocarburos no rebasándose el valor límite de 200 ng l⁻¹ (véase Tabla BII. 1).

Tabla BII. 1. Concentraciones habituales de los NCs en aguas

Tipos de aguas	Concentración media (ng l ⁻¹)	Intervalo (ng l ⁻¹)
Agua superficial	8.0	0.1-830
Agua de manantial	1.2	0.2-6.9
Agua potable	2.8	0.1-62

Al considerarse estas moléculas como cancerígenas y/o mutagénicas y por su toxicidad a bajos niveles de concentración, hace que su distribución, en los más variados ambientes y productos, sea objeto de notable atención por parte tanto de investigadores de diverso tipo, autoridades sanitarias y, cada vez con más fuerza, ciudadanos, asociaciones y gobernantes⁵.

Generalmente, debido a la complejidad de las muestras donde se encuentran, es necesaria una separación previa a la detección en la que, las técnicas más empleadas son la cromatografía de gases, cromatografía líquida y cromatografía de fluidos supercríticos; siendo los sistemas de detección más comúnmente empleados los métodos fotométricos, fluorimétricos o la espectrometría de masas⁶⁻⁸. Además de las técnicas separativas, se han propuesto multitud de métodos espectrofotométricos y luminiscentes⁹. Debido a que los NCs poseen estructuras condensadas, presentan espectros de absorción UV-visible muy característicos, con bandas estrechas y generalmente bien definidas, propiedad que ha permitido la detección individual de los mismos por espectrofotometría UV-visible¹⁰. Sin embargo, no es una técnica que sea útil para la resolución de mezclas. Para mejorar su selectividad, sin necesidad de una etapa previa de separación, se propusieron métodos de análisis multicomponente empleando para ello derivadas, aunque tampoco eran útiles con muestras complejas pues las longitudes de onda de los NCs están muy próximas.

Además, los métodos para el análisis de NCs deben ser muy sensibles pues se suelen encontrar en muy pequeñas cantidades. Para ello, las técnicas luminiscentes, que presentan como característica inherente la sensibilidad, constituyen, desde hace varias décadas, procedimientos de rutina en los laboratorios de análisis para la detección de este tipo de compuestos.

Todos los NCs poseen fluorescencia intrínseca. Sin embargo, de nuevo, existe un gran solapamiento de las bandas fluorescentes de los distintos NCs, lo que limita la aplicación de la técnica a muestras complejas, por falta de selectividad. La limitación de la selectividad de esta técnica para el análisis de muestras complejas puede ser soslayada, sin la necesidad de llevar a cabo una etapa de separación previa, usando medios organizados u optimizando la instrumentación de medida.

Todo este conjunto de técnicas resultan muy eficientes para la determinación de NCs. El problema estriba en la necesidad de métodos de análisis rápidos, simples y baratos para la detección de este tipo de moléculas, evitando así costosos procedimientos de análisis (característicos de las técnicas separativas anteriormente citadas) y largos tiempos de espera en las etapas de tratamiento de la muestra, preconcentración, etc. En este marco, ha surgido una demanda creciente de nuevos procedimientos que permitan solventar los problemas antes citados. Así, el desarrollo de nuevos materiales nanoestructurados que permitan su implementación en sensores ópticos para la detección de moléculas de interés, como es el caso de los NCs, se ha convertido en una solución eficaz para la monitorización, detección y cuantificación de este tipo de moléculas.

En este contexto, los MIPs combinan sus altas propiedades de reconocimiento molecular, comparables con las de algunos sistemas biológicos, junto con características muy importantes como son robustez y estabilidad química y mecánica, además de la posibilidad de ser utilizados en medios tanto acuosos como no acuosos y de ser sintetizados en muy diversos formatos. Estas características los hace particularmente apropiados para ser usados como elementos de reconocimiento en sensores ópticos.

BII.2. MIPs magnéticos microparticulados

Atendiendo a las propiedades de los MIPs, estos ofrecen una elevada selectividad (posibilidad de retener o interaccionar con un determinado analito). El hecho de implementarlos en optosensores convencionales utilizando la luminiscencia molecular como técnica analítica de detección, les confiere la sensibilidad analítica inherente a este tipo de técnicas. A pesar de todo, la configuración del optosensor

final puede ofrecer una gran selectividad pero la sensibilidad, muchas veces, no es la deseada.

Este problema de sensibilidad se puede abordar desde distintos puntos de vista, sin embargo, uno de los caminos que mejores resultados está mostrando es la disminución de tamaño (nonoescala o microescala) para así aumentar su superficie activa y, por tanto, aumentar significativamente su respuesta. Por otro lado, el uso de fibras ópticas para actuar de transporte de la radiación de excitación y de emisión, aportaría los beneficios propios de este tipo de estos sistemas (véase apartado 4, de la sección SENSORES ÓPTICOS). Para poder implementar estas guías de luz en el sensor, una de las opciones más interesantes es la de conferir propiedades magnéticas a los MIPs sintetizados y así ser fácilmente recolectables mediante el empleo de un colector magnético acoplado a la fibra óptica diseñado especialmente para este propósito.

La estrategia experimental seguida en este trabajo está enfocada a la encapsulación de magnetita en el interior de partícula poliméricas y situar al MIP en la superficie. Esto haría que la magnetita quedase dentro del material sensor transfiriendo propiedades magnéticas sin que ello conlleve una disminución de la sensibilidad analítica.

En esta metodología es necesario, por tanto, disponer de partículas magnéticas dispersables en disolventes orgánicos apolares, que son los que normalmente se utilizan en la obtención de MIPs. Existen muchos tipos de partículas magnéticas dispersables en medios apolares, pero en este caso, debido a la simplicidad de su síntesis se van a usar nanopartículas de magnetita ($\gamma\text{-Fe}_3\text{O}_4$) recubiertas con ácido oleico ($\gamma\text{-Fe}_3\text{O}_4\text{-OA}$)¹¹.

Así, el primer paso consiste en diseñar las partículas magnéticas. Éstas van a ser partículas tipo *core-shell*, donde el corazón (*core*) sea el que posee la $\gamma\text{-Fe}_3\text{O}_4\text{-OA}$ y el recubrimiento (*shell*) permita que estas partículas se puedan suspender en el cóctel de polimerización del MIP y se puedan recubrir por éste. Este procedimiento se llevará a cabo mediante la técnica de **polimerización en miniemulsión en dos pasos** descrita en la sección 3.1 del apartado NANOTECNOLOGÍA Y CIENCIA DE LOS MATERIALES APLICADAS AL DESARROLLO DE FASES SENSORAS ÓPTICAS Y NUEVOS MATERIALES utilizando el sistema que se muestra en la Fig. BII. 3.



Fig. BII. 3. Fotografía real del sistema usado para llevar a cabo la generación de nanopartículas magnéticas.

La Fig. BII. 4 muestra un esquema de las partículas “core-shell” que después se van a recubrir con el MIP y la Fig. BII. 5 muestra una fotografía de microscopía electrónica de transmisión (TEM) de este tipo de partículas.

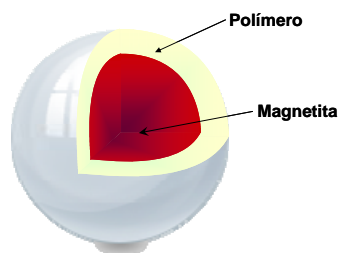


Fig. BII. 4. Simulación de las partículas tipo core-shell que se van a usar para transferir propiedades magnéticas a la fase sensora

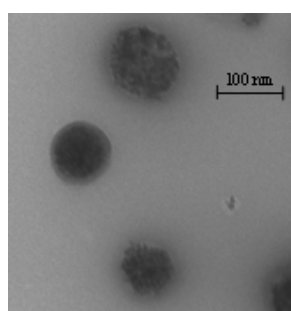


Fig. BII. 5. Fotografías TEM de las partículas tipo core-shell que se quieren preparar para incluir propiedades magnéticas en los MIPs

El siguiente paso consiste en suspender estas partículas en el cóctel de polimerización del MIP, de forma que queden embebidas dentro del MIP (ver Fig. BII. 6). Este proceso se va a llevar a cabo mediante **polimerización por precipitación**.

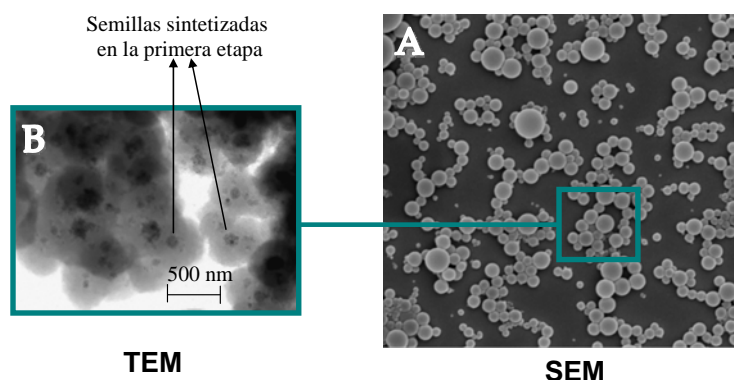


Fig. BII. 6. Fotografías de A) SEM, B) TEM de las partículas obtenidas por polimerización por precipitación que contienen las nanopartículas tipo *core-shell* (semillas) en su estructura

BII.3. Caracterización óptica de los MIPs magnéticos sintetizados

Para caracterizar los MIPs magnéticos preparados en este trabajo se va a usar un sistema como en el que se describe en la Fig. BII. 7. Está formado por un espectrómetro de luminiscencia con un adaptador de fibras ópticas y un separador magnético que se coloca en el extremo de la fibra. Este separador magnético fue descrito por Chojnacki *y col.*¹² y es capaz de coleccionar las partículas magnéticas justamente enfrente de la fibra óptica (ver Fig. BII. 8).



Fig. BII. 7. Fotografía del sistema de fibra óptica diseñado para la caracterización espectroscópica de las fases sensoras magnéticas

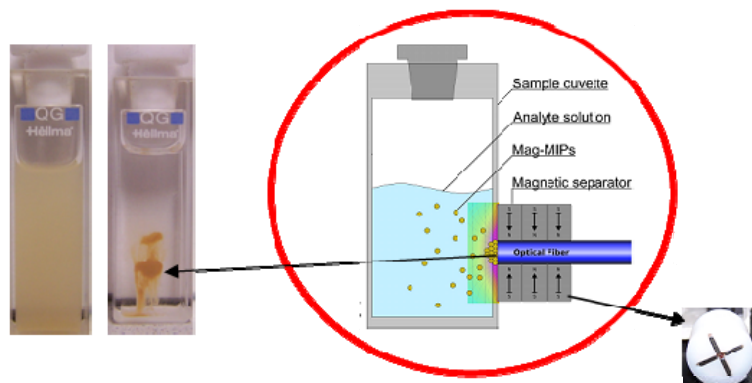


Fig. BII. 8. Separador magnético diseñado según Chojnacki *y col.*¹² y mecanismo de recolección de las partículas magnéticas dentro de la célula de medida

Por tanto, la metodología de medida consiste en poner la muestra en una cubeta, que contiene una cantidad determinada de polímero magnético, agitar y colocar en el portamuestras. Por efecto del campo magnético producido por la distribución de imanes del separador magnético de la Fig. BII. 8, las partículas se colectan en frente de la fibra óptica pudiéndose medir desde fuera la luminiscencia de las mismas. Para limpiar (regenerar) las partículas, se hace uso de campos magnéticos, para evitar que se pierda el material, y disolventes orgánicos que limpien la fase sensora (véase Fig. BII. 9).

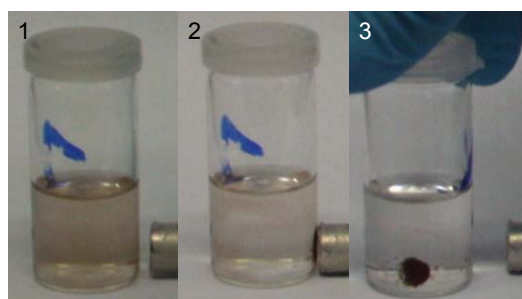


Fig. BII. 9. Ejemplo de recolección de material magnético para su limpieza: 1) situación inicial; 2) situación intermedia; 3) todo el material recolectado.

La Fig. BII. 10 muestra un ejemplo de diferentes medidas llevadas a cabo con este sistema.

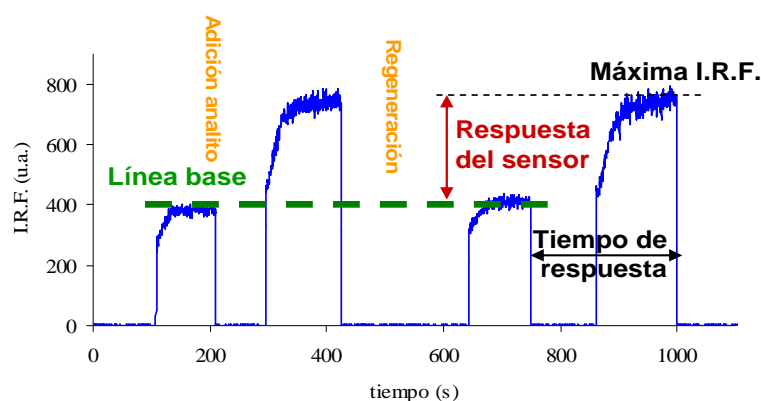


Fig. BII. 10. Ejemplo de fiagrama obtenido con la medida del sistema de la Fig. BII. 7

BII.4. Objetivos del bloque II

Los objetivos a desarrollar en este bloque experimental son:

1. Diseñar y sintetizar, mediante la técnica de polimerización en disolución, un MIP que permita la detección y cuantificación por fluorescencia de 1-naftilamina (1-NA) y 2-naftilamina (2-NA) en aguas de consumo humano. El MIP sintetizado será caracterizado por FTIR y se evaluarán sus propiedades de enlace y afinidad mediante isothermas de adsorción. Tras la implementación de este polímero como fase sensora en un optosensor convencional, será aplicado al análisis conjunto de 1-NA y 2-NA en aguas de consumo.
2. Una vez identificadas aquellas moléculas que puedan interferir en la determinación de 1-NA y 2-NA, se procederá a aplicar herramientas quimiométricas clásicas (PLS-1 y algoritmos de segundo orden como N-PLS y U-PLS) para llevar a cabo una cuantificación individual de 1-NA y 2-NA en muestras de agua de consumo. Para llevar a cabo este trabajo se ha contado con la colaboración del Departamento de Química Analítica de la Universidad de Rosario (Argentina), especialistas en técnicas quimiométricas.
3. Con el objetivo de que el MIP desarrollado para la determinación de NCs sea fácilmente implementable en dispositivos de fibra óptica, este polímero va a ser sintetizado en forma de microesferas y se le van a incorporar propiedades magnéticas. Será así el primer MIP poliuretánico sintetizado en este formato y, por tanto, se trata de un paso más en el diseño de fases sensoras ópticas basadas en tecnología MIP.

BII.5. Capítulos del bloque II

El trabajo de investigación desarrollado en este bloque experimental ha dado lugar a los siguientes capítulos:

Capítulo 2: The development of a MIP-optosensor for the detection of monoamine naphthalenes in drinking water. *Biosens. Bioelectr.* 24 (2009) 2305-2311.

Capítulo 3: Chemometric-assisted MIP-optosensing system for the simultaneous determination of monoamine naphthalenes in drinking waters. *Talanta* 78 (2009) 57–65.

Capítulo 4: Synthesis of a novel polyurethane-based-magnetic imprinted polymer for the selective optical detection of 1-naphthylamine in drinking water. *Enviado a Biosensors and Bioelectronics*.



Contents lists available at ScienceDirect

Biosensors and Bioelectronics

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bios

The development of a MIP-optosensor for the detection of monoamine naphthalenes in drinking water

Angel Valero-Navarro^a, Alfonso Salinas-Castillo^b, Jorge F. Fernández-Sánchez^{a,*}, Antonio Segura-Carretero^a, Ricardo Mallavia^b, Alberto Fernández-Gutiérrez^{a,*}

^a Department of Analytical Chemistry, University of Granada, c/Fuentenueva s/n, 18071 Granada, Spain¹

^b Institute of Molecular and Cellular Biology, University Miguel Hernandez, Elche, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 2 July 2008

Received in revised form 3 October 2008

Accepted 27 November 2008

Available online 7 December 2008

Keywords:

Molecular imprinting

Fluorescence optosensor

Flow injection

Naphthalene compounds

Water analysis

ABSTRACT

To enhance the advantages of fluorescent flow-through sensing for drinking water we have designed a novel sensing matrix based on molecularly imprinted polymers (MIPs). The synergic combination of a tailor-made MIP recognition with a selective room temperature fluorescence detection is a novel concept for optosensing devices and is assessed here for the simple and selective determination of pollutants in water.

We describe a simple approach to preparing synthetic receptors for monoamine naphthalene compounds (MA-NCs) using non-covalent molecular imprinting techniques and naphthalene as template. We examine in detail the binding characteristics of the imprinted polymer and describe the flow-through sensor of MA-NCs by solid-surface fluorescence. Its detection limits for recognizing 1-naphthylamine (1-NA) and 2-naphthylamine (2-NA) separately are 26 ng mL⁻¹ and 50 ng mL⁻¹, respectively, and it also determines 1-NA and 2-NA simultaneously with a detection limit of 45 ng mL⁻¹.

All the instrumental, chemical and flow variables were carefully optimized and an interference study was carried out to demonstrate its applicability and selectivity. Finally, we applied it to the analysis of 1-NA and 2-NA in tap and mineral waters, obtaining a 98% average recovery rate.

© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Contamination of surface water and groundwater with aromatic compounds is one of the most serious environmental problems that humans face today. Therefore the efficient detection of aromatic compounds in waste streams has taken on increasing environmental concern (Lee and Ku, 1996; Liu et al., 2003). Owing to their acute toxicity and poor biodegradation, 1-naphthylamine (1-NA) and 2-naphthylamine (2-NA), both monoamine naphthalene compounds (MA-NCs), are top-priority contaminants and also the most important substructures of potentially carcinogenic pollutants discharged from pharmaceutical, dyestuff, photographic and agrochemical industries (Zhu and Chen, 2000; Li et al., 2001) and cigarette smoke (Stabbert et al., 2003).

Despite growing demands for reliable sensors, few methods can be used to detect chemical agents quickly at the level required by the Environmental Protection Agency (EPA) and other inter-

national organizations. Technologies currently being used, such as gas chromatography–mass spectroscopy (GC–MS) and high-performance liquid chromatography (HPLC), require large, non-portable, expensive experimental devices and often call for extensive analytic procedures (Black et al., 1994; Jenkins and Bae, 2005).

Table 1 shows an overview of the proposed methods for determining MA-NCs in water together with the advantages and disadvantages of the novel technology described in this work.

The combination of flow-injection with detection on optically active surfaces packed in a flow-through cell (optosensor) (Fernández-Sánchez et al., 2003, 2004) has proved to offer important advantages due to its high sensitivity and selectivity, precision, simplicity, speed and low cost (Casado Terrones et al., 2005). Further developments of these optosensing techniques have shortened analysis time considerably and reduced costs for routine environmental control.

Molecular imprinting is a known polymerization technique that prepares synthetic polymers with recognition sites for target analytes (Haupt and Mosbach, 2000; Haupt, 2001; Merkoci and Alegret, 2002). Molecularly imprinted polymers (MIPs) are made by synthesizing highly cross-linked polymers in the presence of “printing” molecules (templates). After removal of the template, the polymer can be used as a selective medium for the template molecule

* Corresponding authors. Tel.: +34 958 248593; fax: +34 958 249510.

E-mail addresses: jffernan@ugr.es (J.F. Fernández-Sánchez), albertof@ugr.es (A. Fernández-Gutiérrez).

¹ www.ugr.es/local/fqm297.

Table 1
Overview of the methods described in the literature for determining MA-NCs compared with the proposed optosensor.

Method	Detection limit (ng mL ⁻¹)		Time analysis (s)	Sample treatment	Ref.
	1-NA	2-NA			
HPLC-DAD		250	700	Yes	Lehotay et al. (1999)
HPLC-ED	1.4	1.3	500	Yes	Zima et al. (2007)
Spectrophotometry	10		600	Yes	Xia et al. (1995)
Reflectance sensor	1.1		600	Yes	Guzmán-Mara et al. (2006)
GC-MS	0.01		900	Yes	Ghassempou et al. (2001)
Proposed optosensor	26	50	120	No	This work

and structurally related compounds. MIPs combine highly selective molecular recognition properties which are comparable to those of biological systems, with characteristics such as physical robustness, and good thermal, chemical and mechanical stability. This renders them particularly suitable for use as recognition elements in sensor technology (Suárez Rodríguez and Díaz García, 2001; Blanco López et al., 2004; Adhikari and Majumdar, 2004; Sánchez Barragán et al., 2005; Greene and Shimizu, 2005; Ebarvia and Sevilla, 2005; Salinas Castillo et al., 2005; Suedee et al., 2006; Matsuguchi and Uno, 2006; Ng and Narayanaswamy, 2006; D'Agostino et al., 2006; Holthoff and Bright, 2007; Huang et al., 2007). Furthermore, these materials can be employed in both aqueous and non-aqueous media and may be manufactured in several configurations. Thus, the use of MIP appears to be a very interesting alternative to obtain new powerful recognition materials that can be used in the development of optical chemical sensors (Suárez Rodríguez and Díaz García, 2001; Blanco López et al., 2004; Adhikari and Majumdar, 2004; Sánchez Barragán et al., 2005; Lakshmi et al., 2006; Breton et al., 2006; Paniagua Gonzalez et al., 2008).

The basic approach consists of extracting the organic pollutants from the samples with a non-polar solid material and measuring their luminescence emission directly on the solid substrate. The analytical merits include simple and rapid experimental procedures, low levels of detection and selectivity at the screening level. The method is often suitable for portable instrumentation and field analysis. Because of the non-destructive nature of luminescence measurements, materials extracted from contaminated samples can be brought to the lab for subsequent specific compound identification by high-resolution techniques.

In this research we describe a simple approach to prepared synthetic receptors for monoamine naphthalene compounds using non-covalent molecular imprinting techniques and naphthalene as a template, and their implementation as an optical flow-through sensor for detecting and quantifying these molecules.

2. Experimental

2.1. Chemicals

Naphthalene (NAPH), 1-NA, 2-NA, naptalam, α -naphthaleneacetamide and thiabendazole were from Sigma Chemical Co. Bisphenol A (2,2-bis(4-hydroxyphenyl)propane), 2-naphthol and 1-naphthalenemethylamine were from Aldrich (Milwaukee, WI, USA). Phloroglucinol, 1-naphthol and carbazole were from Fluka Chemie (Steinheim, Germany). Acetonitrile, 1-naphthylacetic acid, 2-naphthylacetic acid and diphenylmethan-4,4'-diisocyanate (MDI) were from Merck (Darmstadt, Germany). Fuberidazole, napropamide and carbaryl were from Riedel-de-Haën. Tetrahydrofuran (THF) was from Panreac (Madrid, Spain). All reagents were used as received without further purification. Table S1 of the electronic supporting information (ESI) shows the chemical structures of all the compounds used.

Freshly prepared ultrapure deionized water (Milli-Q3 RO/MilliQ2 system, Millipore, UK) was used in all experiments.

2.2. Sample and solution preparation

Stock solutions (50 μ g mL⁻¹) of the individual MA-NCs were prepared by dissolving the appropriate amount of the solid in deionized water and storing at 4 °C in the dark (for a period of up to 1 month). Intermediate stock solutions of 1-NA and 2-NA were prepared daily by diluting the 50 μ g mL⁻¹ solution in water.

For the interference studies, solutions of the analytes containing the interference species were prepared by adding the appropriate amount of the interferent to the stock solution. 1-NA, 2-NA, 1-naphthol, 2-naphthol, 2-naphthylacetic acid, 1-naphthoxyacetic acid, fuberidazole, naptalam, carbaryl, α -naphthaleneacetamide and 1-naphthalenemethylamine were diluted in Milli-Q water; naphthalene and thiabendazole were dissolved in Milli-Q water with 20% (v/v) of acetonitrile; napropamide was diluted in a 90:10 water:acetonitrile solution and carbazole was dissolved in 50% (v/v) acetonitrile:water.

2.3. Synthesis of imprinted polymers

The monomers used in the synthesis were chosen on the basis of previous works by Dickert et al. (1999, 2004) and our research (Salinas Castillo et al., 2005; Sánchez Barragán et al., 2005). Molecular imprinting by solution polymerization was used to prepare bulk MIPs.

MIPs were prepared from bisphenol A and MDI as functional monomers, phloroglucinol as an additional cross-linker, naphthalene as template and THF as solvent (Table 2).

The mixture was poured into a glass vial, stirred and stored uncapped in the dark for 4 days at 25 °C (room temperature) until the organic solvent had completely evaporated. The resulting monolith was ground in an agate mortar, washed with acetonitrile, and dried at 30–35 °C. The dry polymer was then sieved. Particle sizes of between 80 μ m and 120 μ m in diameter were selected. Lastly, the template was easily eliminated by packing the MIP in a flow cell and washing with a continuous flow of acetone for 5 min.

Non-imprinted polymer (NIP) for use as control was also prepared and treated in exactly the same way, except that no template molecule was used during the polymerization stage.

2.4. Instrumentation

A Varian Cary-Eclipse fluorescence spectrofluorimeter (Varian Iberica, Madrid, Spain) was used to obtain the fluorescence spectrum and the relative fluorescence intensity measurements. The spectrofluorimeter was equipped with a Xenon discharge lamp (peak power = 75 kW), Czerny-Turner monochromators, a R-928 photomultiplier tube, which is red sensitive even at 900 nm, with manual or automatic voltage control, using the Cary Eclipse software for Windows 95/98/NT system.

pH measurements were made with a MicropH 2002 meter (Crison, Barcelona, Spain) and IR spectra recorded in a Satellite Mattson FTIR spectrometer.

Table 2
Composition of the MIPs and response recorded.

Name	Template NAPH (mg)	Monomers		Cross-linker (phloroglucinol) (mg)	Solvent THF (mL)	Response recorded (a.u.)
		MDI (mg)	Bisphenol A (mg)			
MIP0	30	236.8	191	50	5	124 ± 4.67
MIP1	30	236.8	191	50	2.5	50 ± 3.02
MIP2	30	236.8	191	50	7.5	60 ± 5.22
MIP3	30	236.8	191	50	10	47 ± 4.86
MIP4	25	236.8	150	30	5	77 ± 5.72
MIP5	35	236.8	191	30	5	82 ± 4.86

Table 3
Binding selectivity of the MIP0.

Compound	Code	$\lambda_{exc/em}$ (nm)	R_{MIP} (%)	R_{NIP} (%)	β
1-NA	1	309/445	75.0	17.0	4.41
2-NA	2	333/410	62.2	20.1	3.09
1-Naphthol	3	308/465	43.8	12.3	3.56
2-Naphthol	4	327/355	55	16.7	3.29
Naphthalene	5	280/335	62	60.0	1.03
2-Naphthylacetic acid	6	275/355	39.4	81.7	0.48
1-Naphthoxyacetic acid	7	290/340	34.4	57.3	0.60
Fuberidazole	8	320/342	48.5	69.4	0.70
Naptalam	9	330/360	9.9	45.0	0.22
Napropamide	10	315/340	20.4	66.0	0.31
Carbaryl	11	275/335	34.7	76.4	0.45
α -Naphthaleneacetamide	12	305/350	30.8	79.1	0.39
1-Naphthalenemethylamine	13	290/360	42.5	72.1	0.59
Carbazole	14	290/360	29.4	48.6	0.60
Thiabendazole	15	280/380	1	1.9	0.53

2.5. Batch analysis system

Cleaned MIP (2 mg) was added to 5 mL of an individual MA-NCs solution (MA-NCs contents between $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ and $10 \mu\text{g mL}^{-1}$) and the mixture was stirred for 24 h in the dark at room temperature. It was then centrifuged and the MA-NC content remaining in the supernatant was determined by fluorescence at the maximum excitation and emission wavelengths of each compound (Table 3). The quantity of adsorbed MA-NCs was calculated by subtracting the free concentration after equilibrium from the total. A conventional quartz cell (Hellma, model 101-QS, Mullheim, Germany) of 10 mm light path was used for the batch fluorescence measurements in solution.

2.6. Flow-through system

The optosensing manifold used for the luminescence measurements was similar to others previously described by our research group (Fernández-Sánchez et al., 2004; Casado Terrones et al., 2005). The polymer particles were packed in a conventional luminescence flow-through quartz cell (Hellma, model 176.052-QS) of 1.5 mm light path. A small piece of nylon net was placed at the bottom of the cell to prevent particle displacement by the flow stream. This sensing flow cell was put into the sample holder of the spectrometer and a peristaltic pump (model Minipuls 2, Scharlab, Barcelona, Spain) was used to provide the flow rate. MA-NCs solutions (2 mL), or acetone (250 μL) as MIP regenerator, were injected into the carrier flow by means of two conventional six-way injection valves.

3. Results and discussion

3.1. Imprinting mechanism

The adsorption of organic compounds in general, and aromatic compounds in particular, involves a complex interplay of electrostatic and dispersive interactions. According to Dikert et al., the

adsorption of aromatic compounds on polyurethane polymer is based on π - π dispersion interactions between the aromatic-ring electrons of aromatic compounds and certain polymer components. It indicates that the pore size of a polymer is specifically adapted to the size of the compounds even if no covalent bonding between template and monomer is used. Even weak interactions such as Van der Waals forces or π - π interactions are sufficient to induce specific orientations of the reacting compounds during polymerization, thus enabling the design of sterically adapted cavities suitable for reversible inclusion of the analytes (Dickert et al., 1998).

We chose naphthalene as template for two reasons: firstly, the experimental critical volume (V_c) ($413 \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1}$) (Wohlfarth, 1995; Xu et al., 1997) is close to the theoretical estimation ($410 \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1}$) obtained using CS Chem Prop. (ChemDraw Ultra 7.0), which is similar to V_c calculated for 1-NA and 2-NA. Fig. 1 shows the three-dimensional structures (Chem3DPro 7.0) and theoretical V_c 's obtained of the target analytes, template and some of the interferences used. MA-NCs show similar V_c 's to that of naphthalene in

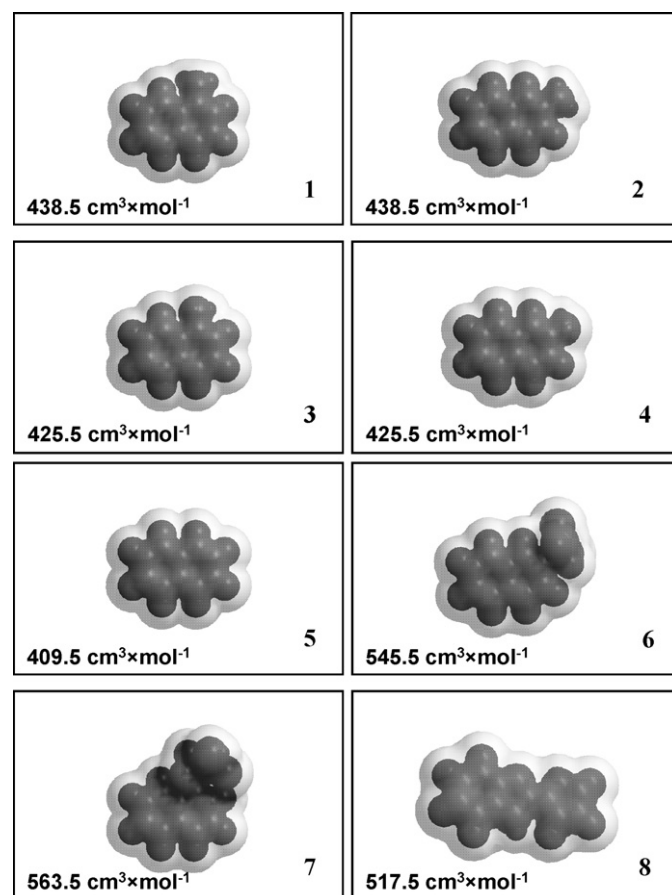


Fig. 1. Three-dimensional chemical structures and theoretical V_c 's of: 1-NA (1), 2-NA (2), 1-naphthol (3), 2-naphthol (4), naphthalene (5), 2-naphthylacetic acid (6), 1-naphthoxyacetic acid (7) and fuberidazole (8).

that the V_c 's of 1-NA and 2-NA are only 6% higher than the V_c of naphthalene. Other aromatic compounds tested with one or three rings and different functional groups show V_c values different from that of naphthalene (Fig. 1); secondly, we wanted to develop a non-covalent molecular imprinting process so that the template would not react with any component of the cocktail (monomers or cross-linker). Therefore, compounds without potentially reactive groups had to be used.

3.2. Optimization of the MIP composition

Different MIP-based sensing materials were prepared by varying the quantity of template (imprinting molecule), functional monomers, cross-linker and solvent. The template (naphthalene) was always added in quantities of less than 5% of the total mass of monomers, since previous works have reported that higher concentrations lead to a decrease in the efficiency of the imprinting process (Dickert et al., 1999). The synthesized polymers were ground, sieved and packed in a conventional luminescence flow-through quartz cell placed inside the sample holder of a spectrofluorimeter coupled to a conventional FIA system. They were then tested by injecting naphthalene solutions (500 ng mL^{-1}) and evaluating the response.

The composition of the MIPs and the responses recorded are set out in Table 2, where it can be seen that the best results were obtained for MIP0 and that the amount of porogen and template are parameters to bear in mind in the preparation of the best MIP for NCs.

The optimum quantity of porogen proved to be 5 mL; higher and lower volumes (keeping the other compounds constant) decreased the analytical response considerably (compare MIP0 with MIP1, MIP2 and MIP3). This might be due, firstly to the fact that lower volumes than the optimum decrease the porosity of the polymer and hinder the incorporation of the analyte into the specific cavities and, secondly that higher volumes result in a highly porous material, the retention capacity of which decreases in the same measure. The optimum quantity of template was estimated to be 30 mg; higher and lower quantities gave lower analytical responses (compare MIP0 with MIP4 and MIP5). The use of lower quantities of template may produce less specific cavities whilst an increase in the quantity could provide larger sizes and therefore less specific cavities.

3.3. Spectrofluorimetric characteristic of 1-NA and 2-NA in solution and solid-phase

In solution, naphthalene emits fluorescence at 332 nm when it is excited at 286 nm and 1-NA and 2-NA show maximum excitation and emission wavelengths at 309/445 nm and 333/410 nm, respectively. When they are immobilized within MIP, the maximum excitation and emission wavelengths are: naphthalene 287/332 nm, 1-NA 333/421 nm and 2-NA 347/411 nm. Therefore, the maximum excitation and emission wavelengths on a solid phase are very similar to those in solution, as is described elsewhere in the literature. Furthermore, there are no significant differences between the spectra obtained on a solid surface and those obtained in solution, so it would seem that the interaction between NCs and MIP0 works through weak interaction and not via covalent bonds. This hypothesis will be corroborated in Section 3.4 by IR spectroscopy.

The fluorescence excitation and emission spectra of MA-NCs incorporated into MIP0 are shown in electronic supporting information (see Fig. S1 of ESI).

3.4. Binding properties of the imprinted polymer

The binding properties of the selected MIP were calculated by using adsorption isotherms. These show the relationship between

the equilibrium concentration of bound and free guest over a certain concentration range. They could be easily generated from equilibrium batch rebinding studies. For the heterogeneous population of binding sites, as frequently observed for molecularly imprinted polymers, the analysis can be made using the Langmuir–Freundlich ($L-F$) isotherm (Stanley et al., 2003; Bastide et al., 2005), which is a function that describes the relationship between the equilibrium adsorption capacity (Q) and the equilibrium template concentration in solution (F) for heterogeneous matrices according to Eq. (1):

$$Q = \frac{Q_{\max} a F^m}{1 + a F^m} \quad (1)$$

where Q_{\max} is the maximum equilibrium adsorption capacity, a is related to the median binding affinity (K_0) via $K_0 = a^{1/m}$, and m is the heterogeneity index, which varies from 0 to 1 (for a homogeneous material $m = 1$ and when $m < 1$ the material is heterogeneous).

The experimental adsorption isotherms were fitted to determine the heterogeneity of MIP0 at five concentrations of 1-NA and 2-NA ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$, $4 \mu\text{g mL}^{-1}$, $7 \mu\text{g mL}^{-1}$, $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ and $20 \mu\text{g mL}^{-1}$).

Experimental results can be consulted in ESI (Table S2 and Fig. S2 in ESI). The results show that the experimental values are well represented by the $L-F$. They indicate, on the one hand, that MIP0 has a higher population of binding sites than NIP0 ($m_{\text{MIP0}} \approx 1$) and, on the other, that the affinity of the analyte to the MIP0 is higher than to the NIP0 (a_{MIP0} is higher than a_{NIP0} in all the cases).

We suggest that MIP0 adsorbs both compounds by two interactions: the generation of hydrogen bonds between the $-\text{NH}_2$ groups in naphthylamines and the carbonyl groups of the urethane and $\pi-\pi$ dispersion interactions between the aromatic ring of naphthylamines and the aromatic rings of the adsorbent. In addition, we believe that the electron-donor effect of the amine groups of the naphthylamines provides a higher electron density in their aromatic rings with a consequent enhancement of the $\pi-\pi$ dispersion interactions. Moreover, MIP0 has specific holes for molecules with shapes similar to naphthalene, resulting in a material which has a very high adsorption capacity for 1-NA and 2-NA.

To be sure that the adsorption capacity of MIP0 for MA-NCs is due to the specific holes generated within the polymeric net and not to some chemical interaction between the MA-CNs and partially reacted monomers, mainly MDI, several IR-spectroscopy experiments were made at room temperature.

10 mg of MIP0 were exposed to both 10 mL of pure water and 10 mg L^{-1} 2-NA of aqueous solution for 24 h before being cleaned with acetone and dried and their IR spectra measured in KBr. In both cases a band at 2273 cm^{-1} , which is representative of the isocyanate group, was obtained (Fig. S3 in ESI for both IR spectra). This means that MIP0 contains partially reacted MDI but does not react with 2-NA even after 24 h. In addition, both IR spectra match perfectly and thus it is possible to conclude that no chemical interactions occur, corroborating the spectrofluorimetric results.

In summary, the affinity of the analytes to MIP0 was higher than it was to NIP0 due to holes generated within the polymeric net and not to chemical interaction between the analyte and partially reacted monomers.

3.5. Binding cross-reactivity by batch analysis

To study the selectivity of MIP0, fluorescence-detection-based binding assays were also carried out by measuring the native fluorescence emission of each compound. Naphthalene and other naphthalene compounds were chosen for this study as being representative of potential interferences because the main contribution to selectivity seems to be related to steric effects,

The binding of MA-NCs and the other molecules was studied and compared using batch binding analysis. The selectivity of the

polymer was estimated by the partition coefficient β , $\beta = R_{MIP}/R_{NIP}$, where R_{MIP} is the MA-NC or interferent (%) adsorbed by 2 mg MIP and R_{NIP} is the MA-NC or interferent (%) adsorbed by 2 mg NIP over 48 h. $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ solutions of compounds in deionized water were used. The concentrations of these eluates were calculated via fluorescence calibration graphs obtained previously using pure-compound solutions prepared as detailed in the experimental section and the native fluorescence characteristics of each evaluated compound (see Table 3). Fig. S4 of ESI shows a representation of these experimental data.

A significant unspecific adsorption of the different MA-NCs and interferents took place onto NIP0, is also likely to have occurred onto MIP. Although a significant degree of analyte adsorption took place (probably due to the generation of unspecific cavities during the polymerization process), selective recognition of the cavities in the MIP also occurred to a certain extent. As expected, naptalam, napropamide, fuberidazole, 1-naphthylacetic acid and the other molecules were unable to fit into the smaller sites created by naphthalene imprinting, which provided β values smaller than 1.

The better adsorption of 1-NA and 2-NA (1–2), even better than the naphthalene template (5), might be put down to two synergic interactions, as was commented upon above. The generation of hydrogen-bonds between the $-\text{NH}_2$ groups in naphthylamines and the carbonyl groups of the urethane increases the proximity between MA-NCs and the MIPs and therefore increases the strength of the π - π dispersion interactions. Fig. S5 of ESI shows a simulation of both effects. It is worth mentioning that the interferents 1-naphthol and 2-naphthol show a high adsorption to the extent of being the most important interferents tested. They are able to fit into the cavities created by naphthalene imprinting according to their V_c (Fig. 1) and also have $-\text{OH}$ groups that can generate hydrogen-bonds in the same way as $-\text{NH}_2$ groups. For this reason they will be treated as the most relevant potential interferents.

3.6. Optimization of an optosensor for controlling monoamine naphthalenes

The instrumental parameters (detector voltage and excitation and emission slit widths), the flow injection variables (flow rate and injection volume) and the chemical variables (the presence of organic solvent, pH, kind and concentration of buffer solution) were optimized following similar procedures to those described by Sánchez Barragán et al. (2005).

The detector voltage affects both the analytical value of the signal and its repeatability. The optimum voltage was 850 V giving the best signal with lowest noise.

The excitation slit influences the amount of light that reaches the sample, and therefore the light it emits. The opening of the emission slit influences the amount of light that reaches the detector. Thus, the excitation and emission slits were both set at 5 nm.

Analyte retention is influenced by the flow-rate from 0.5 mL min^{-1} to 2 mL min^{-1} . An increase of flow-rate causes a significant decrease in the fluorescence signal and a concomitant decrease in sensor response time. Thus we chose an optimum value of 1 mL min^{-1} for the rest of the experimental work.

The volume of sample injected exercises a considerable effect upon the fluorescence emission signals. Thus, an increase in injection volume increases both the fluorescence signal (resulting in a plateau when it is greater than 3 mL) and the response time. In order to reduce the response time whilst maintaining a satisfactory signal we chose 2 mL as optimum injection volume.

The addition of organic solvents to the sample is an important experimental variable because it helps to dissolve the analyte and avoids any retention of the analyte in the flow system, guaranteeing that all the injected analyte reaches the MIP. Moreover,

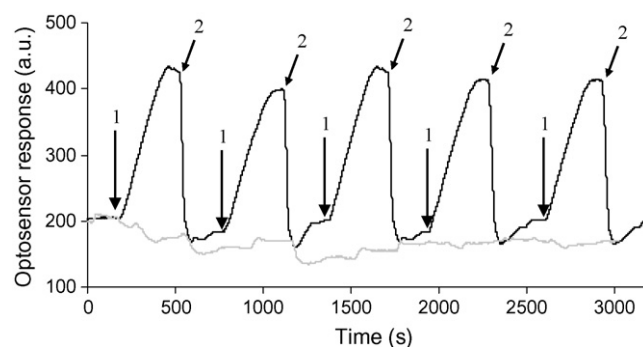


Fig. 2. Response of the optosensor to five consecutive injections of 100 mg mL^{-1} of 1-NA when MIP0 (black line) and NIP0 (grey line) were used as sensing materials. The injections of 1-NA (1) and regenerative solution (2) were injected into MIP0 and NIP0 at the same time.

in the development of optosensors, the carrier and the samples must be as close to identical as possible and so we studied organic solvents miscible with water (ethanol, methanol, acetonitrile, acetone, dimethylformamide and 1, 4-dioxane). In general, the addition of organic solvents to the samples affects their excitation and emission wavelengths, but in our case the analyte was retained upon the solid MIP surface and the organic solvent passed through the flow cell. Therefore, the presence of organic solvents in the samples did not significantly affect their maximum excitation and emission wavelengths. The organic solvent affects the emission fluorescence intensity; an increase of solvent decreases the signal fluorescence considerably because it decreases the strength of the hydrophobic interaction and the analyte is eluted from MIP0. Therefore, no solvent was added to the sample.

The influence of the pH of the carrier solution was investigated by adjusting the solutions with NaOH or HCl solutions in the range of 2–13. The best results were obtained at pH 5 and 9. Four buffer solutions at pH 5 (succinic/succinate, citric/citrate, acetic/acetate and phthalic/phthalate) and two buffers at pH 9 (boric/borate and carbonate/bicarbonate) were tested, all of them at a concentration equal to 10 mM. 500 ng mL^{-1} of 1-NA and 2-NA were injected into the carrier stream and MIP0 and NIP0 were evaluated. The best results were obtained using boric/borate buffer because it produced the highest MIP0/NIP0 ratio (see Fig. S6 in ESI).

To study the ionic force of the media we tested the concentration of the buffer in the range of 0–30 mM with 500 ng mL^{-1} of 1-NA and 2-NA. The optimum buffer concentration was 30 mM. ESI (Fig. S7) shows the results obtained in this optimization study.

Fig. 2 shows the optimum diagrams when 100 ng mL^{-1} of 1-NA was injected into the flow system using MIP0 and NIP0 as sensing materials. It also shows the regeneration with acetone and, in addition, the reproducibility of the sensing scheme.

MIP0 provides a higher response than NIP0. In addition, the signal is reproducible and completely reversible.

3.7. Analytical features of the flow-through sensor

The analytical performance characteristics of 1-NA and 2-NA were evaluated. Standard calibration graphs, prepared according to the recommended procedure, were obtained for the compounds separately. The samples were prepared by adding the corresponding quantity of MA-NC and 30 mM boric acid buffer solution at pH 9. As can be seen in Table 4, a wide linear range was obtained for all the compounds in question. Standard errors and correlation coefficients were also evaluated, thus obtaining good calibration linearity. The detection limit and quantification limit were determined using the method proposed by IUPAC.

Table 4
Optima conditions and analytical parameters of the proposed optosensor for individual and simultaneous determination of 1-NA and 2-NA.

	1-NA	2-NA	1-NA+2-NA
$\lambda_{exc/em}$ (nm)	333/421	347/411	342/415
Detector voltage (V)	850	850	850
Slits (excitation/emission) (nm)	5/5	5/5	5/5
Boric/borate (mM)	30	30	30
Flow-rate (mL min ⁻¹)	1	1	1
Volume injection (mL)	2	2	2
Slope (mg mL ⁻¹)	0.413	0.176	0.275
Intercept	39.492	19.262	0.174
<i>r</i>	0.999	0.998	0.999
Linear range (ng mL ⁻¹)	26–500	50–500	45–1000
Limit of detection (ng mL ⁻¹)	26	50	45
Limit of quantification (ng mL ⁻¹)	87	160	150

3.8. Simultaneous determination of 1-naphthylamine and 2-naphthylamine

For the simultaneous determination of 1-NA and 2-NA an isosbestic point was selected. The working wavelengths were $\lambda_{exc/em} = 342/415$ nm (Fig. S8 of ESI).

To be able to establish a calibration function related to the total concentration of the mixture the signals of 1-NA and 2-NA have to be additive. Thus, we made a series of experiments to demonstrate the additivity of the signals by comparing the optosensor response for two samples of 1-NA and 2-NA containing a total quantity of 300 ng mL⁻¹. Fig. 3 shows that the signals are indeed additive so $\lambda_{exc/em} = 342/415$ nm may be used for the simultaneous determination of 1-NA and 2-NA.

The analytical performance characteristics of the proposed method for simultaneous determination were evaluated. A standard calibration graph was prepared according to recommended procedure (Fig. S9 in ESI shows the calibration curve). The wide linear range, small standard errors and correlation coefficient indicated excellent calibration linearity. The detection and quantification limits were calculated according to IUPAC. Three replicates for mixtures of 1-NA and 2-NA of 100 ng mL⁻¹, 200 ng mL⁻¹, 300 ng mL⁻¹, 500 ng mL⁻¹ and 1000 ng mL⁻¹ with 30 mM boric-acid buffer solution at pH 9 were used to set up the calibration (the MA-NCs ratio was 1:1 in all cases). All the features of the proposed method are summarized in Table 4.

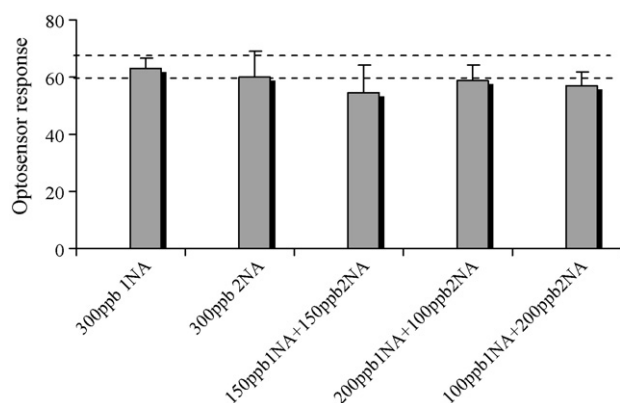


Fig. 3. Signal additivity study; $\lambda_{exc/em} = 342/415$ nm, flow-rate = 1 mL min⁻¹, volume injection = 2 mL, concentration of MA-NCs = 300 ng mL⁻¹, slits_{exc/em} 5/5 nm and detector voltage = 850 V.

Table 5
Recovery study of spiked analytes in water samples.

	Added value ^a (ng mL ⁻¹)	Found value (ng mL ⁻¹)	Recovery percentage (%) (RSD %)
Tap 1	200	182.8	91.4 (1.6)
Tap 2	200	191.4	95.7 (0.8)
Tap 3	500	437.6	87.5 (2.1)
Tap 4	500	431.9	86.4 (2.7)
Mineral 1	200	224.5	112.3 (2.3)
Mineral 2	200	226	113 (2.7)
Mineral 3	500	417	83.4 (3.2)
Mineral 4	500	440.5	88.1 (2.8)

^a Taps 1 and 2 and minerals 1 and 2 were spiked with 1-NA and 2-NA in 1:1 ratio, while taps 3 and 4 and minerals 3 and 4 were spiked with 1-NA and 2-NA in a 3:2 ratio.

3.9. Interference study

To gauge the selectivity of the proposed method we studied the presence of other naphthalene compounds (naphthalene, α -naphthaleneacetamide, carbaryl, 1-naphthalenemethylamine, napropamide, 1-naphthylacetic acid and 2-naphthylacetic acid). We made a systematic study into the effects of other naphthalene compounds upon the determination of a sample mixture of 1-NA and 2-NA at 300 μ g mL⁻¹ totals (1:1 ratio). Various samples of potential interferents were tested at increasing concentrations so as to evaluate which concentration of interferent made a signal equal to or higher than 10% of the response provided by the solution of MA-NCs. This concentration is known as the “minimum interferent concentration”.

Only one of the interferents, 1-naphthalenemethylamine, interacted with MIP and thus can be considered as a potential interferent since it showed the lowest “minimum interferent concentration”. For the rest of the tested molecules this minimum concentration was reached at much higher levels than are usually found in drinking water (see Table S3 in ESI for further information). It is important to point out that 1-naphthol and 2-naphthol do not interfere. Although these molecules showed a high degree of adsorption, as we could see in the binding cross-reactivity study, they were undetectable at the working wavelengths.

3.10. Analytical application of the optosensor

To test the predictive ability of our optosensor, samples of tap water from the city of Granada and commercially available mineral water were spiked with different levels of both 1-NA and 2-NA. The waters had been subject to no previous treatment. The experimental results are shown in Table 5, where it can be seen that recovery percentages varied between 86.4 and 95.7% for tap water samples and 83.4 and 113% for mineral water, with very low relative standard deviation (for seven replicates) never higher than 3.2%.

4. Conclusions

We present the first MIP fluorimetric sensor described for the simultaneous determination of 1-NA and 2-NA at ng mL⁻¹ level with a response time of 120 s.

The system is based on the measurement of the MA-NCs native fluorescence signals when they are adsorbed on-line on the novel MIP designed, thus rendering the use of derivatives unnecessary. The procedure shows very good analytical features and its applicability to the analysis of these two analytes in real samples have been proven, offering important advantages due to its sensitivity and selectivity, precision, simplicity, speed and low cost, shortening analysis time considerably and reducing costs for environmental controls. For these reasons, it would be a powerful tool in routine labs. It also contributes to increasing the scarce number of

spectroscopy flow-through sensors described to date for analyzing water contaminants based on molecular imprinting.

Finally, the MIP was characterized by batch analysis, flow injection analysis and FTIR. All of these studies could help other researchers to use this MIP in fields other than optical sensing, such as chromatography and solid phase extraction.

Acknowledgments

The authors thank the Spanish Ministry of Education (Contract Juan de la Cierva, FPU grant reference AP2006-01147 and Project CTQ2007-60079), the Regional Government of Andalucía (Excellence projects RNM-666 and P07-FQM-02625) and the Andalusian Water Agency (agreement 2243) for their financial support. They also thank Julia Morales Sanfrutos from the Department of Organic Chemistry of the University of Granada for the FTIR experiments with MIP0 and their colleague A.L. Tate for revising their English text.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.bios.2008.11.022.

References

- Adhikari, B., Majumdar, S., 2004. *Prog. Polym. Sci.* 29, 699–766.
- Bastide, J., Cambon, J.P., Breton, F., Piletsky, S.A., Rouillon, R., 2005. *Anal. Chim. Acta* 542, 97–103.
- Black, R.M., Clarke, R.J., Read, R.W., Reid, M.T.J., 1994. *J. Chromatogr. A* 662, 301–321.
- Blanco López, M.C., Gutiérrez Fernández, S., Lobo Castañón, M.J., Miranda Ordieres, A.J., Tuñón Blanco, P., 2004. *Anal. Bioanal. Chem.* 378, 1922–1928.
- Breton, F., Euzet, P., Piletsky, S.A., Giardi, M.T., Rouillon, R., 2006. *Anal. Chim. Acta* 569, 50–57.
- Casado Terrones, S., Fernández Sánchez, J.F., Cañabate Díaz, B., Segura Carretero, A., Fernández Gutiérrez, A., 2005. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 38, 785–789.
- D'Agostino, G., Alberti, G., Biesuz, R., Pesavento, M., 2006. *Biosens. Bioelectron.* 22, 145–152.
- Dickert, F.L., Besenbock, H., Tortschanoff, M., 1998. *Adv. Mater.* 10, 149–.
- Dickert, F.L., Lieberzeit, P., Miarecka, S.G., Mann, K.J., Hayden, O., Palfinger, C., 2004. *Biosens. Bioelectron.* 20, 1040–1044.
- Dickert, F.L., Tortschanoff, M., Bulst, W.E., Fischerauer, G., 1999. *Anal. Chem.* 71, 4559–4563.
- Ebarvia, B.S., Sevilla, F., 2005. *Sens. Actuators B* 107, 782–790.
- Fernández-Sánchez, J.F., Segura Carretero, A., Cruces Blanco, C., Fernández Gutiérrez, A., 2003. *Talanta* 60, 287–293.
- Fernández-Sánchez, J.F., Segura Carretero, A., Cruces-Blanco, C., Fernández-Gutiérrez, A., 2004. *Anal. Chim. Acta* 506, 1–7.
- Ghassempou, A., Arshadi, M.R., Asghari, F.S., 2001. *Fresen. J. Anal. Chem.* 369, 176–183.
- Greene, N.T., Shimizu, K.D., 2005. *J. Am. Chem. Soc.* 127, 5695–5700.
- Guzmán-Mara, J.L., López Martínez, L., López de Alba, P.L., Castrejón Durán, J.E., Cerdá Martín, V., 2006. *Anal. Chim. Acta* 573–574, 406–412.
- Haupt, K., Mosbach, K., 2000. *Chem. Rev.* 100, 2495–2504.
- Haupt, K., 2001. *Analyst* 126, 747–756.
- Holthoff, E.L., Bright, F.V., 2007. *Anal. Chim. Acta* 594, 147–161.
- Huang, C.Y., Syu, H.J., Chang, Y.S., Chuan, T., Liu, B.D., 2007. *Biosens. Bioelectron.* 22, 1694–1699.
- Jenkins, A.L., Bae, S.Y., 2005. *Anal. Chim. Acta* 542, 32–37.
- Lakshmi, D., Prasad, B., Sharma, P.S.S., 2006. *Talanta* 70, 272–280.
- Lee, K.C., Ku, Y., 1996. *Sep. Sci. Technol.* 31, 2557–2577.
- Lehotay, J., Halmo, F., Oktavec, D., 1999. *Chem. Listy* 93, 138–141.
- Li, A.M., Zhang, Q.X., Chen, J.L., Fei, Z.G., Chao, L., Li, W.X., 2001. *React. Funct. Polym.* 49, 225–233.
- Liu, F.Q., Chen, J.L., Li, A.M., Fei, Z.H., Zhu, Z.L., Zhang, Q.X., 2003. *Chin. J. Polym. Sci.* 21, 317–324.
- Matsuguchi, M., Uno, T., 2006. *Sens. Actuators B* 113, 94–99.
- Merkoci, A., Alegret, S., 2002. *TrAC Trends Anal. Chem.* 21, 717–725.
- Ng, S.M., Narayanaswamy, R., 2006. *Anal. Bioanal. Chem.* 386, 1235–1244.
- Paniagua Gonzalez, G., Fernandez Hernando, P., Durand Alegria, J.S., 2008. *Biosens. Bioelectron.* 23, 1754–1758.
- Salinas Castillo, A., Sánchez Barragán, I., Costa Fernández, J.M., Pereiro, R., Ballesteros, A., González, J.M., Segura Carretero, A., Fernández Gutiérrez, A., Sanz-Medel, A., 2005. *Chem. Commun.* 25, 3224–3226.
- Sánchez Barragán, I., Costa Fernández, J.M., Pereiro, R., Sanz Medel, A., Salinas, A., Segura, A., Fernández Gutiérrez, A., Ballesteros, A., González, J.M., 2005. *Anal. Chim. Acta* 569, 7005–7011.
- Stabbert, R., Schäfer, K.H., Biefel, C., Rustemeier, K., 2003. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 17, 2125–2132.
- Stanley, B.J., Szabelski, P., Chen, Y.B., Ellergren, B., Guiochon, G., 2003. *Langmuir* 19, 772–778.
- Suárez Rodríguez, J.L., Díaz García, M.E., 2001. *Biosens. Bioelectron.* 16, 955–961.
- Suedee, R., Intakong, W., Dickert, F.L., 2006. *Anal. Chim. Acta* 569, 66–75.
- Wohlfarth, C., 1995. In: Lide, D.R. (Ed.), *Handbook of Chemistry and Physics*, 76th ed. CRC Press, Boca Raton.
- Xia, S., Su, P., Sun, Jh., Pan, Zx., Zhang, Ms, Shi, Lm., 1995. *Fresen. J. Anal. Chem.* 351, 325–327.
- Xu, Z.Y., Zhang, Q.X., Wu, C.L., Wang, L.S., 1997. *Chemosphere* 35, 2269–2276.
- Zhu, L.Z., Chen, B.L., 2000. *Environ. Sci. Technol.* 34, 2997–3002.
- Zima, J., Dejmikova, H., Barek, J., 2007. *Electroanalysis* 19, 185–190.

Electronic Supporting Information of

**The development of a MIP-optosensor for
the detection of monoamine naphthalenes in
drinking water**

**Angel Valero-Navarro, Jorge F. Fernández-Sánchez^{*}, Antonio Segura-Carretero,
Alberto Fernández-Gutiérrez^{*}**

*Department of Analytical Chemistry, University of Granada, c/ Fuentenueva s/n, 18071
Granada, Spain. www.ugr.es/local/fqm297*

Alfonso Salinas-Castillo, Ricardo Mallavia

*Institute of Molecular and Cellular Biology, University Miguel Hernandez, Elche,
Spain.*

Index:

- Chemical structures of all the compounds used in this work (Table S1)
- Spectral characteristics of 1-NA and 2-NA retained into MIP0 (Fig. S1)
- Binding properties of MIP0 (Table S2 and Fig. S2)
- FTIR spectra of MIP0 (Fig. S3)
- Binding cross reactivity study (Fig. S4)
- Simulation of π - π interaction and hydrogen bond (Fig. S5)

- Study of pH
 - Kind of buffer solution (Fig. S6)
 - Concentration of buffer solution (Fig. S7)
- Simultaneous determination of 1-NA and 2-NA (Fig. S8)
- Calibration curve (Fig. S9)
- Selectivity study (Table S3)

Table S1

Chemical structures of the analytes, reagents and interferences used in this study

Compound	Chemical Structure	Compound	Chemical Structure
Naphthalene (NAPH)		Naptalam	
MDI		Napropamide	
Bisphenol A		Carbaryl	
Phloroglucinol		α -Naphthalene acetamide	
1-Naphthyl amine (1-NA)		1-Naphthalene methylamine	
2-Naphthyl amine (2-NA)		Carbazole	
1-Naphthol		Thiabendazole	
2-Naphthol			
2-Naphthyl acetic Acid			
1-Naphthyl acetic Acid			
Fuberidazole			

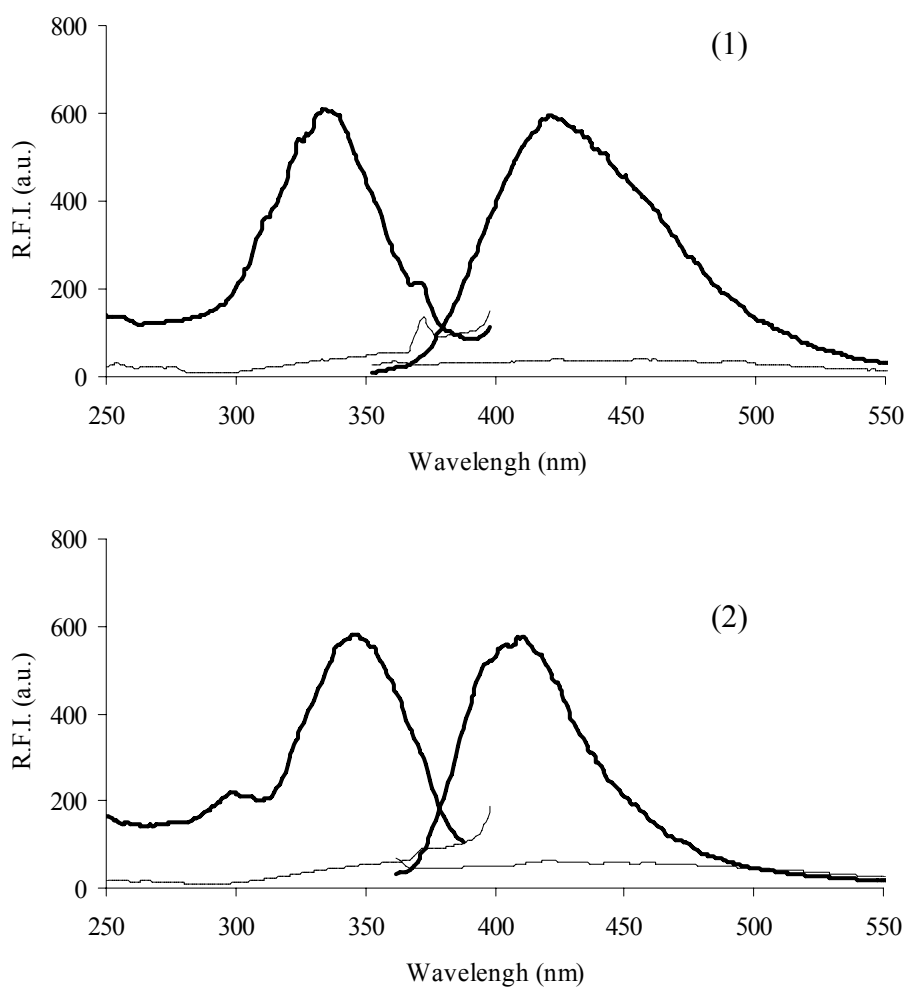


Fig. S1. RTF excitation and emission spectra of 1-NA (1) and 2-NA (2) immobilized into MIP before (thick line) and after washing (thin line) with acetone (250 μL); Concentration of MA-NCs = 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$, Slits_{exc/em} 5/5 nm, detector voltage 750 V, $\lambda_{\text{exc/em}}(1\text{-NA})=333/421$ nm and $\lambda_{\text{exc/em}}(2\text{-NA})=347/411$ nm.

Table S2

Langmuir-Freundlich fitting parameters for MIP0 and NIP0.

	Q_{max} (mg g^{-1})		a ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		m		r^2	
	MIP0	NIP0	MIP0	NIP0	MIP0	NIP0	MIP0	NIP0
1-NA	21.35	13.90	0.63	0.22	0.92	0.60	0.9972	0.9976
2-NA	28.20	2.70	0.49	0.12	0.90	0.61	0.9968	0.9999

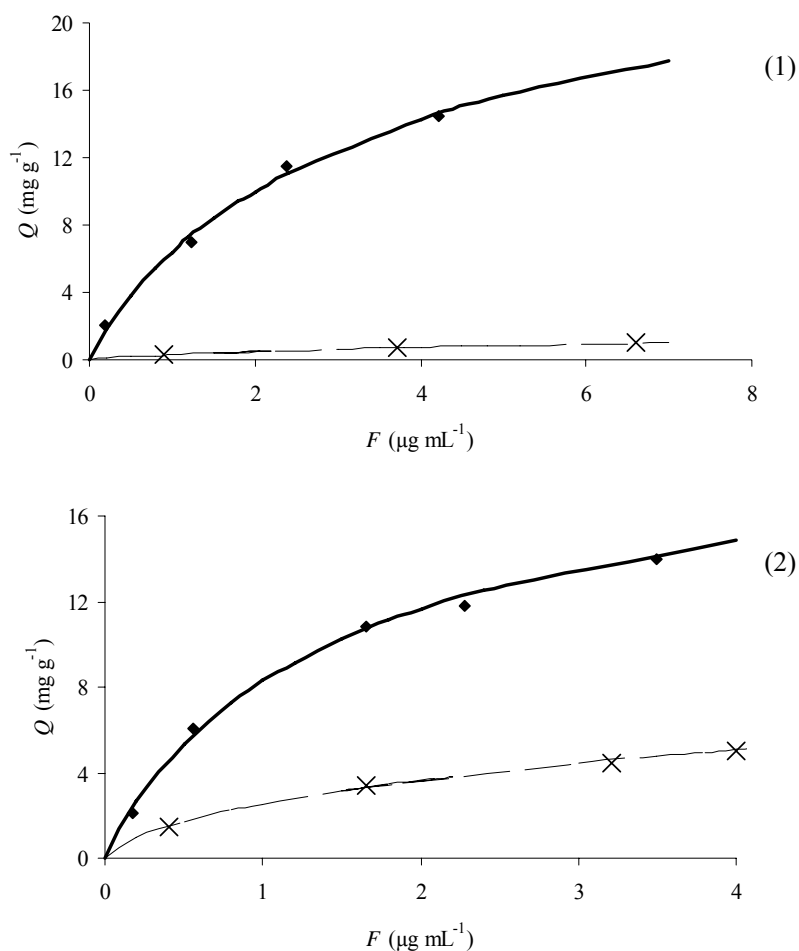


Fig. S2. 1-NA (1) and 2-NA (2) adsorption isotherms for MIP (\blacklozenge) and NIP (\times) and their corresponding experimental Langmuir-Freundlich isotherm for MIP (thick line) and NIP (thin line). Binding conditions: quantity of polymer MIP or blank polymer NIP: 2 mg, volume: 5 mL, binding time: 48 h.

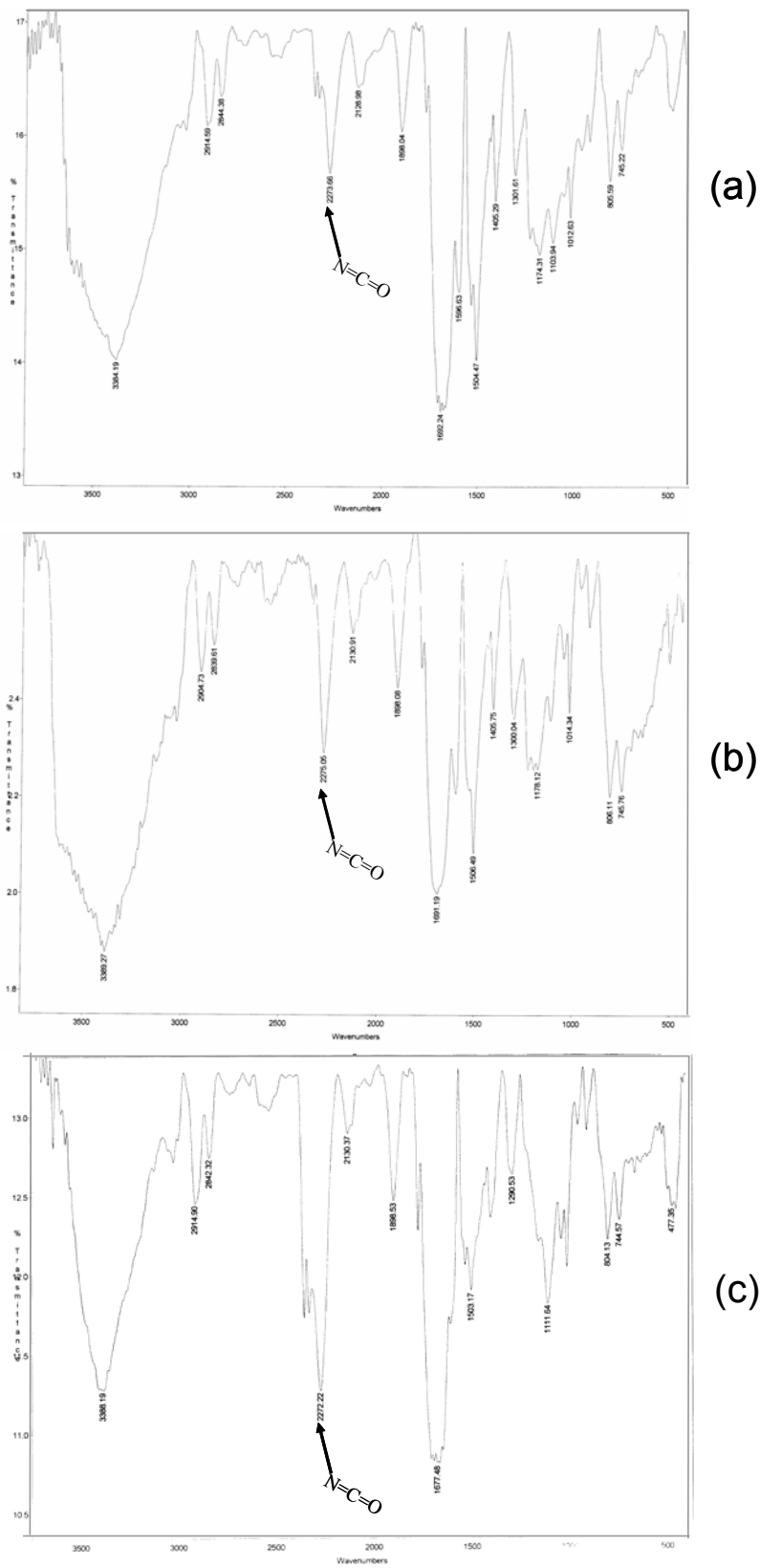


Fig. S3. FTIR spectra of MIP0 after exposure to a) pure water and b) 10 mg L⁻¹ 2-NA for 24 h at room temperature. c) the FTIR of MIP0 prior exposure.

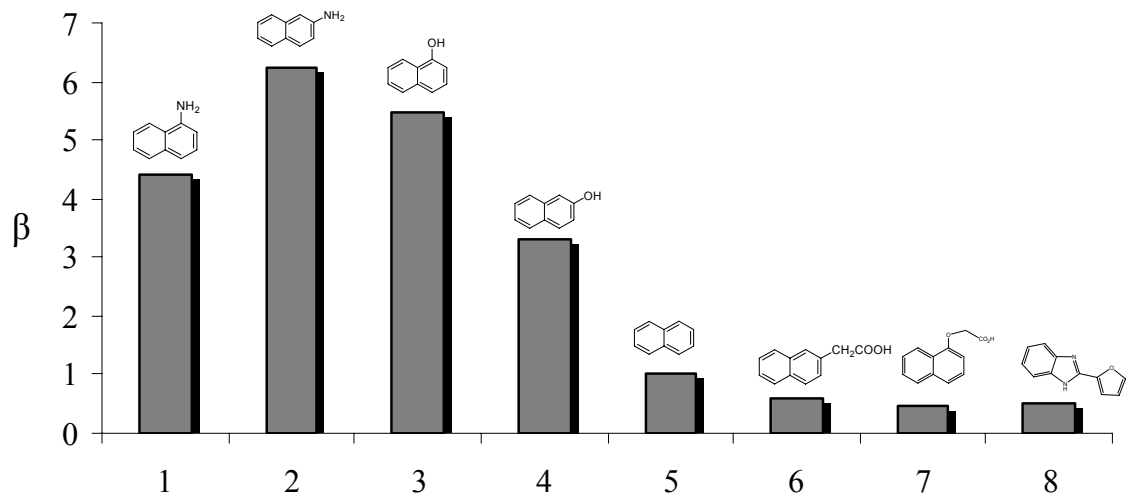


Fig. S4. Specific binding of the MA-NCs and other compounds in the MIP0 was calculated by divide the retention (%) in the MIP0 from that of the NIP0.

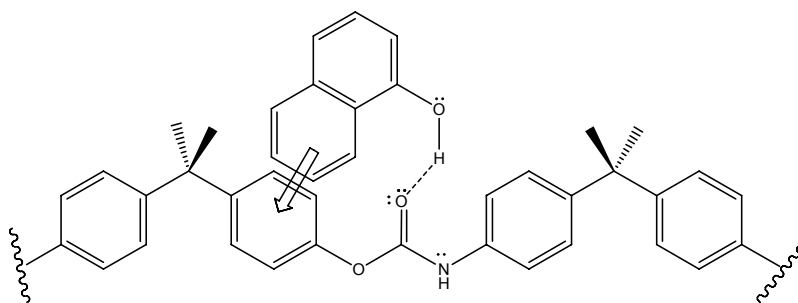


Fig. S5. Simulation of the π - π interaction (arrow) and hydrogen bond (dashed line) between 1-NA and MIP.

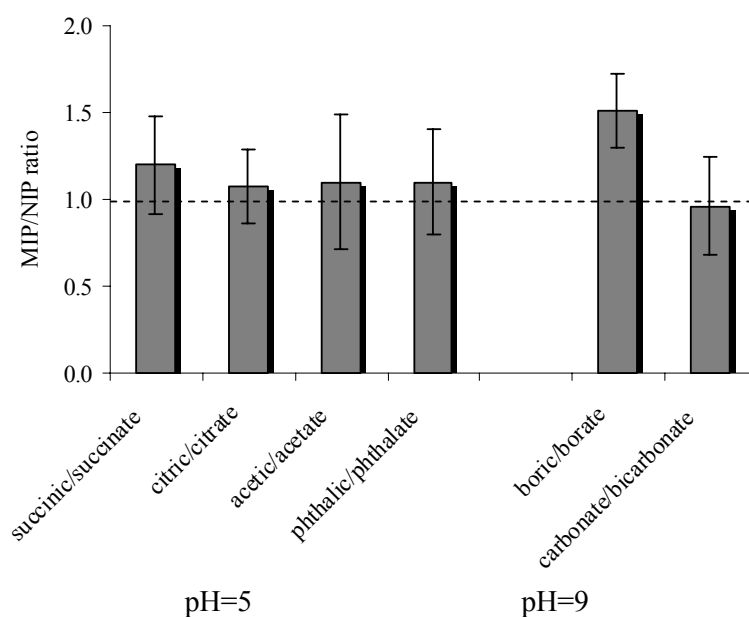


Fig. S6. Optimization of buffer solutions used on the carrier stream; 1-NA $\lambda_{\text{exc/em}} = 333/421$ nm, 2-NA $\lambda_{\text{exc/em}} = 347/411$ nm, flow-rate = 1 mL min^{-1} , volume injection = 2 mL, Concentration of MA-NCs = 500 ng mL^{-1} , slits_{exc/em} 5/5 nm and detector voltage = 850 V.

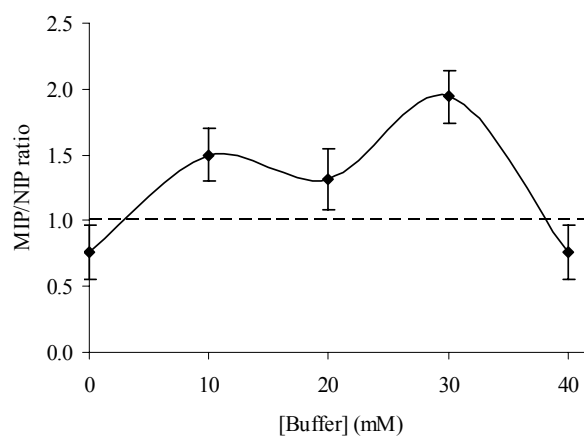


Fig. S7. Optimization of the media ionic force with boric/borate buffer solutions; 1-NA $\lambda_{\text{exc/em}} = 333/421$ nm, 2-NA $\lambda_{\text{exc/em}} = 347/411$ nm, flow-rate = 1 mL min^{-1} , volume injection = 2 mL, Concentration of MA-NCs = 500 ng mL^{-1} , slits_{exc/em} 5/5 nm and detector voltage = 850 V.

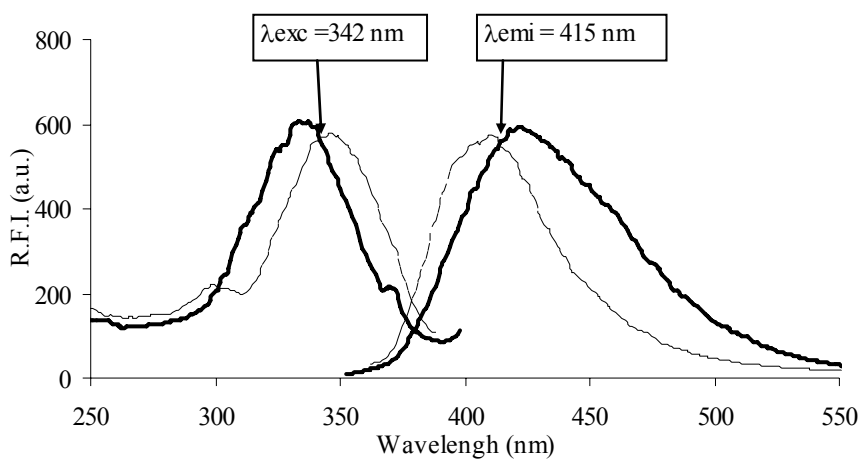


Fig. S8. Selection of the working wavelengths for simultaneous determination of 1-NA (thick line) and 1-NA (thin line). Concentration of MA-NCs = $50 \mu\text{g mL}^{-1}$, slits_{exc/em} 5/5 nm and detector voltage = 750 V.

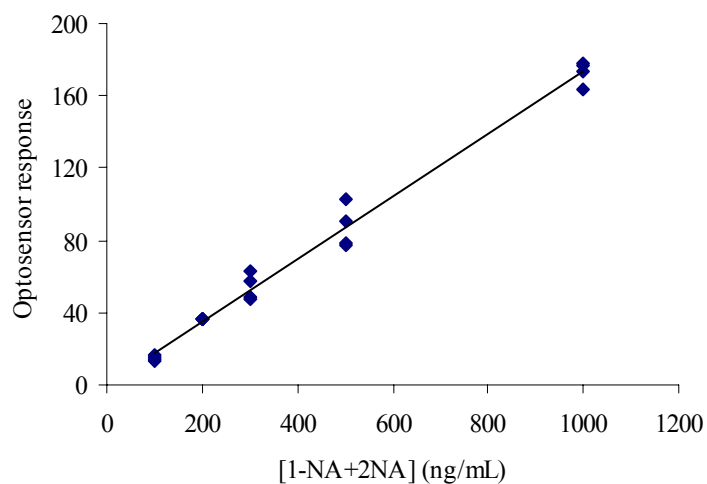


Fig. S9. Calibration curve at the isisbestic point (342/415 nm): slits_{exc/em} 5/5 nm and detector voltage = 750 V. 4 replicas were used at each concentration level.

Table S3
Selectivity study

Compound	Minimum interferent concentration (ng mL ⁻¹)
1-Naphthol	3000
2-Naphthol	2500
Naphthalene	>10000
α -Naphthaleneacetamide	>10000
Carbaryl	1200
1-Naphthalenemethylamine	300
Napropamide	1000
1-Naphthylacetic Acid	1000
2-Naphthylacetic Acid	1500



Contents lists available at ScienceDirect

Talanta

journal homepage: www.elsevier.com/locate/talanta

Chemometric-assisted MIP-optosensing system for the simultaneous determination of monoamine naphthalenes in drinking waters

Angel Valero-Navarro^a, Patricia C. Damiani^{b,*}, Jorge F. Fernández-Sánchez^a,
Antonio Segura-Carretero^a, Alberto Fernández-Gutiérrez^{a,*}

^a Department of Analytical Chemistry, University of Granada, c/Fuentenueva s/n, 18071 Granada, Spain¹

^b Department of Analytical Chemistry, Faculty of Biochemical and Pharmaceutical Sciences, National University of Rosario and Chemical Institute of Rosario (IQUIR), National Centre of Scientific and Technical Research (CONICET), Suipacha Street 570, 2000 Rosario, Santa Fe, Argentina

ARTICLE INFO

Article history:

Received 1 August 2008

Received in revised form 22 October 2008

Accepted 23 October 2008

Available online 6 November 2008

Keywords:

Molecularly imprinted polymers (MIPs)

Optosensors

Chemometric multivariate calibration

Monoamine naphthalene compounds

ABSTRACT

In the present work a chemometric-assisted molecularly imprinted polymer (MIP)-fluorescence optosensing system has been developed for determining monoamines naphthalene compounds in drinking waters. The use of chemometrics for processing flow injection analysis with MIP fluorescence optosensor data allowed the simultaneous determination of the principal monoamine naphthalene compounds 1-naphthylamine (1-NA) and 2-naphthylamine (2-NA) even in presence of potential interferent 1-naphthalenemethylamine (1-NMA). Classical chemometrics tools such as partial least-squares (PLS-1), as well as second-order algorithms like multiway PLS (N-PLS) and unfolded PLS (U-PLS), were successfully applied, assisting fluorescence emission spectra at a fixed excitation wavelength or excitation-emission fluorescence matrices (EEM), respectively, when interferents are considered in the calibration set. The combinations of both N-PLS and U-PLS with residual bilinearization (RBL), achieving the second-order advantage, were satisfactory applied for the simultaneous determination of the main monoamine naphthalene compounds in drinking water, in the presence of a potential interferent without sample pretreatment, even when the later is not modeled in calibration set. Predictive ability, accuracy, figures of merit, as well as advantages and disadvantages of the different strategies were discussed.

© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The contamination of surface and groundwater with aromatic compounds is one of the most important environmental problems of present days [1,2]. Monoamine naphthalene compounds (MANCs) such as 1-naphthylamine (1-NA) and 2-naphthylamine (2-NA) are considered priority contaminants, owing to their acute toxicity and poor biodegradation, as well as substructures of potentially carcinogenic pollutants discharged from pharmaceutical, dyestuff, photographic, agrochemical industries and cigarette smokes. On the other hand, they can also be transformed into toxic *N*-nitroso compounds through a series of reactions in the environment [3–5]. The agencies that regulate 1-naphthylamine are the Environmental Protection Agency (EPA) and the Occupational Safety and Health Administration (OSHA). OSHA regulates 1-naphthylamine as 1 of 13

carcinogens under the General Industry Standard. There is no action level for 1-naphthylamine. The regulation calls for no exposure at any level that can be detected without establishing permissible exposure limits (PELs). Epidemiological studies have shown that occupational exposure to 2-naphthylamine, either alone or present as an impurity in other compounds, causes bladder cancer. It is also considered 1 of 13 OSHA-regulated carcinogens without establishing PELs. These organizations have only established naphthalene (NAPH) allowed levels, because it is considered as a representative of this kind of contaminants and also of other few naphthalene derivatives. EPA recommends that children should not drink water containing more than 0.5 parts of naphthalene per million parts of water (ppm) for more than 10 days, or 0.4 ppm for longer than 7 years. Adults should not drink water with more than 1 ppm for more than 7 years. For water consumed over a lifetime, EPA suggests it should contain no more than 0.02 ppm of naphthalene. In conclusion, these low levels allowed for naphthalene in drinking waters can be considered as referent for levels of its derivatives. It can be noticed that these levels could be so lower (in order of parts per billion parts ppb) so only a few analytical methods can be applied for their determination, mainly based on high-performance liq-

* Corresponding authors.

E-mail addresses: patodamiani@hotmail.com, pdamiani@fbioyf.unr.edu.ar (P.C. Damiani), albertof@ugr.es (A. Fernández-Gutiérrez).

¹ <http://www.ugr.es/local/fqm297>.

uid chromatography (HPLC) with diode-array detection (DAD) and electrochemical detection (ED) and gas chromatography combined with mass spectrometric detection (GC–MS) [6,7]. These methods are expensive for routine environmental control laboratories, and often involve extensive analytical procedures and sample pretreatment.

Molecular imprinting polymer (MIP) technology is now well established for the preparation of tailor-made polymers with cavities that are able to selectively recognize a target molecule or a group of related compounds [8–10]. Advantages in chemical recognition offered by molecular imprinting technology include the ability to induce receptor sites with outstanding analyze specificity, robustness and stability [11].

In a previous work, the development of a synthetic receptor for monoamine naphthalene compounds using a non-covalent imprinting technique and naphthalene as template has been described [12]. This MIP optosensor was used as an optical flow-through sensor for quantifying these molecules by recording their room-temperature fluorescence emission. The combination of flow injection techniques with detection on an optically active surface packed in a flow-through cell (optosensor) has important advantages such as sensitivity, selectivity, simplicity and low cost for routine environmental control in comparison to commonly reported analytical methods (HPLC, GC–MS) [13].

In this previous work [12], the main monoamine naphthalene compounds (1-NA and 2-NA) were simultaneously determined applying univariate calibration to the fluorescence intensity at an isoemissive point. For this purpose, the signals of 1-NA and 2-NA are required to be absolutely additive, in order to apply a calibration function related to the total NA concentration. It may be noticed that the total content of both analytes was calculated in this case, instead of the individual content. Moreover, under these conditions 1-naphthalenemethylamine (1-NMA) was established as the main interference compound making more difficult the determination of monoamine naphthalene compounds when it is presented in the sample at concentration level equal or higher than 300 ng mL^{-1} .

In the present report, the same MIP optosensor in combination with a flow injection technique was applied to simultaneously determine 1-NA and 2-NA. Two different methodologies were employed in the absence of unexpected sample components: (1) fluorescence emission spectra at a fixed excitation wavelength were processed with the first-order multivariate calibration partial least-squares (PLS) algorithm [14], and (2) excitation-emission fluorescence matrices (EEM) were processed with second-order algorithms such as multiway PLS (N-PLS) and unfolded PLS (U-PLS) [15]. These strategies allowed the simultaneous determination of 1-NA and 2-NA in two different situations: (1) both calibration and test samples contain the analytes, and (2) both calibration and test samples contain the analytes and the interferent 1-NMA.

On the other hand, the combination of both N-PLS and U-PLS with residual bilinearization (RBL) has been applied to excitation-emission fluorescence matrices, achieving the “second-order advantage”, i.e., allowing to quantitate the analytes 1-NA and 2-NA in test samples also containing the interferent 1-NMA, using a calibration set with only binary mixtures of 1-NA and 2-NA [16,17]. It should be noticed that the classical second-order PARAFAC (parallel factor analysis) model did not produce acceptable results in the present samples because of extensive spectral overlapping among the various sample components.

The novelty of this work is the use of chemometrics for assisting a flow injection analysis with MIP fluorescence optosensor data, allowing the simultaneous determination of the principal monoamine naphthalene compound 1-NA and 2-NA, even in presence of unsuspected components which may be present in drinking water samples.

2. Experimental

2.1. Chemicals

Naphthalene, 1-naphthylamine, 2-naphthylamine and 1-naphthalenemethylamine (1-NMA) were obtained from Sigma Chemical Co. bisphenol A (2,2-bis(4-hydroxyphenyl)propane) was purchased from Aldrich (Milwaukee, WI, USA). Phloroglucinol was obtained from Fluka Chemie (Steinheim, Germany). Acetonitrile and diphenylmethan-4,4'-diisocyanate (MDI) were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Tetrahydrofuran (THF) was obtained from Panreac (Madrid, Spain). All reagents were used as received, without further purification.

Freshly prepared ultrapure deionized water (Milli-Q3 RO/MilliQ2 system, Millipore, UK) was used in all experiments.

2.2. MIPs synthesis

MIPs were prepared from bisphenol A (191 mg) and MDI (236.8 mg) as functional monomers, phloroglucinol (50 mg) as an additional cross-linker, naphthalene (30 mg) as template and THF (5 mL) as solvent [12].

The mixture was placed into a glass vial, stirred and stored uncapped in the absence of light for 4 days until complete evaporation of the organic solvent. The resulting polymer monolith was ground in an agate mortar, washed with acetonitrile, and dried at $30\text{--}35^\circ\text{C}$. The ground polymer was dry sieved. Particle sizes of diameters between 80 and $120 \mu\text{m}$ were selected. The template was eliminated easily washed by packing the MIP in a flow cell and passing acetone continuously (5 min of continuous flow).

Non-imprinted polymer (NIP) for control was also prepared and treated exactly in the same way, except that no template molecule was used during the polymerization stage.

2.3. Sample and solution preparation

Stock solutions ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$) of the individual MA-NCs and 1-naphthalenemethylamine were prepared by dissolving the appropriate amount of the solid in deionized water and stored at 4°C in the dark (for a period of up to 1 month). Intermediate stock solutions of 1-NA, 2-NA and 1-NMA were daily prepared by dilution in water of the $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ solution.

For the interference studies, solutions of the analytes were prepared by adding the appropriate amount of the interferent to the stock solution and diluting with Milli-Q water.

2.4. Flow-through system and instrumentation

Fig. 1 shows the optosensing manifold used for the luminescence measurements. The polymer particles were packed in a conventional luminescence flow-through quartz cell (Hellma, model 176.052-QS) of 1.5 mm of light path. At the bottom of the cell, a small piece of nylon net was placed to prevent particle displacements by the flow stream. This sensing flow-cell was placed inside the sample holder of the spectrometer and a peristaltic pump (model Minipuls 2, Scharlab, Barcelona, Spain) was used to establish the flow rate. MA-NCs solutions (2 mL), or acetone ($250 \mu\text{L}$) as MIP regenerator, were injected into the carrier flow by means of two conventional six-way injection valves.

Fluorescence spectral measurements were done on a fast Varian Cary-Eclipse fluorescence spectrofluorimeter (Varian Iberica, Madrid, Spain) equipped with a Xenon discharge lamp (peak power equivalent to 75 kW) and two Czerny Turner monochromators, connected to a PC (Cary Eclipse software for Windows 95/98/NT system). Excitation-emission matrices (EEM) for using second-

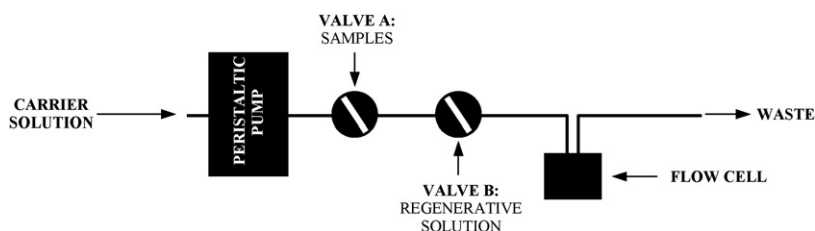


Fig. 1. Optosensing manifold for continuous MA-NCs RTF monitoring.

order data methods (N-PLS, U-PLS, PLS/RBL) were recorded in the excitation range from 300 to 350 nm each 4 nm and in the emission range from 390 to 450 nm each 2 nm, hence the size of each data matrix was $14 \times 31 = 434$ data points per sample matrix. Once EEM matrices have been obtained for each sample, vector data belonging to the first-order data type, such as emission spectra can be extracted in order to apply first-order multivariate calibration method (PLS). The selected excitation and emission wavelength ranges contain the wavelengths corresponding to the excitation and emission maxima for 1-NA and 2-NA when they are immobilized into MIP, i.e., 333/421 and 347/411 nm, respectively, and avoid the scattering signal from the polymeric matrix (Fig. 2).

The pH measurements were performed using a MicropH 2002 meter (Crison, Barcelona, Spain).

2.5. Calibration, validation and spiked drinking waters

For the simultaneous determination of 1-NA and 2-NA in the presence of 1-NMA two strategies were used. First, a calibration set of 19 samples was prepared containing 1-NA and 2-NA according to a central composite design with the central point replicated three times. The resulting concentrations, after applying the above mentioned experimental design using the program Unscrambler[®] 5.0, were in the range of 0–710 ng mL⁻¹ for both analytes (Table 1). Another calibration set of 31 samples containing 1-NA, 2-NA and 1-NMA was constructed with the same software, using a central composite design with three replicates of the central point. The resulting concentrations were in the range of 0–781 ng mL⁻¹ for all analytes (Table 2). The concentration levels were selected considering the linear fluorescence concentration ranges in both cases. Slight differences in concentration ranges for binary and ternary mixtures are the result of using designs with the same concentration values for the two-level full factorial sub-design contained in the central composite design.

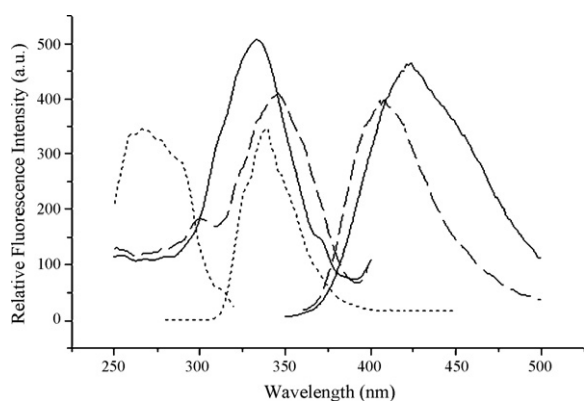


Fig. 2. Room temperature fluorescence excitation and emission spectra of 1-NA (solid line), 2-NA (dash line), and 1-NMA (dot grey line) immobilized into MIP; concentration of MA-NCs = 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$, slits_{exc/em} 5/5 nm and detector voltage 750 V.

Table 1

Central composite design for the binary calibration set.

Sample code	1-NA (ng mL ⁻¹)	2-NA (ng mL ⁻¹)
1	0	335
2	0	335
3	710	335
4	710	335
5	335	0
6	335	0
7	335	710
8	335	710
9	70	70
10	70	70
11	600	70
12	600	70
13	70	600
14	70	600
15	600	600
16	600	600
17	335	335
18	335	335
19	335	335

Table 2

Central composite design for the ternary calibration set.

Sample code	1-NA (ng mL ⁻¹)	2-NA (ng mL ⁻¹)	1-NMA (ng mL ⁻¹)
1*	0	335	335
2*	0	335	335
3*	781	335	335
4*	781	335	335
5*	335	0	335
6*	335	0	335
7*	335	781	335
8*	335	781	335
9*	335	335	0
10*	335	335	0
11*	335	335	781
12*	335	335	781
13*	70	70	70
14*	70	70	70
15*	600	70	70
16*	600	70	70
17*	70	600	70
18*	70	600	70
19*	600	600	70
20*	600	600	70
21*	70	70	600
22*	70	70	600
23*	600	70	600
24*	600	70	600
25*	70	600	600
26*	70	600	600
27*	600	600	600
28*	600	600	600
29*	335	335	335
30*	335	335	335
31*	335	335	335

Table 3
Prediction sample set of spiked tap and mineral waters.

Sample code	1-NA (ng mL ⁻¹)	2-NA (ng mL ⁻¹)	1-NMA (ng mL ⁻¹)
Tap water			
W1	100	300	360
W2	100	300	360
W3	360	300	360
W4	500	300	360
Mineral water			
W5	360	100	360
W6	360	100	360
W7	360	500	360

Two validation sets, one with binary mixtures of 1-NA and 2-NA, and an additional one with ternary mixtures of 1-NA, 2-NA and 1-NMA were designed and prepared considering the calibration ranges. A set of tap water samples from the city of Granada, and a set of mineral waters (commonly available in Spain) were spiked with 1-NA, 2-NA and 1-NMA at different levels, considering the linear fluorescence calibration range (Table 3). These samples underwent no previous treatment.

All fluorescence measurements were performed in random order as described below and analyzed using the chemometric algorithms.

2.6. Measurement procedure

The fluorescence measurements were carried out by using the flow-through system described above. The samples were injected in the flow injection system, monitoring the response at the 1-NA and 2-NA fluorescent excitation and emission wavelengths in a kinetic mode. When the system response reached maximum fluorescence intensity, the flow was stopped, and excitation-emission fluorescence matrix for the mixture was collected. The matrix data were then transferred to a microcomputer and processed by applying chemometric analysis.

3. Theory

3.1. Data orders

The various types of instrumental data have been classified on the basis on tensor algebra [18–20]. Within this scheme, when a given instrument produces a single instrumental response for a chemical sample, this datum is a scalar or zeroth-order tensor. Vector data for each sample belong to the first-order type: for example, absorption or emission spectra [UV–visible spectrophotometry, spectrofluorimetry, infrared, near-infrared (NIR), etc.], electrochemical scans (voltammograms, chrono-amperograms), nuclear magnetic resonance spectra, etc. When two first-order instruments are coupled in tandem (e.g., GC–MS, MS–MS, etc.), the order increases from first- to second-order. The latter can also be produced using a single instrument: examples are a spectrofluorometer registering excitation-emission matrices or a diode-array spectrophotometer where a chemical reaction takes place. The data order can be further increased to three if, for example, EEMs are registered as a function of time.

3.2. First-order data

First-order data are processed by suitable first-order multivariate calibration procedures, such as PLS. This involves a calibration step in which the relation between spectra and component concentrations is estimated from a set of reference samples, and a prediction step in which the results of the calibration are used

to estimate the component concentration in an unknown sample spectrum [21]. The PLS-1 version is optimized for the determination of a single analyte of interest, setting the optimum number of loading vectors A in order to avoid overfitting. This is done by applying the leave-one-out cross-validation method described by Haaland and Thomas [22] a set of I calibration spectra is obtained, the model is built with the $(I - 1)$ remaining calibration spectra, and the concentration of the sample left out during the calibration is predicted. This process is repeated a total of I times, until each sample has been left out once. The concentration predicted for each sample is compared with the known concentration of this reference sample. The sum of squared prediction errors for all calibration samples or PRESS is calculated each time a new factor is added to the model. The optimum number is then obtained by computing the ratio $F = \text{PRESS}(A < A^*) / \text{PRESS}(A)$, where A^* leads to the minimum PRESS, and selecting the number of factors corresponding to a probability of less than 75% for $F > 1$.

3.3. Second-order data

3.3.1. U-PLS

U-PLS operates in a similar way to PLS-1, except that second-order data are first vectorized or unfolded along one of the data dimensions, and then a conventional PLS model is built using these unfolded data and the nominal analyte concentrations [16]. Cross-validation can also be employed to estimate the number of calibration latent variables.

3.3.2. N-PLS

Multivariate regression methods such as N-PLS extend the traditional PLS algorithm to higher orders, using the multidimensional structure of the data for model building and prediction [15]. In the case of three-way data, the model is given by the following equation:

$$x_{ijk} = \sum_{f=1}^N t_{if} w_{jf}^j w_{kf}^k + e_{ijk} \quad (1)$$

where x_{ijk} is the fluorescence intensity for sample i at excitation wavelength j and emission wavelength k , N is the number of components, t_{if} is an element of the score matrix \mathbf{T} , w_{jf}^j and w_{kf}^k are elements of two \mathbf{W} loading matrices, and e_{ijk} is a residue not fitted by the model. The model finds the scores yielding maximum covariance with analyte concentrations as the dependent variable. The advantage of using N-PLS over bidimensional regression is a stabilization of the decomposition involved in Eq. (1), which potentially gives increased interpretability and better predictions.

3.3.3. N-PLS/RBL and U-PLS/RBL

If unexpected constituents occur in a test sample, neither the U-PLS nor N-PLS scores for the latter sample can be used for analyte prediction using the trained model. In this case, it is necessary to resort to a technique which is able to: (1) detect the new sample as an outlier, indicating that further actions are necessary before prediction, and (2) isolate the contribution of the unexpected component from that of the calibrated analytes, in order to recalculate appropriate scores for the test sample. U-PLS and N-PLS will consider a sample as an outlier if the residuals of the test data reconstruction are abnormally large in comparison with the typical instrumental noise. In such a case, residual bilinearization can be employed to model the presence of unexpected sample components using principal component analysis (PCA), which allows one to estimate profiles for the unexpected components in the three data dimensions [16,17]. The RBL procedure consists in keeping con-

stant the matrix of calibration loadings, and varying the test sample scores in order to model the test data as a sum of contributions: (1) one modeled by the calibration loadings and (2) one due to the potential interferents. The number of unexpected components in the PCA phase can be assessed by comparing the final residuals of the RBL model with the instrumental noise level. Once the RBL step is finished, and the correct test sample scores have been found, they are employed to provide the analyte concentration as is regularly done in all PLS models.

3.3.4. Figures of merit

Figures of merit such as sensitivity can be estimated for all PLS models, including those coupled to RBL [23]. The analytical sensitivity (γ) and its inverse are also useful [24–26], because they do not depend on the type of measured signal. Finally, the limit of detection (LOD) can be estimated and reported.

3.3.5. Software

All PLS models were applied using suitable MATLAB routines [27], implemented in a graphical user interface available at <http://www.chemometry.com/Index/Links%20and%20downloads/Programs.html>. The N-PLS code is available on the internet at <http://www.models.life.ku.dk/source/>.

4. Results and discussion

4.1. Spectral behavior of the analytes

In solution, naphthalene emits fluorescence at 332 nm exciting at 286 nm, while 1-NA and 2-NA show emission at 445 and 410 nm, when excited at 309 and 333 nm, respectively [12]. When they are immobilized into MIP, 1-NA emits at 421 nm exciting at 333 nm, while 2-NA emits fluorescence at 411 nm when excited at 347 nm (see Fig. 2). The wavelengths corresponding to excitation and emis-

sion maxima in the solid phase are very similar to those obtained in solution, thus it can be concluded that there is no chemical interaction between MA-NCs and MIP.

A significant spectral overlap is apparent between both emission and excitation spectra of analytes (Fig. 2). In a previous work, an iso-emissive point was selected (342/415 nm for excitation/emission wavelengths) for the total determination of both analytes, after it was demonstrated that the signals are additive [12]. The total amount of 1-NA and 2-NA was determined in this latter case. On the other hand, considering the spectral characteristics of the present sample components, the combination of spectral derivatives and zero-crossing could not be successfully applied. Moreover, an additional compound (1-NMA) is a potential interferent because: (1) it emits fluorescence in the working spectral range, and (2) it interacts with MIP, showing the “lowest minimum interferent concentration” (300 ng mL⁻¹), which is the concentration of interferent producing a signal equal or higher than 10% of the fluorescence response produced by the solutions of 1-NA and 2-NA [12]. This implies that chemometrics could be useful for treating fluorescence data in order to simultaneously determine 1-NA and 2-NA in drinking waters, even in the presence of interferents such as 1-NMA or complex background matrices. In this work, first- and second-order multivariate calibration methods were applied for simultaneously determination of 1-NA and 2-NA in drinking water and in the presence of 1-NMA.

4.2. Multivariate calibration results

4.2.1. Results using a binary calibration set

One of the calibration sets described in Section 2 includes two monoamine naphthalene compounds (1-NA and 2-NA), while all other sample components are unsuspected compounds which are not modeled by the calibration set (see Table 1).

Table 4

Second-order multivariate calibration methods. Prediction for test samples (T) and spiked drinking water samples (W) using the binary calibration set.

Samples	Nominal concentrations (ng mL ⁻¹)		Predicted concentrations (ng mL ⁻¹) ^a				
	1-NA	2-NA	N-PLS/RBL ^b		U-PLS/RBL ^b		
			1-NA	2-NA	1-NA	2-NA	
T1	0	335	2 (4)	353 (8)	1 (4)	305 (4)	
T2	710	335	613 (2)	325 (6)	691 (8)	342 (4)	
T3	335	0	350 (3)	22 (1)	313 (5)	20 (5)	
T4	70	600	71 (1)	555 (3)	79 (3)	614 (8)	
T5	600	600	670 (3)	615 (4)	594 (4)	570 (6)	
RMSEP ^c (ng mL ⁻¹)			28	17	11	20	
REP ^d			8	7	3	5	
Samples	Nominal concentrations (ng mL ⁻¹)			Predicted concentrations (ng mL ⁻¹)			
	1-NA	2-NA	1-NMA	N-PLS/RBL ^e		U-PLS/RBL ^e	
				1-NA	2-NA	1-NA	2-NA
W1	100	300	360	90 (7)	270 (9)	92 (9)	328 (9)
W2	100	300	360	93 (8)	284 (8)	95 (9)	270 (8)
W3	360	300	360	313 (8)	309 (7)	326 (9)	286 (8)
W4	500	300	360	401 (9)	262 (9)	411 (9)	275 (6)
W5	360	100	360	347 (1)	96 (1)	395 (4)	109 (8)
W6	360	100	360	371 (8)	93 (2)	328 (8)	103 (9)
W7	360	500	360	359 (9)	511 (8)	343 (9)	483 (1)
RMSEP ^c (ng mL ⁻¹)				31	24	30	18
REP ^d				9	7	9	7

^a Average of three replicates, standard deviations in parentheses.

^b Number of latent variables for 1-NA, 2; for 2-NA, 4; $N_{\text{uns}} = 0$.

^c Root mean square error of prediction.

^d Relative error of prediction.

^e Number of latent variables for 1-NA, 2; for 2-NA, 4; $N_{\text{uns}} = 1$.

Table 5
Second-order multivariate calibration methods. Prediction for test samples (T) and spiked drinking water samples (W) using ternary calibration set.

Samples	Nominal concentrations (ng mL ⁻¹)			Predicted concentrations (ng mL ⁻¹) ^a			
	1-NA	2-NA	1-NMA	N-PLS/RBL ^b		U-PLS/RBL ^b	
				1-NA	2-NA	1-NA	2-NA
T1	0	335	335	3 (4)	366 (6)	15 (5)	345 (3)
T2	710	335	335	692 (3)	330 (6)	721 (6)	312 (3)
T3	335	335	335	321 (3)	293 (7)	374 (5)	326 (5)
T4	70	70	335	77 (2)	71 (3)	71 (3)	72 (8)
T5	70	600	600	69 (4)	636 (4)	70 (4)	618 (7)
RMSEP ^c (ng mL ⁻¹)				8	16	11	10
REP% ^d				3	6	3	3
Samples	Nominal concentrations (ng mL ⁻¹)			Predicted concentrations (ng mL ⁻¹)			
	1-NA	2-NA	1-NMA	N-PLS/RBL ^e		U-PLS/RBL ^e	
				1-NA	2-NA	1-NA	2-NA
W1	100	300	360	91 (7)	265 (9)	87 (5)	302 (1)
W2	100	300	360	90 (9)	279 (8)	93 (9)	290 (7)
W3	360	300	360	345 (9)	267 (7)	348 (4)	267 (9)
W4	500	300	360	433 (9)	274 (5)	442 (8)	268 (5)
W5	360	100	360	328 (8)	80 (6)	372 (8)	102 (8)
W6	360	100	360	386 (8)	103 (9)	375 (9)	108 (9)
W7	360	500	360	397 (8)	510 (7)	331 (9)	487 (3)
RMSEP ^c (ng mL ⁻¹)				24	17	13	11
REP% ^d				8	5	4	4

^a Average of three replicates, standard deviations in parentheses.

^b Number of latent variables for 1-NA, 3; for 2-NA, 3.

^c Root mean square error of prediction.

^d Relative error of prediction.

^e Number of latent variables for 1-NA, 3; for 2-NA, 3.

A set of validation samples (T) was prepared considering the calibration concentration ranges of both analytes 1-NA and 2-NA. Then, second-order data (excitation-emission fluorescence matrices) were obtained, and the samples were predicted applying second-order algorithms. The number of latent variables A was determined by leave-one-out cross-validation using the calibration samples, and were $A=2$ for 1-NA and $A=4$ for 2-NA. Considering that two fluorescent compounds are included in both calibration sets it is logical to think that two factors are needed for each analyte. However, four factors are required for 2-NA, which may be due to the presence of background effects. The results are shown in Table 4.

Prediction samples (W) were obtained by adding Granada tap water and mineral waters commonly sold in Spain with naphthalene compounds considering the calibration concentration ranges, and also the potential interferent 1-NMA at a "minimum interferent concentration" of 300 ng mL⁻¹. Second-order data were obtained, and analytes were predicted applying second-order multivariate methods. The recoveries for the second-order multivariate algorithms U-PLS and N-PLS were not satisfactory (Table 4), using as latent variables $A=2$ for 1-NA and $A=4$ for 2-NA. When U-PLS and N-PLS are combined with residual bilinearization (see Section 3) the number of latent variables was identical, while $N_{\text{uns}}=1$, due to the contribution to the signal from the unsuspected interferent (i.e., 1-NMA). Prediction results obtained applying PLS/RBL are shown in Table 4. The good results suggest that the second-order advantage is fully applied using both PLS/RBL combinations [28]. The value of $N_{\text{uns}}=1$ indicates that 1-NMA is really an interferent. Taking into account that this compound is not included in the calibration set, its signal was not modeled by the calibration data, hence the second-order advantage is absolutely necessary. Table 4 also shows RMSEP and REP% values. They are reasonably good in view of the concentration ranges and matrix complexity. An accuracy test based on the elliptical joint confidence region (EJCR) for the slope and intercept

of predicted versus nominal concentration values was also performed [29]. The elliptical region contained the theoretical point of slope = 1 and intercept = 0, as is shown in Fig. 3G–J. This fact indicates that prediction results for spiked drinking water are accurate. Figures of merit were also determined for both analytes in all samples. The analytical sensitivities (SEN) in water samples were 0.15 and 0.09 mL ng⁻¹ for 1-NA and 2-NA, respectively, leading to the inverse values (γ_n^{-1}) of 6.5 and 11.0 ng mL⁻¹, reasonable considering the concentration range. The limit of detection was 20 ng mL⁻¹ for both analytes [26,27].

4.2.2. Results using ternary calibration set

The alternative ternary calibration set described in Section 2 includes the monoamine naphthalene compounds of interest (1-NA and 2-NA) as well as the potential interferent 1-NMA (see Table 2).

A set of ternary test samples was prepared and predicted using this calibration set and second-order multivariate calibration methods N-PLS and U-PLS, in order to evaluate their predictive abilities.

A set of ternary prediction samples of spiked tap and mineral waters was prepared and measured as described above and predicted applying the second-order multivariate algorithms U-PLS and N-PLS. The satisfactory results shown in Table 5 suggest that the second-order advantage is not necessary, since the interferent is considered in the calibration set. Three factors are needed for each fluorescent compounds applying either the U-PLS or the N-PLS algorithm.

Statistical analysis for prediction and test results showed good RMSEP and REP% values both for N-PLS and U-PLS, and the elliptical regions contained the theoretical points of slope = 1 and intercept = 0, as displayed in Fig. 3C–F [29]. Figures of merit were also calculated: for N-PLS, analytical sensitivities 0.14 and 0.13 FU mL ng⁻¹, inverse values of analytical sensitivities 7.4 and 7.1 ng mL⁻¹ and limits of detection 11 and 20 ng mL⁻¹ for 1-NA and 2-NA, respectively. In case of U-PLS, the values were: analytical sen-

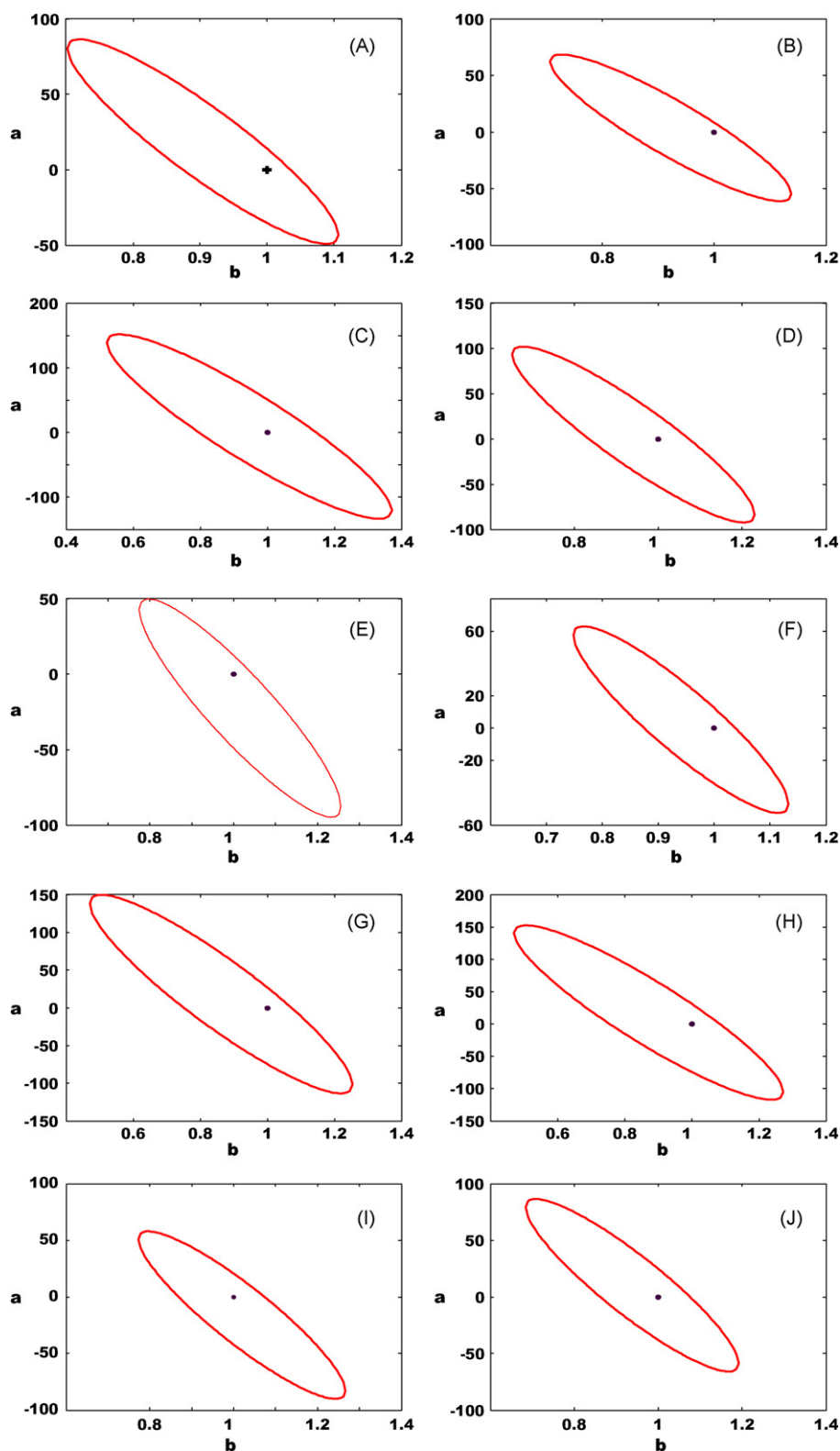


Fig. 3. Test of accuracy based on elliptical joint confidence regions (EJCR). (A) PLS-1 for 1-NA, (B) PLS-1 for 2-NA, (C) N-PLS for 1-NA, (D) U-PLS for 1-NA, (E) N-PLS for 2-NA, (F) U-PLS for 2-NA, (G) N-PLS/RBL for 1-NA, (H) U-PLS/RBL for 1-NA, (I) N-PLS/RBL for 2-NA, and (J) U-PLS/RBL for 2-NA. The red line indicates the elliptical joint confidence region. The point marked in black is the ideal point (0,1) for intercept (a) and slope (b), respectively. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of the article.)

sitivities, 0.23 and 0.15 mL ng⁻¹, inverse of analytical sensitivities, 4.2 and 6.0 ng mL⁻¹ and limits of detection of 12 and 23 ng mL⁻¹ for 1-NA and 2-NA, respectively. These values indicate no serious difference between the employed algorithms.

Another alternative in the case of using ternary calibration samples for predicting ternary samples was to apply first-order multivariate calibration methods such as PLS-1. Once emission-excitation matrices were recorded, emission fluorescence vector

Table 6
Prediction for test samples (T) and spiked drinking waters applying the first-order multivariate calibration method PLS-1 using the ternary calibration set.

Samples	Nominal concentrations (ng mL ⁻¹)			Predicted concentrations (ng mL ⁻¹) ^a	
	1-NA	2-NA	1-NMA	PLS-1	
				1-NA ^d	2-NA ^d
T1	0	335	335	0 (4)	364 (3)
T2	710	335	335	740 (2)	350 (4)
T3	335	335	335	320 (5)	337 (6)
T4	70	70	335	67 (1)	64 (8)
T5	70	70	600	67 (3)	69 (7)
RMSEP ^b (ng mL ⁻¹)				11	11
REP ^c %				5	5
Samples	Nominal concentrations (ng mL ⁻¹)			Predicted concentrations (ng mL ⁻¹) ^a	
	1-NA	2-NA	1-NMA	PLS-1	
				1-NA ^d	2-NA ^d
W1	100	300	360	107 (5)	250 (9)
W2	100	300	360	100 (5)	268 (8)
W3	360	300	360	362 (5)	289 (8)
W4	500	300	360	450 (9)	287 (4)
W5	360	100	360	329 (8)	98 (8)
W6	360	100	360	366 (7)	108 (7)
W7	360	500	360	351 (7)	480 (9)
RMSEP ^b (ng mL ⁻¹)				17	26
REP ^c %				6	9

^a Average of three replicates, standard deviations in parentheses.

^b Root mean square error of prediction.

^c Relative error of prediction.

^d Number of factors: 3 for 1-NA and 2 for 2-NA.

data were extracted for each sample, and these first-order data were processed using first-order multivariate calibration methods.

The sets of ternary test samples and spiked tap and mineral waters were also resolved applying PLS-1, being $A=3$ for 1-NA, meanwhile $A=2$ for 2-NA. It is logical to think that three factors were needed for both analytes considering that at least three fluorescence compounds are present in samples. Really the recoveries as well as the figures of merit were very similar using two or three factors for 2-NA, but the probability (P) was slightly lower using two factors, suggesting that the interference of 1-NMA is negligible in this case may be due to the weak emission signal of the interferent in the score range selected from 390 to 450 nm. Despite this weak signal seems to be important for determining 1-NA and so three factors are needed. The results are shown in Table 6. Figures of merits were: analytical sensitivities, $0.065 \text{ FU mL ng}^{-1}$ for 1-NA and 0.047 mL ng^{-1} for 2-NA; inverse values, 15 ng mL^{-1} for 1-NA and 21 ng mL^{-1} for 2-NA; limits of detection, 15 ng mL^{-1} for 1-NA and 33 ng mL^{-1} for 2-NA [23]. Accuracy was also studied, and the elliptical region contained the theoretical point of slope = 1 and intercept = 0, as shown in Fig. 3A and B. It can be noticed that ternary samples could be resolved using ternary calibration, either by applying second-order methods such as N-PLS and U-PLS, or by applying first-order method such as PLS-1. Although the first-order method seems to be simpler and first-order data acquisition faster, second-order methods are more sensitive as can be concluded by comparing the estimated figures of merit, because they resort to multiple measurements at more sensors [30,31]. Besides, emission and excitation matrices can be easily obtained by a fast-scanning spectrofluorometer. Therefore, if second-order data can be recorded, they are preferred over first-order ones.

5. Conclusions

In the present report, a MIP fluorescence optosensor in combination with a flow injection technique was applied to simultaneously

determine 1-NA and 2-NA in drinking waters. Fluorescence data were processed applying different multivariate calibration algorithms allowing the quantization of both principal monoamines naphthalene compounds even in presence of a potential interferent 1-NMA without sample pretreatment. Classical first-order algorithm such as PLS-1 was applied for processing fluorescence emission spectra data at a fixed wavelength and shows satisfactory results for 1-NA and 2-NA when the interferent is considered in the calibration set, it means both calibration and test samples contain the analytes and the interferent 1-NMA. Second-order algorithm like multiway PLS and unfolded PLS were used for assisting excitation-emission fluorescence matrices, allowing the determination of both analytes of interest also when the potential interferent signal is modeled during calibration, both calibration and test samples include the analytes and the interferent. Comparing figures of merit second-order data seems to be more sensitive. Taking into account this fact and also considering that, emission and excitation matrices can be easily obtained by a fast-scanning spectrofluorometer, if second-order data can be obtained, they are preferred over first-order ones. However, these second-order algorithms showed bad results when the interferent is not included in the calibration set used for prediction. Although, when they are combined with residual bilinearization, prediction results are satisfactory, suggesting that the second-order advantage is fully applied using both PLS/RBL combinations. Moreover, if second-order data can be recorded, they are preferred over first-order ones, because the calibration set involves less samples if three sample components are considered in the test samples. Second-order algorithms with the second-order advantage could be performed using a binary calibration set containing 19 samples in order to predict the analytes in the presence of interferents, or using a ternary calibration set of 31 samples including the interferent in the calibration set without the second-order advantage. The binary calibration is preferred because less experimental samples are required. First-order algorithms could only be applied using a ternary calibration

set, i.e., including the interferent in the calibration set, and thus more experimental samples are involved. Moreover, first-order algorithms require the construction of a sufficiently representative calibration set of samples, which should span all the variability expected in unknown samples. For this reason, in this work the interferent 1-NMA must be included in the calibration set involving more experimental samples.

Acknowledgments

The authors thank to the Spanish Ministry of Education (FPU grant reference AP2006-01147 and project CTQ2007-60079), the Regional Government of Andalusia (excellence projects RNM-666 and P07-FQM-02625) and Andalusian Water Agency (agreement 2243) for their financial support. The National University of Rosario, CONICET (Nacional Centre of Scientific and Tecnical Research) and ANPCyT (Nacional Agency of Scientific and Tecnical Promotion) are also acknowledged for financial support. The authors also gratefully thanks Prof. Dr. Alejandro C. Olivieri, international recognized for his experience in chemometric analysis, for his helpful collaboration in the present work.

References

- [1] K.C. Lee, Y. Ku, *Sep. Sci. Technol.* 31 (1996) 2557.
- [2] F.Q. Liu, J.L. Chen, A.M. Li, Z.H. Fei, Z.L. Zhu, Q.X. Zhang, *Chin. J. Polym. Sci.* 21 (2003) 317.
- [3] A.M. Li, Q.X. Zhang, J.L. Chen, Z.G. Fei, L. Chao, W.X. Li, *React. Funct. Polym.* 49 (2001) 225.
- [4] L.Z. Zhu, B.L. Chen, *Environ. Sci. Technol.* 34 (2000) 2997.
- [5] R. Stabbert, K.H. Schäfer, C. Biefel, K. Rustemeier, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 17 (2003) 2125.
- [6] R.M. Black, R.J. Clarke, R.W. Read, M.T.J. Reid, *J. Chromatogr. A* 662 (1994) 301.
- [7] A.L. Jenkins, S.Y. Bae, *Anal. Chim. Acta* 542 (2005) 32.
- [8] K. Haupt, K. Mosbach, *Chem. Rev.* 100 (2000) 2495.
- [9] A. Merkoci, S. Aegret, *TrAC Trends Anal. Chem.* 21 (2002) 717.
- [10] I. Sánchez Barragán, J.M. Costa Fernández, R. Pereiro, A. Sanz Medel, A. Salinas, A. Segura, A. Fernández Gutiérrez, A. Ballesteros, J.M. González, *Anal. Chem.* 77 (2005) 7005.
- [11] E.L. Holthoff, F.V. Bright, *Anal. Chim. Acta* 594 (2007) 147.
- [12] A. Valero-Navarro, J.F. Fernández-Sánchez, A. Salinas-Castillo, R. Mallavia, A. Segura-Carretero, A. Fernández-Gutiérrez, *Biosens. Bioelectr.* (unpublished work).
- [13] S. Casado Terrones, J.F. Fernández Sánchez, B. Cañabate Díaz, A. Segura Carretero, A. Fernández Gutierrez, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 38 (2005) 785.
- [14] B.K. Lavine, *Anal. Chem.* 70 (1998) 209R.
- [15] R. Bro, *J. Chemom.* 10 (1996) 47.
- [16] J. Öhman, P. Geladi, S.J. Wold, *J. Chemom.* 17 (2003) 274.
- [17] A.C. Olivieri, *J. Chemom.* 19 (2005) 253.
- [18] E. Sánchez, B.R. Kowalsky, *Anal. Chem.* 58 (1986) 496.
- [19] E. Sánchez, B.R. Kowalsky, *J. Chemom.* 2 (1998) 247.
- [20] E. Sánchez, B.R. Kowalsky, *J. Chemom.* 4 (1990) 29.
- [21] N.M. Faber, J. Ferré, R. Boqué, *Chemom. Intell. Lab. Syst., Lab. Inf. Manage.* 55 (2001) 67.
- [22] D.M. Haaland, E.V. Thomas, *Anal. Chem.* 60 (1988) 1193–1202.
- [23] A.C. Olivieri, N.M. Faber, J. Ferré, R. Boqué, J. Kalivas, H. Mark, *Pure Appl. Chem.* 78 (2006) 633.
- [24] L. Cuadros Rodríguez, A.M. García Campaña, C. Jiménez Linares, M. Román, *Ceba. Anal. Lett.* 26 (1993) 1243.
- [25] A. Lorber, *Anal. Chem.* 58 (1986) 1167.
- [26] G.M. Escandar, P.C. Damiani, H.C. Goicoechea, A.C. Olivieri, *Microchem. J.* 82 (2006) 29.
- [27] MATLAB 7.0, The MathWorks Inc., Natick, MA, USA.
- [28] A.C. Olivieri, *Anal. Chem.* 77 (2005) 4936.
- [29] A.G. González, M.A. Herrador, A.G. Asuero, *Talanta* 48 (1999) 729.
- [30] G.M. Escandar, N.M. Faber, H.C. Goicoechea, A. Muñoz de la Peña, A.C. Olivieri, R.J. Poppi, *Trends Anal. Chem.* 26 (2007) 752–765.
- [31] A.C. Olivieri, *Anal. Chem. (Perspect.)* 80 (2008) 5713–5720.

Synthesis of a novel polyurethane-based-magnetic imprinted polymer for the selective optical detection of 1-naphthylamine in drinking water

Angel Valero-Navarro^{a,*}, Antonio L. Medina-Castillo^a, Jorge F. Fernandez-Sanchez^{a,}, Alberto Fernández-Gutiérrez^a**

^aDepartment of Analytical Chemistry, University of Granada, Avda. Fuentenueva s/n, 18071 Granada, Spain

* Corresponding author: Tel: +34958248593 Fax: +34958249510. E-mail: angvana@ugr.es (A. Valero-Navarro)

** Corresponding author: Tel: +34958248593 Fax: +34958249510. E-mail: jffernan@ugr.es (Jorge F. Fernandez-Sanchez)

ABSTRACT

The first polyurethane based magnetic-MIP for the selective detection of 1-naphthylamine (1-NA) in drinking water has been synthesised. The synthesis has been carried out in a two-step process: first, the incorporation of magnetite-coated-oleic acid nanoparticles (γ -Fe₃O₄-OA) into a lipophilic polymeric matrix (*poly*-MMA-*co*-EDMA) and second, the encapsulation of these magnetic seeds into the MIP structure by precipitation polymerisation. The mag-MIP was first RHTM imaged showing a well-organised material with magnetite within the material and the imprinted polymer coating the magnetic core. Thereafter, it was evaluated by batch rebinding analysis and the derived Freundlich isotherm, calculating the number of binding sites ($N_{K_{min}-K_{max}} = 2.63$ and 0.79 mmol g⁻¹, for mag-MIP and mag-NIP, respectively) and apparent average adsorption constant ($K_{K_{min}-K_{max}} = 3.31$ and 3.06 mmol⁻¹, for mag-MIP and mag-NIP, respectively) showing a very effective imprinting process.

We have also developed a magnetic optical sensor MIP by using an optical fiber coupled with a magnetic separator. An unexpected selectivity for 1-NA was revealed allowing the detection of this molecule in water, even in the presence of 4 structurally related compounds (2-naphthylamine, 1-naphthol, 2-naphthol and 1-naphtalenemethylamine), with a low limit of detection (LOD) = 18 ng mL⁻¹. Finally, we applied this new hybrid material to the analysis of 1-NA in tap and mineral waters, obtaining a 91.6% average recovery rate.

Keywords: Molecularly imprinted polymers; Precipitation polymerisation; Polyurethane; 1-naphthylamine; Water analysis

1. Introduction

1-Naphthylamine (1-NA) is one of the top-priority contaminants and one of most important substructures of potentially carcinogenic pollutants discharged from pharmaceutical, dyestuff, photographic and agrochemical industries (Zhu and Chen, 2000; Li et al., 2001) and cigarette smoke (Stabbert et al., 2003) so its efficient detection in surface and ground waters has taken on increasing environmental concern (Lee and Ku, 1996; Liu et al., 2003).

The use of molecularly imprinted polymers (MIPs) has emerged as a promising tool to enhance the selectivity of luminescence sensing systems owing to their specificity toward the target molecules and high stability (Sánchez Barragán et al., 2005).

In a previous work (Valero-Navarro et al., 2009a, b) we described the synthesis of a MIP with high selectivity towards 1-NA and 2-NA, and also, showing high levels of retention of 1-naphthol, 2-naphthol and 1-naphthalenemethylamine (1-NMA). Although the two naphthols were highly retained by the MIP, they were undetectable at the working wavelengths so they were not considered as real interference compounds and 1-NA and 2-NA were simultaneously determined at an isoemissive point. Under these conditions, 1-NMA was established as the main interference compound. This problem was solved by applying classical chemometric tools such as partial least-squares (PLS-1), as well a second order algorithms like multiway PLS (N-PLS) and unfolded PLS (U-PLS) that allowed the detection of 1-NA and 2-NA, even in the presence of 1-NMA. Nevertheless, the MIP was synthesised by solution polymerisation and there were many problems associated with this kind of methodology. Typically, when MIPs are prepared by solution polymerisation, the resultant monolith has to be crashed, ground and sieved to produce microparticles for their applications. Particles obtained in this manner are irregular in shape and size (Beltran et al., 2009) and only 30-40 % is recovered as usable material.

Precipitation polymerisation (PP) is one of the most attractive and reliable methods available for the routine production of imprinted polymer microparticles with desirable characteristics (Medina-Castillo et al., 2010a; Wang et al., 2003; Wei et al., 2006; Ye et al., 1999). The polymer beads synthesised by this method are protected from aggregation during polymerisation by their crosslinked surfaces and are completely surfactant free. To our knowledge most of the MIPs that have been synthesised by this method of polymerisation are acrylic or vinylic based materials so it is an unexplored challenge to make precipitation polymerisation with other materials, such as polyurethanes.

Polyurethane MIPs, however, are less tunable than the acrylic or vinylic ones since there are less available variety of monomers and crosslinkers and sometimes, many undesirable side reactions can

take place between the template and the functional monomers. Nevertheless, there is a great advantage regarding polyurethanes use and it is their really easy preparation protocol without the need for controlling important parameters typical of radical polymerisation such as temperature reaction, presence of impurities, and presence of oxygen, among others.

The use of nanoparticled MIPs appears to be a very interesting alternative to obtain new powerful recognition materials that can be used in the development of optical sensors due to their inherent characteristics (robustness, good thermal, chemical and mechanical stability and their recognition properties). The application of MIPs for optical sensors, however, is not always successful (Medina-Castillo et al., 2010b). The three main reasons for this are: 1) if the analyte is not fluorescent, it is challenging to find a good transducer, 2) the low sensitivity in many cases and 3) the difficulty to implement the resulting MIPs in a fiber optic system without losing sensitivity and selectivity.

While it is still difficult to find a transducer system for non fluorescent analytes, the fixation of MIPs for luminescent analytes has been partly solved in the past with the following strategies. The first approach is based on the use of micro- or nanoparticles of MIPs and complex flow cells in which these particles are immobilised. This results in a sensor spot inside the cell which allows optical readout from the outside. However, sometimes fixing of the sensing material inside a cell can be cumbersome or even impossible. Alternatively, an additional polymer which works as a glue between MIP and fiber can be used, but it may change its optical and adsorption properties thus its sensitivity and selectivity. All these problems can be minimised by the incorporation of magnetic properties into the sensing material. It allows the in situ formation of sensor spots by magnetic separation and, consequently, optical readout from the outside or an easy way to fix a MIP at the tip of an optical fiber (Chojnacki et al., 2007; (Mistlberger et al., 2009). Therefore, the incorporation of magnetic properties to MIPs by using γ - Fe_3O_4 -OA nanobeads will simplify the readout of micro- or nanoparticles of MIPs with fiber optic devices solving some of the previously mentioned drawbacks. Previous studies have demonstrated that magnetite had to be isolated from the MIP to avoid filter effects and self-absorption of luminescence emission (Medina-Castillo et al., 2010b). For this reason, we cannot employ γ - Fe_3O_4 -OA directly in the polymerisation mixture.

In this regard, we have synthesised the first polyurethane based magnetic-MIP for the selective detection of 1-NA in drinking water. The mag-MIP has been synthesised in a two-step process: first, the encapsulation of γ - Fe_3O_4 -OA nanoparticles into a lipophylic polymeric matrix (*poly*-MMA-*co*-EDMA) which does not negatively influence the molecular imprinting phenomenon and second, the synthesis of

mag-MIP by precipitation polymerisation in presence of the nanoparticles synthesised in the previous step.

The mag-MIP and mag-NIP were evaluated by batch rebinding analysis and the derived Freundlich isotherm, calculating the number of binding sites (N_K) and apparent average adsorption constant (K_N).

Finally, a magnetic optical sensor MIP has been developed by using an optical fiber coupled with a magnetic separator which can be used to measure the intrinsic fluorescence of 1-NA when it is retained in the mag-MIP and concentrated for readout by sensor spot formation. An unexpected selectivity for 1-NA was revealed allowing the detection of this molecule in drinking water samples at low levels of concentration and with high accuracy.

2. Experimental

2.1. Reagents and standards

Methyl methacrylate (MMA; 99%), ethylene glycol dimethacrylate (EDMA; 80% in meta/para isomers), potassium persulfate (KPS), oleic acid (OA; 90%), sodium dodecyl sulfate (SDS; minimum 98.5% GC), Naphthalene (NAPH), 1-naphthylamine (1-NA) and 2-naphthylamine (2-NA) were purchased from Sigma–Aldrich. Iron(II) chloride tetrahydrate ($\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), iron(III) chloride hexahydrate ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), acetonitrile and diphenylmethan-4,4'-diisocyanate (MDI) were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Bisphenol A (2,2-bis(4-hydroxyphenyl)propane) was purchased from Aldrich (Milwaukee, WIS, USA). Phloroglucinol was obtained from Fluka Chemie (Steinheim, Germany). Tetrahydrofuran (THF) was obtained from Panreac (Madrid, Spain). All reagents were used as received, without further purification.

Stock solutions ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$) of the individual naphthalene derivatives were prepared by dissolving the appropriate amount of the solid in deionised water and stored at 4°C in the dark (for a period of up to one month). Intermediate stock solutions of 1-NA were daily prepared by dilution in water of the $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ solution.

For the interference studies, solutions of the analytes containing the interference species were prepared by adding the appropriate amount of the interferent to the stock solution.

Freshly prepared ultrapure deionised water (Milli-Q3 RO/MilliQ2 system, Millipore, UK) was used in all experiments.

Lipophilic magnetic nanoparticles: Magnetite coated with oleic acid was prepared according to the procedures described elsewhere (Mistlberger et al., 2009; Zheng et al., 2005).

2.2. Synthesis of the mag-MIP

2.2.1. Encapsulation of $\gamma\text{-Fe}_3\text{O}_4\text{-OA}$ into a polymeric matrix (poly-EDMA-co-MMA) to obtain super-paramagnetic hybrid nanoparticles (SPHNs) by two steps miniemulsion-polymerisation

For this purpose, 2 g of lipophilic magnetic nanoparticles ($\gamma\text{-Fe}_3\text{O}_4\text{-OA}$) were dispersed in 4 mL of n-heptane with 4 mL of chloroform and added to 450 mL of milli-Q water containing 337.5 mg of SDS. The mixture was ice-cooled and then sonicated for 20 min in a high energy sonifier (BRANSON, S-450D) at 70% amplitude for 20 min. The resulting miniemulsion was transferred slowly (under mechanical stirring) to a double-necked flask containing 1.5 mL of 40 wt% MMA and 60 wt% EDMA. The mixture was stirred during 1 hour at room temperature. Then, 180 mg of KPS was added to start the polymerisation and the reaction system was heated to 65 °C under a gentle stream of nitrogen. After a polymerisation time of 24 h the resulting product was washed 6 times with milli-Q water, 5 times with acetone and 5 times with chloroform in order to eliminate surfactant and unreacted compounds.

2.2.2. Synthesis of the mag-MIP

The mag-MIP was prepared by precipitation polymerisation in the presence of the *SPHNs* prepared as it was commented in the above section. The monomers, crosslinker and template ratios were chosen on the basis of previous works of our research group (Valero-Navarro et al., 2009a; Valero-Navarro et al., 2009b). For the preparation of mag-MIP, the template NAPH (0.20 mmol), Bisphenol A (0.70 mmol), MDI (0.82 mmol) and phloroglucinol (0.33 mmol) were dissolved in a mixture of THF (8 mL) and *SPHNs* (16 mg; 4.5% w/w) in a 10 mL glass vial. The vial with the polymerisation mixture was sealed and let to polymerise with continuous mechanical stirring in the dark, at room temperature for 2 days. After polymerisation, the resultant material was washed with acetone and vacuum dried overnight at 40 °C.

The corresponding non-imprinted polymer (NIP) was prepared in the same manner but without the addition of NAPH.

2.3. Binding properties characterisation

Freundlich adsorptions isotherm were used to evaluate the binding properties of the mag-MIP and mag-NIP. These show the relationship between the equilibrium concentration of bound and free guest

over a certain concentration range. They could be easily generated from equilibrium batch rebinding studies and from these experiments it is easy to get some valuable information: on the one hand, to know the capacity of retention of the material, and on the other hand, to corroborate the imprinting phenomenon by analysing the differences in the adsorption of the target molecule, between MIP and NIP.

Freundlich isotherm (FI) equation (see eq. (1)) is a power function of concentration according to

$$B(C) = aC^m \quad (1)$$

where B and C are the concentration of bound and free analyte, respectively, and a and m are fitting constant that have physical meaning (Jaroniec et al., 1988). The constant m is the heterogeneity index. Its value ranges from 0 to 1 and increases as heterogeneity decreases. There is an analytical expression that allows calculating the affinity distribution (AD) for those MIPs that better fit to a Freundlich isotherm:

$$N(K) = 2.303am(1-m^2)K^{-m} \quad (2)$$

It is possible to calculate two additional binding parameters (Rampey et al., 2004): the number of binding sites ($N_{K_{min}-K_{max}}$; see eq. (3)) and the weighted average affinity ($K_{K_{min}-K_{max}}$; see eq. (4)) where a and m are equivalent to Freundlich parameters:

$$N_{K_{min}-K_{max}} = a(1-m^2)(K_{min}^{-m} - K_{max}^{-m}) \quad (3)$$

$$K_{K_{min}-K_{max}} = \left(\frac{m}{m-1} \right) \left(\frac{K_{min}^{1-m} - K_{max}^{1-m}}{K_{min}^{-m} - K_{max}^{-m}} \right) \quad (4)$$

The values for these parameters can be calculated for any range of binding affinities within the limits of the K_{min} and K_{max} being equal to the reciprocal corresponding concentrations $K_{min} = 1/C_{max}$ and $K_{max} = 1/C_{min}$.

Thus, a 5 mg weight of mag-MIP or mag-NIP were added to 3 mL of 1-NA solution (1-NA contents between 100 ng mL⁻¹ and 1000 ng mL⁻¹ in water at pH 9.5) in a 10 mL thick-walled glass vial, sealed and then shaken in an orbital shaking platform for 12 h at room temperature. The magnetic materials were then collected with a magnet and the 1-NA content remaining in the supernatant was determined by fluorescence ($\lambda_{exc/em} = 309/445$ nm). The quantity of adsorbed 1-NA was calculated by subtracting the free concentration after equilibrium from the total. A conventional quartz cell (Hellma, model 101-

QS, Mullheim, Germany) of 10mm light path was used for the batch fluorescence measurements in solution.

2.4. Setup and measuring protocol

The setup for the optical measurements consisted of a 1.5 mm diameter optical fiber probe (Varian Iberica, Spain) coupled with a special magnetic separator with an optimised geometry as described elsewhere (Mistlberger et al., 2008). The separators consisted of four block magnets arranged like a cross around the optical fiber with their like poles pointing against each other. The optical fiber probe was connected to the luminescence spectrometer (Varian Eclipse) by using a Varian fiber adapter. Electronic supporting information (ESI) shows a picture of the used setup (see Figure ESI-1).

Samples were prepared by adding 1 mg of the hybrid material to a conventional quartz cuvette which contained 3 mL of the sample. The cuvette was shaken for 8 min prior to each measurement. The magnetic separator collected the mag-MIP particles creating a spot of sensing material in the wall of the cuvette, close to the tip of the optical fiber probe and, therefore, the luminescence intensity of the analyte bound to the mag-MIP was read out very efficiently and giving I_x . (ESI shows an example for the data evaluation of the acquired measurements; see Figure ESI-2). As blank value (I_0) the same amount of particles was measured in 3 mL solvent (water at pH 9.5) without analyte. The analytical signal was obtained by subtracting I_0 from I_x .

To regenerate the sensing material, it was washed once with 3 mL of acetone.

2.5. Interference study

To evaluate the selectivity of the mag-MIP, two different studies were carried out. First and bearing in mind the main interference compounds that we have found in previous works (Valero-Navarro et al., 2009a, b), we recorded the fluorescence intensities of 1-NA, 2-NA, 1-naphthol, 2-naphthol and 1-NMA retained within mag-MIP at their respective excitation and emission wavelengths (ESI shows a table with the optima excitation and emission wavelengths for all the compounds retained within mag-MIP; see Table ESI-1) at two different concentration levels (300 and 600 ng mL⁻¹). Second, we recorded the fluorescence responses of 1-NA, the rest of the potential interferents evaluated (2-NA, 1-naphthol, 2-naphthol and 1-NMA) and mixtures of all of them at the optimal excitation and emission wavelengths for 1-NA. This study was also carried out at two different concentration levels (300 and 600 ng mL⁻¹).

2.6. Water sample procedure

To demonstrate the predictive ability of the selective mag-MIP sensor, different tap waters (from the city of Granada) and mineral water samples (which are available in Spanish shops) were spiked with different amounts of 1-NA (200, 400 y 600 ng mL⁻¹). The waters underwent no previous treatment.

3 mL of sample were added to a conventional quartz cuvette, together with 1 mg of the mag-MIP. The fluorescence signal was recorded at $\lambda_{\text{exc/em}} = 330/420$ nm and the measuring protocol was as it was described in the above section. The measurements were always repeated eight times to evaluate the precision of the mag-MIP sensor.

3. Results and discussion

3.1. Synthesis of mag-MIP

As it was described in the experimental section, the main objective is to synthesise the mag-MIP in a two-step process: first, the encapsulation of $\gamma\text{-Fe}_3\text{O}_4\text{-OA}$ nanoparticles into a lipophilic polymeric matrix (*poly*-MMA-*co*-EDMA) to generate core-shell *SPHNs* and second, the synthesis of mag-MIP by precipitation polymerisation in presence of the *SPHNs* synthesised in the previous step which will be located inside of the imprinted material.

Following the synthetic protocol and after final polymerisation, the mag-MIP particles were separated from the reaction medium by vacuum filtration on a nylon membrane filter, and then washed five times with acetone to remove template and unreacted monomers and vacuum dried overnight to constant mass. The yields were determined by gravimetric analysis. For mag-MIP and mag-NIP the isolated yields were 85% and 90%, respectively. Thus, good yields of potentially useful materials were generated in one single preparative step. Thereafter, the particles were imaged by High-Resolution Transmission Electron Microscopy (HRTEM) (see Fig. 1).

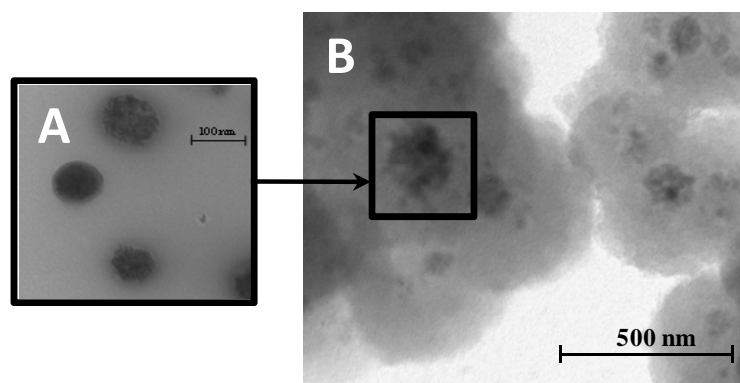


Fig. 1. HRTEM pictures of (A) *SPHNs* and (B) mag-MIP in which the *SPHNs* are located inside.

Fig. 1A shows a HRTEM micrograph of the *SPHNs*. They have a z-average of 100.2 nm with a polydispersity index (PDI) of 0.114 measured by dynamic light scattering. The estimated amount of magnetite by electron microscopy in these nanoparticles is approximately between 75% and 90% as can be seen in Figure 1A. It is also appreciable the polymeric coating that forms the outer shell with magnetite in the core.

Fig. 1B shows a HRTEM micrograph of the mag-MIP produced in the physical form of macroporous resin beads. The *SPHNs* are homogeneously distributed inside of the material. Thus, the surface of the resulting material is free of magnetite resulting in a well-organised material which combines a high magnetite content (~ 5 wt %) and adequate optical properties.

3.2. Spectroscopic characteristics of mono-amine naphthalenes within mag-MIP. Selectivity towards 1-NA

To evaluate the spectrofluorimetric characteristics of 1-NA and 2-NA when they were immobilised within mag-MIP, solutions of $3 \mu\text{g mL}^{-1}$ of each molecule were used. The original purpose of this work was the use of this new hybrid material to detect simultaneously both analytes as it was previously described, but an unexpected selectivity of mag-MIP towards 1-NA was revealed.

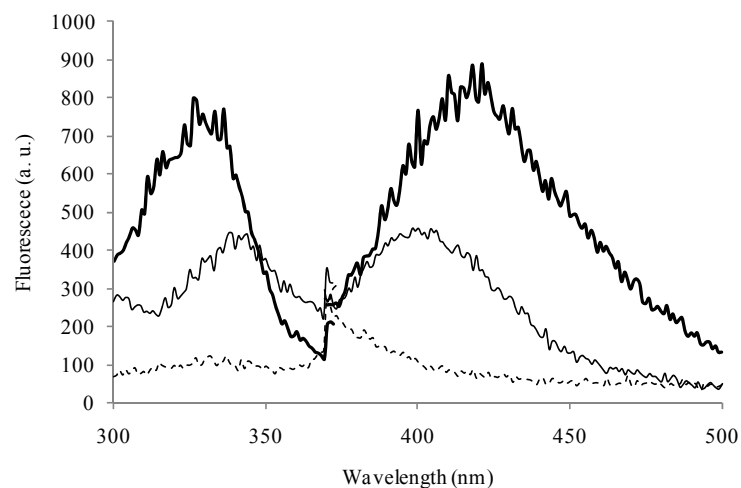


Fig. 2. Fluorescence excitation and emission spectra of 1-NA (thick line) and 2-NA (thin line) immobilised into mag-MIP before and after washing (dashed line) with acetone (3 mL); concentration of mono-amine naphthalenes = $3 \mu\text{g mL}^{-1}$, $\text{slits}_{\text{exc/em}}$ 10/10 nm and detector voltage 1000 V.

Fig. 2 shows the fluorescence spectra of 1-NA and 2-NA incorporated into mag-MIP. In the case of 2-NA, it showed an important degree of retention, however, there are two facts to take into account: firstly, individual solutions of 1-NA and 2-NA show similar intensities of fluorescence emission at a given concentration (Valero-Navarro et al., 2009a), so it is easy to conclude that they have similar optical quantum yields; secondly, as it can be seen in Fig. 2, 1-NA retained within mag-MIP shows a much more intense fluorescence spectrum than 2-NA retained at the same concentration ($3 \mu\text{g mL}^{-1}$). Therefore, there must be a larger retention of 1-NA within mag-MIP. These facts reveal a surprising higher affinity of the mag-MIP towards 1-NA to the detriment of 2-NA.

The better adsorption of 1-NA might be put down to two synergic interactions as was described in a previously work (Valero-Navarro et al., 2009a). The generation of hydrogen bonds between the NH_2 group in naphthylamines and the carbonyl groups of the urethane increases the proximity between the naphthylamines and the MIP and therefore increase the strength of the π - π dispersion interactions (Fig. ESI-3 of ESI shows a simulation of both effects). We hypothesise that the strength of the hydrogen bonds between 1-NA and the mag-MIP could be higher than between 2-NA and the mag-MIP. Therefore, the total interaction forces are increased. The water solubilities of 1-NA and 2-NA are 1700 and $<1000 \text{ mg L}^{-1}$ at $25 \text{ }^\circ\text{C}$, respectively. The only difference between these two molecules is the position of the NH_2 group, so it can be supposed that the NH_2 group in 1-NA is more able to form hydrogen bonds than the 2-NA one, enhancing the water solubility and therefore, making higher the retention within mag-MIP. For this reason, 2-NA will be treated as an important interferent in a further interference study.

3.3. Binding properties of the mag-MIP

The binding properties of mag-MIP and mag-NIP were calculated by modeling the experimental binding data with the Freundlich isotherm (FI) (eq. (1)) (see Fig. 3).

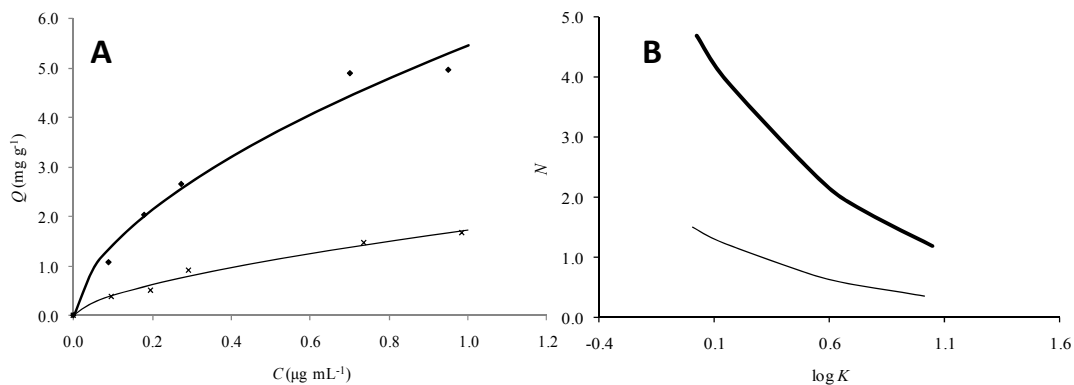


Fig. 3. (A) 1-NA adsorption isotherms for mag-MIP (thick line) and mag-NIP (thin line) and (B) their corresponding affinity distributions for mag-MIP (thick line) and mag-NIP (thin line). Binding conditions: quantity of polymer 5 mg, volume 3 mL, binding time 12 h.

Fig. 3A shows the 1-NA adsorption isotherms for mag-MIP and mag-NIP and Fig. 3B shows their corresponding affinity distributions. All the fitting parameters (a , m and R^2) and the values of $K_{K_{min}-K_{max}}$ and $N_{K_{min}-K_{max}}$ calculated from eq. (3) and (4) have been summarised in Table 1.

Table 1

Freundlich fitting parameters, number of sites ($N_{K_{min}-K_{max}}$) and weighted average affinity ($K_{K_{min}-K_{max}}$) for 1-NA binding on mag-MIP and mag-NIP

	m	a (L ^{m} mmol ^{1-m}) g ⁻¹	$N_{K_{min}-K_{max}}$ (mmol g ⁻¹)	$K_{K_{min}-K_{max}}$ (L mmol ⁻¹)	R^2
Mag-MIP	0.58	5.45	2.63	3.31	0.976
Mag-NIP	0.64	1.74	0.79	3.06	0.983

$N_{K_{min}-K_{max}}$ and $K_{K_{min}-K_{max}}$ calculated in the range $\log(K) = 0.007-1.017$

The affinity distributions of mag-MIP and mag-NIP, based on the FI and produced by eq. (2), were plotted in terms of $N(K)$ vs $\log(K)$. For 1-NA interactions, the affinity distribution in $N(K)$ vs $\log(K)$ was an exponentially decreasing function (see Fig. 3B). The exponentially tailing portion corresponds to the lower concentration portion of the binding isotherm where the high affinity binding sites are preferentially sampled. For most non-covalent MIPs, this is typically the subset of sites that are

measured and utilised in most applications because it is very difficult to reach saturation due to the heterogeneity of these MIPs. For the highest association constants, the affinity distribution function tends toward zero while it tends toward infinity for the lowest association constants. As can be seen the number of sites with any affinity energy is higher in MIP than in MIP in all the range of concentration tested, demonstrating the imprinting phenomenon.

The heterogeneity parameter m is a measure of the ratio of high-to-low affinity sites. In our system mag-MIP showed lower value of m than mag-NIP (0.58 and 0.64, respectively), which indicates a higher percentage of high-affinity binding sites, as expected (see Table 1). The highest number of sites with adequate geometry and functionality for 1-NA in mag-MIP was demonstrated since $N_{K_{min}-K_{max}}$ in mag-MIP was higher than in mag-NIP (2.6 and 0.8 mmol g⁻¹, respectively) and $K_{K_{min}-K_{max}}$ values were slightly higher for mag-MIP than for mag-NIP (3.31 and 3.06 L mmol⁻¹, respectively).

3.2. Analytical features of the magnetic optical sensor MIP

Calibration graph was obtained from the fluorescence signals of triplicate samples of aqueous standards of increasing 1-NA concentrations following the measuring protocol. The regression equation was $I = 35.538 + 0.3602C$, where C is the concentration of 1-NA in ng mL⁻¹ and I is the sensor response. The correlation coefficient (R^2) was 0.9975. All the features of the proposed optosensor are summarised in Table ESI-2.

It is worth mentioning that a good mag-MIP/mag-NIP ratio was observed from these experiments, i.e., the imprinting phenomenon was corroborated to be very effective. For instance, in the determination of 100 ng mL⁻¹ of 1-NA, the mag-MIP/mag-NIP ratio was 5.19.

It was also observed that the fluorescence emission increases linearly with 1-NA concentration up to at least 1000 ng mL⁻¹ in a wide linear range (18-1000 ng mL⁻¹). The limit of detection (LOD), calculated as the concentration of 1-NA which produced an analytical signal three times the standard deviation of the blank signal (IUPAC criterion), was 18 ng mL⁻¹ of 1-NA, and the limit of quantification (LOQ), calculated as the concentration of 1-NA which produced an analytical signal ten times the standard deviation of the blank signal (IUPAC criterion) was 59 ng mL⁻¹, improving all the previously obtained results. The polymer showed good photostability (the material did not exhibit significant changes in its fluorescence response to 1-NA samples after more than 2 h of continuous illumination). The polymer can be easily regenerated by washing it with 3 mL of acetone and can be reused for subsequent assays (up to 450 cycles). The long-term stability of the sensing materials, when stored in the absence of light

at room temperature, was established over at least six months. After such time, mag-MIP did not show any significant losses of analytical sensitivity or selectivity to 1-NA recognition.

3.3. Evaluation of the selectivity

As it was previously commented in the experimental section, to evaluate the selectivity of the mag-MIP, two different studies were carried out. First, we recorded the fluorescence intensities of 1-NA, 2-NA, 1-naphthol, 2-naphthol and 1-NMA retained within mag-MIP at their respective excitation and emission wavelengths at two different concentration levels (300 and 600 ng mL⁻¹) (see Fig. ESI-4). Second, we recorded the fluorescence responses of 1-NA, the rest of the potential interferents evaluated and mixtures of all of them at the optimal excitation and emission wavelengths for 1-NA. This study was also carried out at two different concentration levels (300 and 600 ng mL⁻¹). Results of this study are shown in Fig. 4.

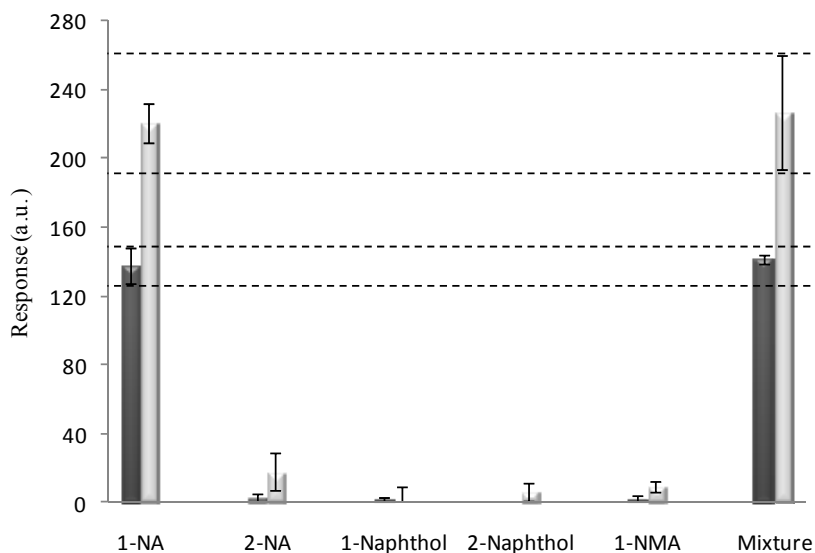


Fig. 4. Optical interference study. Sensing response ($I_x - I_0$) of mag-MIP in the presence of individual [1-NA] = [2-NA] = [1-Naphthol] = [2-Naphthol] = [1-NMA] = 300 ng mL⁻¹ (black bars) and 600 ng mL⁻¹ (grey bars) and mixture of all of them (formed by adding 300 ng mL⁻¹ (black bar) or 600 ng mL⁻¹ (grey bar) of each molecule in the same sample); $\lambda_{exc/em}$ = 330/420 nm, $slits_{exc/em}$ 10/10 nm and detector voltage = 1000 V.

The optical responses of 1-naphthol, 2-naphthol and 1-NMA were almost undetectable at the optimal $\lambda_{exc/em}$ of 1-NA (see Fig. 4) and also at their respective $\lambda_{exc/em}$ (see Fig. ESI-4), so they are not interference compounds at the working concentrations. They have different molecular structures and as it was previously described (Valero-Navarro et al., 2009a), the interactions between these molecules and the polyurethanic network are strongly influenced by their functional groups and molecular sizes. In

contrast to previous results where 1-naphthol, 2-naphthol and 1-NMA were highly retained by the MIP, the modification of the protocol followed in the actual work to design this new material, the inclusion of the magnetic seeds and the reduction of the particle size seem to be responsible of the modification of the physical and chemical structure of the resultant material and then, a decreasing in the degree of adsorption of these molecules.

Regarding 2-NA, it is not an interference molecule at the working concentrations since its fluorescence response does not interfere in the response generated by the adsorption of 1-NA (Fig. 4) and the response recorded at its optimal $\lambda_{exc/eml}$ is not significant (see Fig. ESI-4). As it was previously discussed, the degree of retention of this molecule is far away from that described in previous works. Moreover, when the response is recorded from a mixture of all the compounds evaluated at the optimal $\lambda_{exc/eml}$ of 1-NA, this molecule is not properly excited at the working wavelengths so its fluorescence emission is negligible.

3.4. Analysis of 1-NA in drinking water samples

The evaluation of the predictive ability of the mag-MIP sensor was carried out by spiking several samples of tap water of the city of Granada and commercially available mineral water, with different levels of 1-NA (200, 400 and 600 ng mL⁻¹). Water samples underwent no previous treatment. The experimental results are shown in Table 3 and as it can be seen, recovery percentages varied between 84.3 and 91.6% for tap water samples and 87.7 and 100.2% for mineral water samples, with very low relative standard deviation (for eight replicates), none higher than 4.5%.

Table 2
Recovery study of spiked analytes in water samples

	Added (ng mL ⁻¹)	Found (ng mL ⁻¹)	Recovery (%) (RSD %)
Tap 1	200	168.6	84.3 (3.9)
Tap 2	400	366.4	91.6 (4.0)
Tap 3	600	545.4	90.9 (0.4)
Mineral 1	200	175.5	87.7 (4.0)
Mineral 2	400	380.2	95.1 (4.5)
Mineral 3	600	600.9	100.2 (1.0)

4. Conclusions

We present a magnetic optical sensor MIP which has been developed by synthesising the first polyurethane magnetic-MIP for the selective detection of 1-NA in drinking water. The mag-MIP was synthesised in a two-step process generating a well-organised structure, with *SPHNs* inside of it and the imprinted polymer coating them. The binding properties characterisation was carried out by means of Freundlich isotherm, demonstrating the imprinting phenomenon and strong adsorption ability of the mag-MIP towards 1-NA.

Finally, a magnetic optical sensor MIP has been developed by using an optical fiber coupled with a magnetic separator which can be used to measure the intrinsic fluorescence of 1-NA when it is retained in the mag-MIP and concentrated for readout by sensor spot formation. The procedure showed very good analytical features (LOD and LOQ = 18 and 59 ng mL⁻¹, respectively) and an unexpected selectivity for 1-NA was revealed, allowing the detection of this molecule in water, even in the presence of 4 structurally related compounds (2-NA, 1-naphthol, 2-naphthol and 1-NMA). When the magnetic optical sensor MIP was applied to the analysis of spiked drinking water samples, it allowed the detection of 1-NA at low levels of concentration (ng mL⁻¹ level) with high accuracy, precision, simplicity, speed and low cost.

Acknowledgments

The authors thank to the Spanish Ministry of Education (FPU grant references AP2006-01144 and AP2006-01147, and Project CTQ2008-01394) and the Regional Government of Andalusia (Excellence projects P07-FQM-02738 and P07-FQM-02625) for their financial support.

REFERENCES

- Beltran, A., Marce, R.M., Cormack, P.A.G., Borrull, F., 2009. *J. Chromatogr. A* 1216, 2248-2253.
- Chojnacki, P., Mistlberger, G., Klimant, I., 2007. *Angew. Chem. Int. Ed.* 46, 8850-8853.
- Jaroniec, M., Madey, R., 1988. *Physical Adsorption on Heterogeneous Solids*, Elsevier, New York.

- Lee, K.C., Ku, Y., 1996. *Sep. Sci. Technol.* 31, 2557-2577.
- Li, A.M., Zhang, Q.X., Chen, J. L., Fei, Z.G., Chao, L., Li, W.X., 2001. *React. Funct. Polym.* 49, 225-233.
- Liu, F. Q., Chen, J.L., Li, A.M., Fei, Z. H., Zhu, Z.L., Zhang, Q.X., 2003. *Chinese J. Polym. Sci.* 21, 317-324.
- Medina-Castillo, A.L., Mistlberger, G., Fernandez-Sanchez, J.F., Segura-Carretero, A., Klimant, I., Fernandez-Gutierrez, A., 2010a. *Macromolecules* 43, 5804-5813.
- Medina-Castillo, A.L., Mistlberger, G., Fernandez-Sanchez, J.F., Segura-Carretero, A., Klimant, I., Fernandez-Gutierrez, A., 2010b. *Macromolecules* 43, 55-61.
- Mistlberger, G., Borisov, S.M., Klimant, I., 2009. *Sens. Actuator B-Chem.* 139, 174-180.
- Mistlberger, G., Chojnacki, P., Klimant, I., 2008. *J. Phys. D-Appl. Phys.* 41.
- Rampey, A.M., Umpleby, R.J., Rushton, G.T., Iseman, J.C., Shah, R.N., Shimizu, K.D., 2004. *Anal. Chem.* 76, 1123-1133.
- Sánchez Barragán, I., Costa Fernández, J. M., Pereiro, R., Sanz Medel, A., Salinas, A., Segura, A., Fernández Gutiérrez, A., Ballesteros, A., González, J. M., 2005. *Anal. Chem.* 77, 7005-7011.
- Stabbert, R., Schäfer, K.H., Biefel, C., Rustemeier, K., 2003. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 17, 2125-2132.
- Valero-Navarro, A., Damiani, P.C., Fernandez-Sanchez, J.F., Segura-Carretero, A., Fernandez-Gutierrez, A., 2009a. *Talanta* 78, 57-65.
- Valero-Navarro, A., Salinas-Castillo, A., Fernandez-Sanchez, J.F., Segura-Carretero, A., Mallavia, R., Fernandez-Gutierrez, A., 2009b. *Biosens. Bioelectron.* 24, 2305-2311.
- Wang, J.F., Cormack, P.A.G., Sherrington, D.C., Khoshdel, E., 2003. *Angew. Chem. Int. Ed.* 42, 5336-5338.
- Wei, S., Molinelli, A., Mizaikoff, B., 2006. *Biosens. Bioelectr.* 21, 1943-1951.
- Ye, L., Cormack, P.A.G., Mosbach, K., 1999. *Anal. Comm.* 36, 35-38.

Zheng, W.M., Gao, F., Gu, H.C., 2005. J. Magn. Magn. Mater. 288, 403-410.

Zhu, L.Z., Chen, B.L., 2000. Environ. Sci. Technol. 34, 2997-3002.

Synthesis of a novel polyurethane-based- magnetic imprinted polymer for the selective detection of 1-naphthylamine in drinking water

*Angel Valero-Navarro^a, Antonio L. Medina-Castillo^a, Jorge F. Fernandez-Sanchez^a,
Alberto Fernández-Gutiérrez^a,*

^aDepartment of Analytical Chemistry, Faculty of Sciences, University of Granada Avda.
Fuentenueva s/n 18071 Granada (Spain)

Index

Measuring setup (Fig. ESI-1)

Explication of measuring protocol (Fig. ESI-2)

Spectroscopic characteristics of the molecules under study (Table ESI-1)

Simulation of π - π interaction and hydrogen bond (Fig. ESI-3)

Analytical features of the magnetic optical sensor MIP (Table ESI-2)

Interference study at the optimal $\lambda_{\text{exc/emi}}$ of each evaluated molecule (Fig. ESI-4)

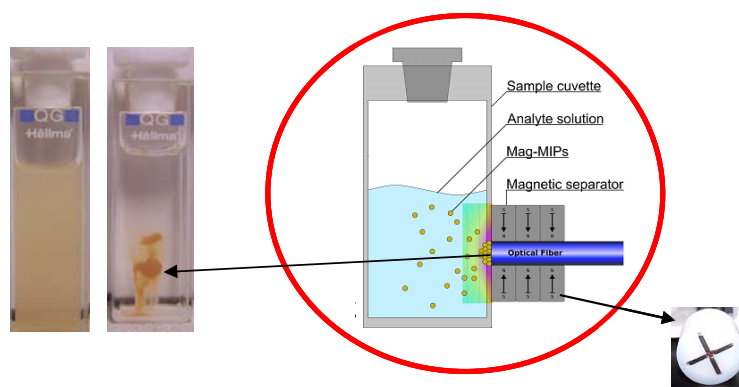
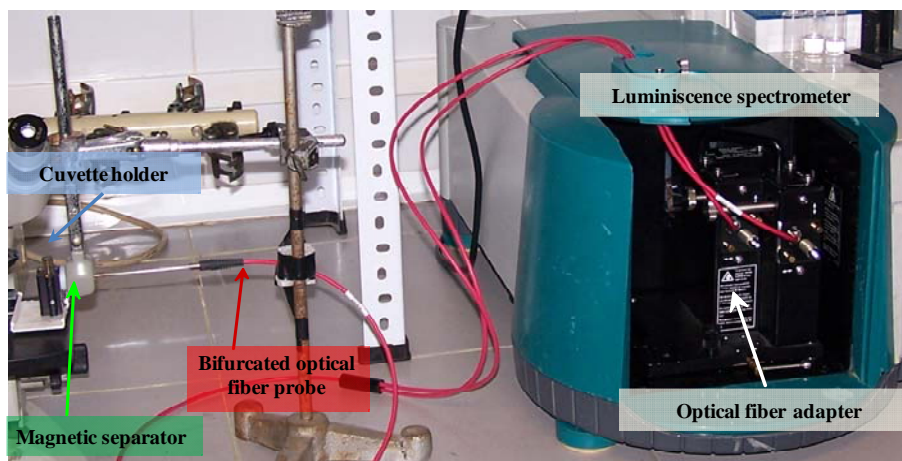


Fig. ESI-1. Pictures of the measuring setup and the magnetic separator.

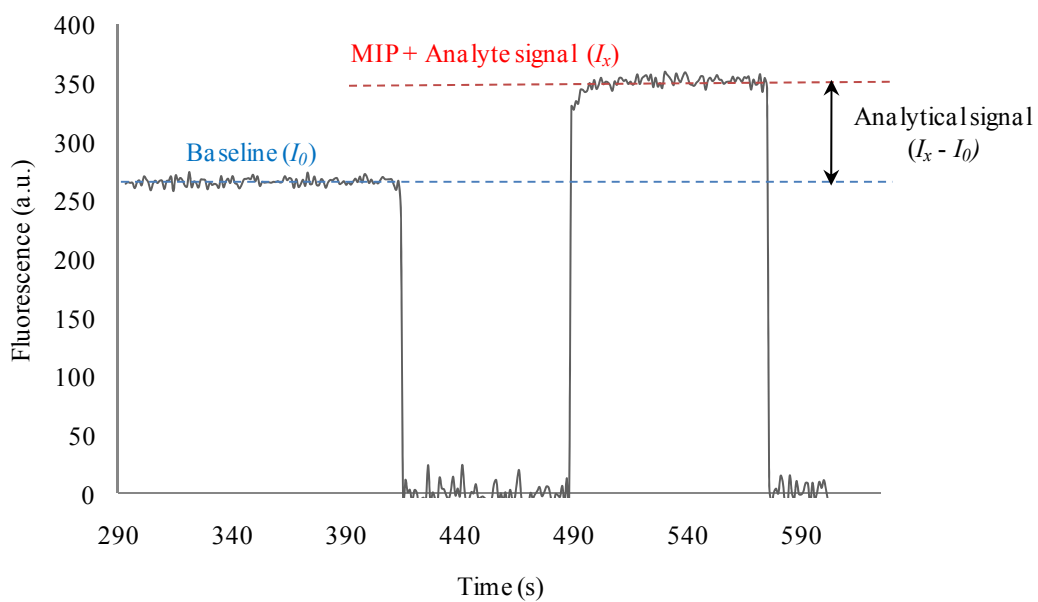


Fig. ESI-2. Calculation of the analytical signal.

Table ESI-1. Spectroscopic characteristics of the molecules under study

	λ_{exc} (nm)	λ_{em} (nm)
<i>1-NA</i>	330	420
<i>2-NA</i>	347	411
<i>1-naphthol</i>	323	385
<i>2-naphthol</i>	334	363
<i>1-NMA</i>	280	350

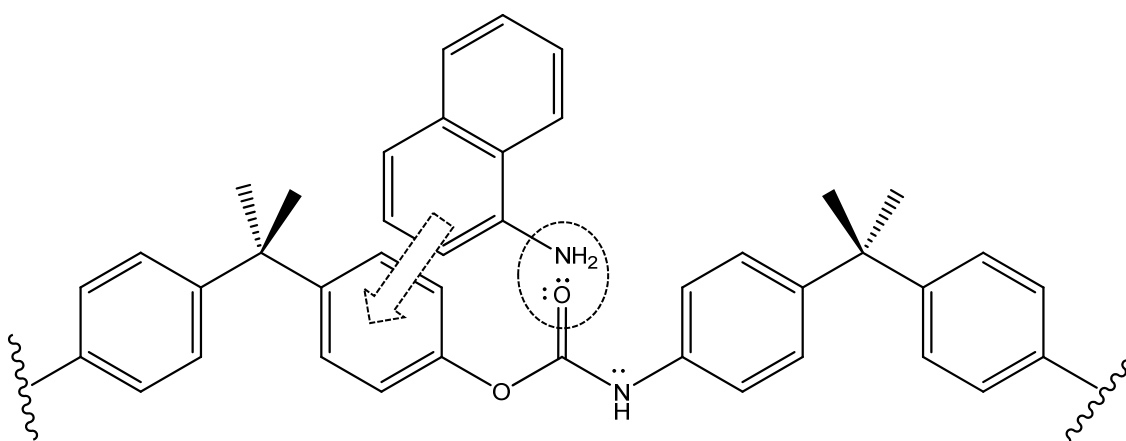


Fig. ESI-3. Simulation of the π - π interaction (arrow) and hydrogen bond (dashed line) between 1-NA and mag-MIP.

Table ESI-2

Optimal conditions and analytical parameters for selective determination of 1-NA

$\lambda_{\text{exc/em}}$ (nm)	330/420
Detector voltage (V)	1000
Slits (excitation/emission) (nm)	10/10
pH	9.5
Slope	0.360
Intercept	35.538
R^2	0.9975
Linear range (ng mL ⁻¹)	18 - 1000
Limit of detection (LOD) (ng mL ⁻¹)	18
Limit of quantification (LOQ) (ng mL ⁻¹)	59

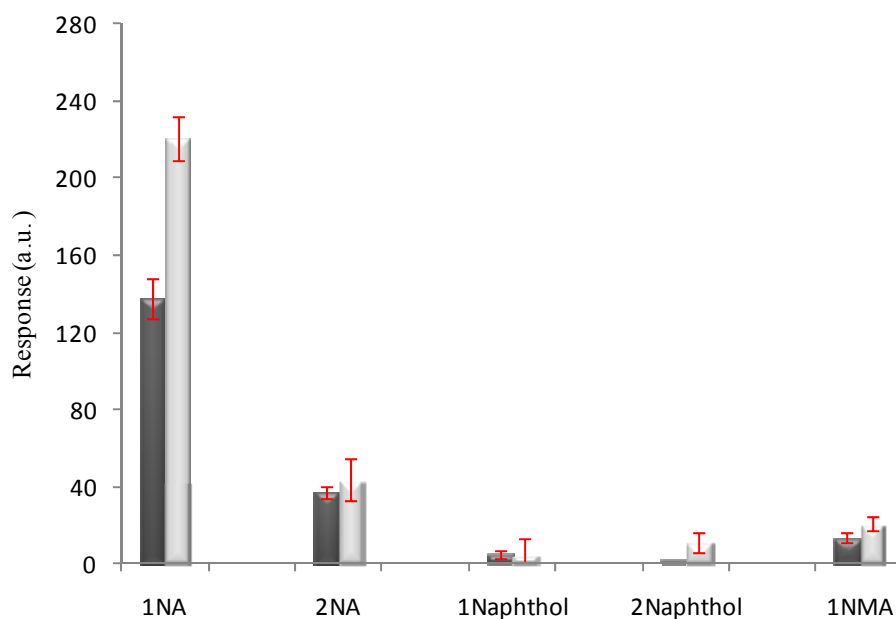


Fig. ESI-4. Optical interference study. Sensing response ($I_x - I_0$) of mag-MIP in the presence of [1-NA] = [2-NA] = [1-Naphthol] = [2-Naphthol] = [1-NMA] = 300 ng mL⁻¹ (black bars) and 600 ng mL⁻¹ (grey bars); $\lambda_{\text{exc/em}}$ (nm): 1-NA=330/420; 2-NA=347/411; 1-naphthol=323/385; 2-naphthol= 334/363; 1-NMA=280/350; slits_{exc/em} 10/10 nm and detector voltage = 1000 V.

BII.9. Conclusiones del bloque II

1. Han sido sintetizados varios MIPs basados en poliuretanos por la técnica de polimerización en disolución. Una vez identificado el MIP más selectivo para 1-NA y 2-NA, se caracterizó por FTIR y se obtuvieron los parámetros de afinidad mediante el uso de la isoterma de Langmuir-Freundlich. El MIP fue implementado en un optosensor convencional con detección por fluorescencia, y se optimizaron todos los parámetros químicos e instrumentales. Se llevó a cabo un estudio de interferentes utilizando 13 moléculas estructuralmente relacionadas con los NCs, de las que solo una de ellas (1-naftalenmetilamina (1-NMA)) interfirió en las medidas. Finalmente, se aplicó de forma exitosa el optosensor a la determinación de NCs en muestras reales de agua de consumo con un límite de detección (LD) de 45 ng ml^{-1} y un tiempo de respuesta de 120 s.
2. Se llevó a cabo una colaboración con el Departamento de Química Analítica de la Universidad de Rosario (Argentina), especialistas en quimiometría, para poder resolver mezclas que contengan las moléculas de interés (1-NA y 2-NA) en presencia de la molécula interferente 1-NMA. Se diseñaron dos tipos diferentes de set de calibrado, uno binario que solo incluía 1-NA y 2-NA; y otro set de calibrado ternario con 1-NA, 2-NA y 1-NMA y se aplicaron las técnicas quimiométricas PLS-1, N-PLS y U-PLS. Se concluyó que, si se utiliza un *set de calibrado binario*, no se obtienen buenos resultados con ninguna de las técnicas propuestas. Es necesario aprovechar la “ventaja de segundo orden” que aparece al emplear bilinealización de residuos (RBL) con cada una de las técnicas de segundo orden propuestas (U-PLS/RBL y N-PLS/RBL). Así, se obtiene buena precisión y exactitud con $\text{LD} = 20 \text{ ng ml}^{-1}$ para cada uno de los analitos. Si por otro lado, se utiliza un *set de calibrado ternario*, se puede

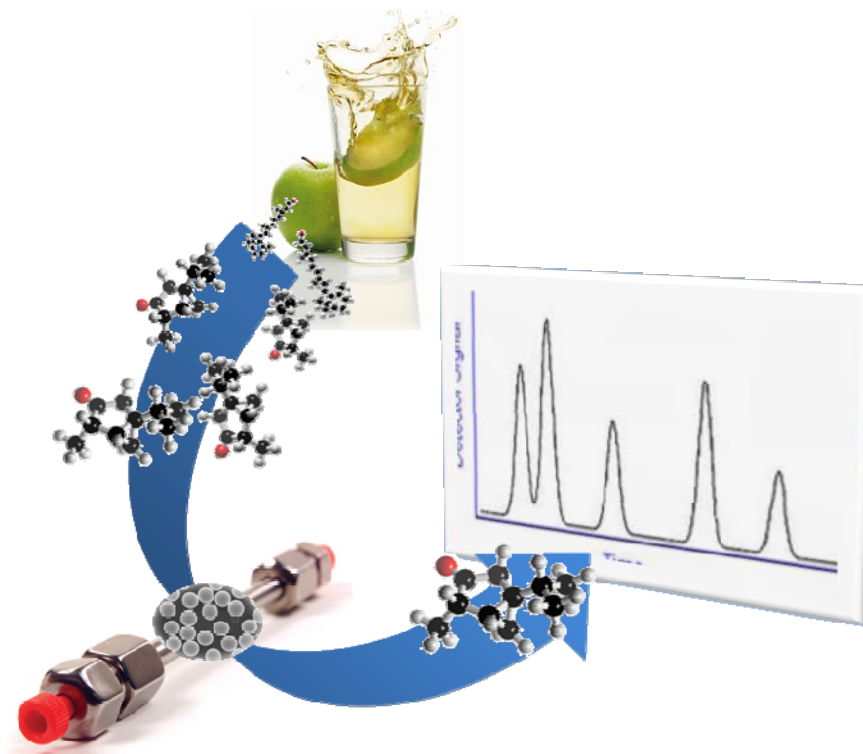
aplicar PLS-1 con buena exactitud y precisión, pero con baja sensibilidad analítica, y LD (1-NA) = 15 ng ml⁻¹ y LD (2-NA) = 33 ng ml⁻¹. Si se aplica U-PLS, se obtiene buena exactitud, precisión y alta sensibilidad analítica, con LD (1-NA) = 12 ng ml⁻¹ y LD (2-NA) = 23 ng ml⁻¹. Finalmente, al aplicar N-PLS se obtienen muy buenos resultados en términos de exactitud, precisión, sensibilidad analítica y LD (1-NA) = 11 ng ml⁻¹ y LD (2-NA) = 20 ng ml⁻¹. Cabe destacar, que al utilizar un set de calibrado ternario no es necesario aprovechar la “ventaja de segundo orden”, ya que las muestras para el calibrado contienen a la especie interferente.

3. Se ha sintetizado el primer MIP magnético poliuretánico (mag-MIP) para la detección óptica selectiva de 1-NA en aguas de consumo. El mag-MIP ha sido sintetizado en un proceso en dos pasos, generando una estructura bien organizada con partículas híbridas super-paramagnéticas encapsuladas en su interior. Se obtuvieron los parámetros de afinidad mediante el uso de la isoterma de Freundlich, demostrándose el fenómeno de impronta molecular y una fuerte capacidad de adsorción de 1-NA. Finalmente, se ha diseñado un sensor óptico magnético mediante el uso de una fibra óptica acoplada a un separador magnético que permite determinar fluorescentemente la 1-NA retenida por el mag-MIP. El procedimiento mostró un excelente comportamiento analítico, demostrando una alta selectividad a 1-NA y permitiendo la determinación de dicha molécula en aguas de consumo con un LD = 18 ng ml⁻¹.

BII.10. Bibliografía del bloque II

1. Nacional Toxicology Program (<http://ntp.niehs.nih.gov/>)
2. Stabbert, R.; Schafer, K. H.; Biefel, C. Analysis of aromatic amines in cigarette smoke. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2003**, *17*, 2125-2132.
3. Luceri, F.; Pieraccini, G.; Moneti, G. Primary aromatic-amines from side-stream cigarette-smoke are common contaminants of indoor air. *Toxicology and Industrial Health* **1993**, *9*, 405-413
4. A. Einstein College of Medicine of Yeshiva University Department of Environmental Health and Safety. (<http://www.aecom.yu.edu/ehs/osha%20regulated/A-naphthylamine.pdf>)
5. Davis, C.S.; Fellin, P.; Otson, R. A review of sampling methods for polyaromatic hydrocarbons in air. *JAPCA-International Journal of Air Pollution Control* **1987**, *37*, 1397-1408.
6. Lehotay, J.; Halmo, F.; Oktavec, D. Determination of 2-naphthylamine in waste gas using HPLC with diode array (DAD) and electrochemical detectors (ED). *Chemicke Listy* **1999**, *93*, 138-141
7. Andreoli, R.; Manini, P.; Bergamaschi, E.; Mutti, A.; Franchini, I.; Niessen, W.M.A. Determination of naphthalene metabolites in human urine by liquid chromatography–mass spectrometry with electrospray ionization. *Journal of Chromatography A* **1999**, *847*, 9-17

8. Marlow, M.; Hurtubise, R.J. Liquid–liquid–liquid microextraction for the enrichment of polycyclic aromatic hydrocarbon metabolites investigated with fluorescence spectroscopy and capillary electrophoresis. *Analytica Chimica Acta* **2004**, *526*, 41-49
9. Salinas-Castillo, A.; Fernandez-Sanchez, J.F.; Segura-Carretero, A.; Fernández-Gutiérrez, A. Solid-surface phosphorescence characterization of polycyclic aromatic hydrocarbons and selective determination of benzo(a)pyrene in water samples. *Analytica Chimica Acta* **2004**, *522*, 19-24
10. Labudzinska, A.; Gorczynska, K. The UV difference spectra as a characteristic feature of phenols and aromatic amines. *Journal of Molecular Structure* **1995**, *349*, 469-472
11. Zheng, W. M.; Gao, F.; Gu, H. C., Magnetic polymer nanospheres with high and uniform magnetite content. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **2005**, *288*, 403-410
12. Chojnacki, P.; Mistlberger, G.; Klimant, I. Separable magnetic sensors for the optical determination of oxygen. *Angewandte Chemie-International Edition* **2007**, *46*, 8850-8853



BLOQUE EXPERIMENTAL III

DISEÑO Y SÍNTESIS DE UN MIP PARA EL

RECONOCIMIENTO SELECTIVO DE ÁCIDO CAFÉICO

BIII. DISEÑO Y SÍNTESIS DE UN MIP PARA EL RECONOCIMIENTO SELECTIVO DE ÁCIDO CAFÉICO

BIII.1. El ácido caféico: un compuesto fenólico

Los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios sintetizados por los vegetales, tanto en su desarrollo normal como en la respuesta a condiciones de estrés (polución, radiación UV, temperaturas extremas y presencia de parásitos, entre otras). La cantidad de compuestos fenólicos presentes en una planta depende de factores como la especie o la variedad, técnica y condiciones de cultivo, estado de maduración, así como de las condiciones de procesado (pelado, troceado, fritura, hervido, etc.) y almacenamiento, entre otras. Por otro lado, su distribución en los tejidos de las plantas, a nivel celular y subcelular, no es uniforme¹.

Los compuestos fenólicos son, en gran parte, los responsables de las principales características organolépticas de los alimentos y bebidas procedentes de las plantas: se encuentran en frutas, verduras, plantas medicinales, especias, legumbres, cereales, frutos secos, granos, semillas, chocolate y en bebidas como el té, café, vino y cerveza^{2,3}. Contribuyen en su color (pigmentos amarillos, naranjas, rojos y azules), sabor (sobre todo en el amargor y astringencia), olor y estabilidad oxidativa⁴.

En el hombre un consumo elevado de compuestos fenólicos se ha asociado con efectos positivos para la salud, sobre todo sus propiedades antioxidantes. Estos compuestos exhiben un rango muy amplio de propiedades fisiológicas: antialérgicos, antiinflamatorios, antimicrobianos, cardioprotectores, vasodilatadores, anticancerígenos, antitrombóticos, entre otras⁵⁻⁷. Para evaluar los efectos biológicos de estos compuestos, así como de cualquier fármaco o componente

alimenticio, uno de los aspectos más importantes a tener en cuenta es su biodisponibilidad^{5, 8}, en la que influyen factores tales como estructura química, absorción, distribución, metabolismo y eliminación.

El término compuesto fenólico engloba a más de 8000 compuestos con una gran diversidad estructural, aunque todos ellos poseen al menos un anillo aromático con uno o más grupos hidroxilo. Los criterios para clasificar no están claramente establecidos; una forma de hacerlo es basándose en su estructura química básica: teniendo en cuenta el número de átomos de carbono que lo constituyen y la estructura del grupo fenólico elemental. En la Fig. BIII. 1 se indican las principales familias de compuestos fenólicos. Muchos de estos compuestos se encuentran en la naturaleza asociados a mono o polisacáridos (glucósidos), o como derivados funcionales tales como ésteres o metilésteres.

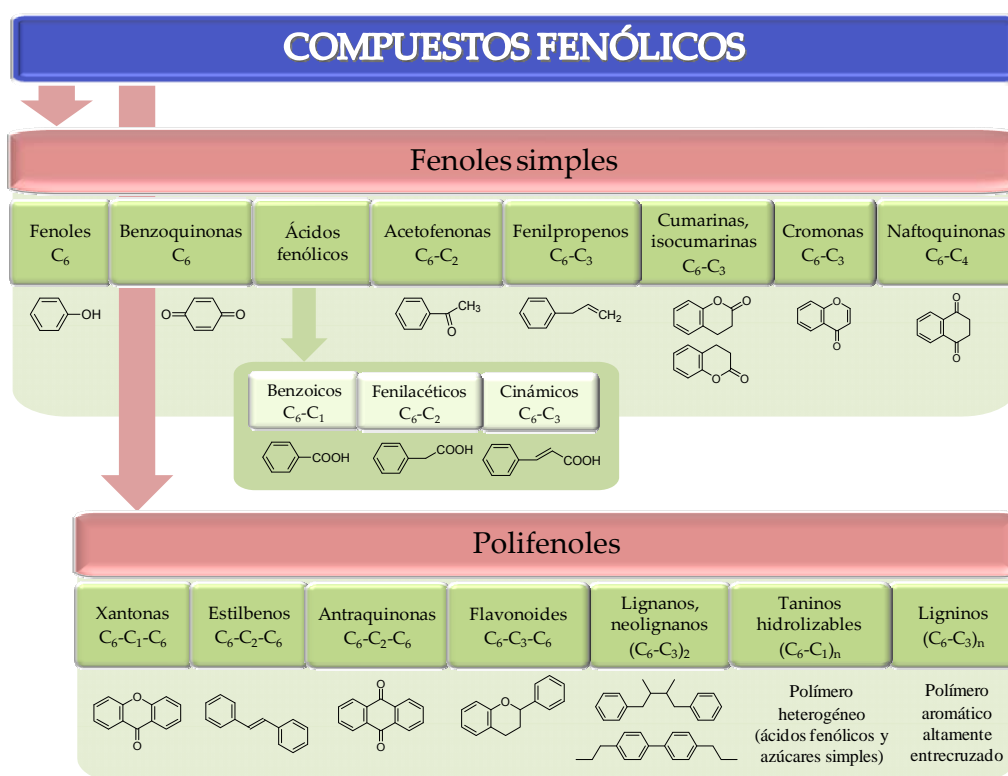


Fig. BIII. 1. Clasificación de las familias de compuestos fenólicos

Los más abundantes en la dieta son los ácido fenólicos y los flavonoides (30% y 60% del total, respectivamente).

El *ácido caféico* es un ácido hidroxicinámico que es producido en plantas por hidroxilación del ácido *p*-cumárico. Posteriormente, esta molécula puede sufrir diversas reacciones de esterificación y reducción, siendo precursor de diferentes compuestos bioactivos como el ácido clorogénico, ácido ferúlico, alcohol sinapílico o el alcohol coniferílico, entre otros (ver Fig. BIII. 2).

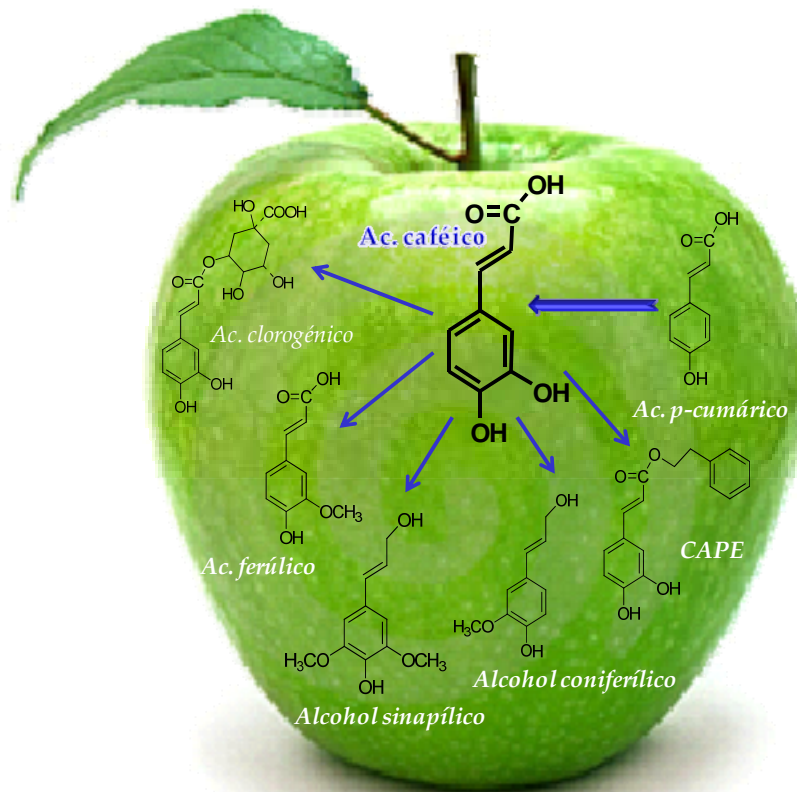


Fig. BIII. 2. Estructura molecular del ácido caféico y de los principales productos de su biometabolización en matrices vegetales como la manzana

Esta molécula puede encontrarse en diversas matrices vegetales como por ejemplo, propóleos, té verde, té negro, el salvado de trigo, café, vino blanco y zumo de manzana, entre otros.

Tanto el ácido caféico, como sus ésteres feniléticos (CAPE) exhiben un amplio rango de propiedades fisiológicas: antiinflamatorias, cardioprotectoras, inmunomoduladoras y anticarcinogénicas, entre otras^{9,10}.

BIII.2. Objetivo del bloque III

El objetivo principal de este bloque experimental es el de diseñar y sintetizar, mediante la técnica de polimerización por precipitación, un MIP que permita el reconocimiento selectivo del antioxidante ácido caféico. Una vez sintetizado el MIP en forma de micropartículas esféricas, se llevará a cabo una caracterización morfológica del material (forma, tamaño, área superficial y volumen medio de poros) y se evaluará su capacidad como material adsorbente para este antioxidante, mediante el uso de isothermas de adsorción. Con objeto de caracterizar sus propiedades de reconocimiento molecular y la selectividad de las interacciones MIP-ácido caféico, se empaquetará el MIP sintetizado en columnas HPLC y se llevará a cabo un estudio cromatográfico, utilizando el material como fase estacionaria. Finalmente, se aplicará el método cromatográfico optimizado al análisis directo de ácido caféico en muestras de zumo de manzana.

La síntesis de los polímeros así como su caracterización morfológica han sido llevadas a cabo durante una estancia en el Departamento de Química Pura y Aplicada de la Universidad de Strathclyde, en Glasgow, Reino Unido, mientras que el resto de caracterizaciones se realizaron en el Departamento de Química Analítica de la Universidad de Granada.

BIII.3. Capítulo del bloque III

En este bloque experimental se ha llevado a cabo el siguiente capítulo:

Capítulo 5: Synthesis of caffeic acid molecularly imprinted polymer microspheres and HPLC evaluation of their sorption properties.

Enviado a Journal of Chromatography A.

Synthesis of caffeic acid molecularly imprinted polymer microspheres and HPLC evaluation of their sorption properties

Ángel Valero-Navarro^{a,*}, María Gómez-Romero^a, Jorge F. Fernández-Sánchez^a, P.A.G. Cormack^{c,**}, Antonio Segura-Carretero^{a,b}, Alberto Fernández-Gutiérrez^{a,b}

^aDepartment of Analytical Chemistry, University of Granada, Avda. Fuentenueva s/n, 18071 Granada, Spain

^bResearch and Development Functional Food Centre (CIDAF), Parque Tecnológico de la Salud, Avda. del Conocimiento s/n, 18100 Granada, Spain

^cWestCHEM, Department of Pure and Applied Chemistry, University of Strathclyde, 295 Cathedral Street, Glasgow G1 1XL, UK

* Corresponding author: Tel: +34958248593 Fax: +34958249510. E-mail: angvana@ugr.es (A. Valero-Navarro)

** Corresponding author: Tel: +441415484951 Fax: +441415484246. E-mail: peter.cormack@strath.ac.uk (P.A.G. Cormack)

ABSTRACT

In the current work, we present the first example of a caffeic acid (CA) molecularly imprinted polymer (MIP) which has been synthesised in the form of well-defined polymer microspheres. The MIP was synthesised by precipitation polymerisation using 4-vinylpyridine as functional monomer, divinylbenzene-80 as crosslinker and acetonitrile/toluene (75/25, v/v) as porogens. The morphological characterisation of the polymer was carried out by means of scanning electron microscopy (SEM) (narrow size distribution: ~ 5 and $1.5 \mu\text{m}$ for MIP and NIP [non-imprinted polymer], respectively) and nitrogen sorption porosimetry: specific surface area of 340 and $350 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ for MIP and NIP and average pore volume of 0.17 and $0.19 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$, for MIP and NIP, respectively. These polymers were further evaluated by batch rebinding and from the derived isotherm its capacity and binding strength were determined (number of binding sites (N_K) = 0.6 and 0.3 mmol g^{-1} for the MIP and a NIP, respectively, and apparent average adsorption constant (K_N) = 10.0 and 1.6 l mmol^{-1} for MIP and NIP, respectively). To evaluate the molecular recognition character of the MIP it was packed into a stainless steel column ($50 \text{ mm} \times 4.6 \text{ mm i.d.}$) and evaluated as HPLC-stationary phase. The mobile phase composition, flow rate, and the elution profile were then optimised in order to improve peak shape without sacrificing imprinting factor (IF). Very interesting, promising properties were revealed. The imprinting factor (IF) was 12 . Finally, when the imprinted LC column was used for the selective recognition of CA over eight related compounds, a very good selectivity was obtained and thus it allowed the direct analysis of CA in commercial apple juice samples with more than 81% recovery percentage and without any clean-up step.

Keywords: Molecularly imprinted polymers, precipitation polymerisation, caffeic acid, HPLC, adsorption isotherm.

1. Introduction

Caffeic acid (CA) is a well-known and important phenolic antioxidant present in many plants and beverages, including coffee, apple juice and white wine (Kang et al. 2009; Lambropoulos and Roussis 2007; Reinders et al. 2001). It is usually found in the presence of many other related compounds so its isolation and preconcentration from such complex matrices, although of genuine interest, can be complicated. Nevertheless, this isolation and preconcentration aim can potentially be realised by using molecularly imprinted polymers (MIPs) to bind the target molecule (CA) in a selective manner even although CA is present in a complex matrix. In this context, MIPs are biomimetic materials which function as antibody binding mimics (Sellergren 2001). This molecular recognition character has been very attractive in many different fields, such as sensors (Valero-Navarro et al. 2009a), biomedical applications, enantiomeric separations and analytical applications (Medina-Castillo et al. 2009; Sanchez-Barragan et al. 2005; Valero-Navarro et al. 2009b), amongst others. Molecular imprinting involves arranging polymerisable functional monomers around a template (pseudo-target analyte or the actual target analyte) followed by polymerisation and template removal. Ensuring that the functional groups of the template molecule are interacting with complementary functionality of polymer-forming components is of major importance in this technique (Whitcombe and Vulfson 2001). Arrangement is generally achieved by non-covalent interactions between specific functional groups on the polymerisable monomers and the template to position the monomers in a particular orientation with respect to the template molecule prior to polymerisation. A cross-linking monomer is generally used to form a three-dimensional rigid structure around the template molecule and produce stable binding cavities. Following polymerisation and template removal, the functional groups within the templated polymeric matrix can subsequently recognise and bind the target analyte using the same non-covalent interactions.

To our knowledge, only three works described the use of CA for MIP synthesis (Li et al. 2005; Li et al. 2004; Michailof et al. 2008). They achieved good results in terms of good imprinting and separation factors but these results are not as good as desirable since the selectivity is not high enough. Moreover, the synthesis of all the MIPs was carried out by the “monolith approach” by solution polymerisation with many disadvantages that are described below.

Typically, when MIPs are prepared by solution polymerisation method, the resultant monolith has to be crashed, ground and sieved to produce microparticles for their applications. Particles obtained in this manner are irregular in shape and size (Beltran et al. 2009) and this is one of the main disadvantages of using MIPs as stationary phases for separation purposes. All of this, with the fact that MIPs possess

heterogeneous binding site distribution with poor site accessibility limits the use of these materials as HPLC-stationary phases.

In order to overcome the limitations of the ‘monolith approach’ to imprinted particles several synthetic strategies have been explored. Some of these methods involve grafting procedures (Lee and S. Kim 2009; Yilmaz et al. 2000), emulsion (Ciardelli et al. 2006), dispersion (Schweitz et al. 1998), suspension (Mayes and Mosbach 1996) and multistep swelling polymerisation (Haginaka and Sanbe 2001) to prepare monodispersed MIP beads. However, in the majority of cases stabilisers and surfactants are required during the syntheses, additives which can contaminate the final products. Extensive and tedious optimisation of synthesis conditions may also be required.

One of the most attractive and reliable methods available for the routine production of imprinted polymer beads with desirable characteristics is precipitation polymerisation (PP) (Medina-Castillo et al. 2010a; Wang et al. 2003; Wei et al. 2006; Ye et al. 1999). This method involves the polymerisation of monomer with crosslinker under dilution conditions (< 5% w/v) in a suitable solvent. The polymer beads formed in this way are protected from aggregation during polymerisation by their crosslinked surfaces and are completely surfactant free. Particles with diameters of a few micrometres can be readily accessed (Ciardelli et al. 2006).

The main aim of this work was to design a new imprinted-material by precipitation polymerisation that becomes an alternative to conventional extraction methods for the selective isolation of CA from potential matrices where it can be present as well as the possibility to develop sensors for monitoring the presence of CA in such complex matrices.

2. Experimental

2.1. Reagents and standards

4-Vinylpyridine (VP), divinylbenzene-80 (DVB-80, containing 80% DVB isomers and 20% ethyl vinylbenzene), α,α' -azobisisobutyronitrile (AIBN) and caffeic acid (CA) were purchased from Aldrich UK. Catechol (CAT) and chlorogenic (CGA), cinnamic (CIA), p-coumaric (COA), dihydrocaffeic (DHCA), ferulic (FA), 4-hydroxy-benzeneacetic (HBAA) and protocatechuic (PCA) acids were from Sigma (Spain) and were used as received. Apple juice samples which are commercially available in Spain. DVB-80 and VP were freed from inhibitors by passing DVB-80 and VP through a column of

activated aluminum oxide. AIBN was purified by recrystallisation from methanol. All solvents were of HPLC or analytical grade.

The corresponding stock solutions (10 mM) were prepared by dissolving the appropriate amount of the solid in acetonitrile and stored at 4°C in the dark (for a period of up to one month). Intermediate stock solutions were daily prepared by dilution in acetonitrile of the 10 mM solution.

2.2. Synthesis and morphological characterisation of the polymers

The polymers were prepared by precipitation polymerisation in a fashion similar to the procedure described by (Wang et al. 2003). For the preparation of MIP, CA (0.66 mmol), VP (2.65 mmol), DVB-80 (13.23 mmol) and AIBN (0.58 mmol) were dissolved in a mixture of acetonitrile and toluene (100 ml, 75/25 v/v) in a 250 ml, polypropylene bottle. The mixture was degassed with oxygen-free nitrogen for 10 minutes while cooling on an ice bath, sealed under nitrogen atmosphere and left to polymerise on a low-profiler roller (Stovall, Greensboro, NC) housed inside a temperature-controllable incubator (Stuart Scientific, Surrey, UK). Reaction temperature was raised from 25°C to 60°C for 2 h and then kept at 60°C for a further 24 h.

After polymerisation, the microspheres were separated from the reaction medium by vacuum filtration on a nylon membrane filter, and then Soxhlet extracted with methanol for 24 h to remove CA and unreacted monomers and vacuum dried overnight at 40°C. The corresponding non-imprinted polymer (NIP) was prepared in the same manner but without the addition of template.

The specific surface areas and porosity of the polymers were measured by nitrogen sorption porosimetry performed on a Micromeritics ASAP 2000 instrument. Generally speaking, a polymer sample of around 0.3–0.4 g was degassed at 100 °C overnight in vacuo and the morphology then established on the basis of the nitrogen uptake and application of the BET method.

Scanning electron micrographs were obtained using a JEOL JM-6400 Scanning Microscope (Peabody, MA).

2.3 Binding properties characterisation

The binding properties of MIP and NIP were calculated by using adsorption isotherms. These show the relationship between the equilibrium concentration of bound and free guest over a certain concentration range. They could be easily generated from equilibrium batch rebinding studies. Thus, a 10 mg weight of MIP or NIP was added to 3 ml of an individual CA solution (CA contents between 0.5

mM and 10 mM in acetonitrile) in a 10 ml thick-walled glass vial, sealed and then shaken in an orbital shaking platform for 24 h at room temperature. It was then centrifuged and the CA content remaining in the supernatant was determined by fluorescence ($\lambda_{\text{exc/em}} = 370/420$ nm; Slits $_{\text{exc/em}} = 5/5$ nm; Detector voltage = 750 V). The quantity of adsorbed CA was calculated by subtracting the free concentration after equilibrium from the total. A conventional quartz cell (Hellma, model 101-QS, Mullheim, Germany) of 10 mm light path was used for the batch fluorescence measurements in solution. The experimental binding data for this study were modeled with the Freundlich isotherm (FI) equation (see eq. (1)), which is a power function of concentration according to

$$B(C) = aC^m \quad (1)$$

where B and C are the concentration of bound and free analyte, respectively, and a and m are fitting constants that have physical meaning (Jaroniec 1988). The constant m is particularly interesting, as it is the heterogeneity index. Its value ranges from 0 to 1 and increases as heterogeneity decreases. This model is very useful for systems with heterogeneous population of binding sites, as frequently observed for MIPs. The broad applicability of the FI to noncovalent MIPs has recently been demonstrated (Medina-Castillo et al. 2010b).

(Rampey et al. 2004) proposed an analytical expression to calculate the affinity distribution (ADs) for those MIPs that better fit to a Freundlich isotherm:

$$N(K) = 2.303am(1-m^2)K^{-m} \quad (2)$$

where K is the affinity constant (K can be assumed as equal to $1/C$) and $N(K)$ is the number of binding sites with a given affinity.

Two additional binding parameters can be calculated (Rampey et al. 2004): the number of binding sites ($N_{K_{\min}-K_{\max}}$; see eq. (3)) and the weighted average affinity ($K_{K_{\min}-K_{\max}}$; see eq. (4)) where a and m are equivalent to Freundlich parameters:

$$N_{K_{\min}-K_{\max}} = a(1-m^2)(K_{\min}^{-m} - K_{\max}^{-m}) \quad (3)$$

$$K_{K_{\min}-K_{\max}} = \left(\frac{m}{m-1} \right) \left(\frac{K_{\min}^{1-m} - K_{\max}^{1-m}}{K_{\min}^{-m} - K_{\max}^{-m}} \right) \quad (4)$$

The values for these parameters can be calculated for any range of binding affinities within the limits of the K_{min} and K_{max} being equal to the reciprocal corresponding concentrations $K_{min} = 1/C_{max}$ and $K_{max} = 1/C_{min}$.

2.4 Chromatographic evaluation

0.6 mg of polymer particles were packed into commercial stainless steel HPLC columns (50 x 4.6 mm) using an air-driven fluid pump with acetone as the slurry and distribution solvent at 3000 psi. Packed columns were washed with ACN/OHAc (95:5) at 0.2 ml min⁻¹ using a Gilson pump 303 to eliminate interfering compounds from the synthetic procedure (e.g. residual template and monomer). For the chromatographic analysis, columns were connected to an Agilent 1200 Series Rapid Resolution LC (RRLC) system (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA), equipped with a diode-array detector (DAD). The evaluation of polymers was carried out at room temperature by injection of 10 µl solution of the template in acetonitrile (5 mM), using 5 µl acetone as void marker. Eight structurally related compounds (CAT, CGA, CIA, COA, DHCA, FA, HBAA and PCA) were used in order to evaluate the selectivity of the polymer. Retention times and areas were recorded at 274 nm under a range of different experimental conditions. Columns were washed with methanol for 5 min and equilibrated with the eluent solvent for 10 min between injections. All experiments have been carried three times to assure the chromatographic reproducibility.

As a measure of polymers' efficiency, different parameters were calculated: the retention factor (k'), determined as $k' = (t_R - t_0)/t_0$, where t_0 is the retention time of the void marker and t_R is the retention time of the analyte; the imprinting factor (IF), calculated from the retention factors of each analyte obtained on the MIP and NIP columns ($IF = k'_{MIP}/k'_{NIP}$); the selectivity factor (α), defined as the ratio of the retention factor of the template molecule to the respective analogue ($\alpha = k'_{template}/k'_{analogue}$); and the normalised retention index (RI), which gives a measure of the degree of recognition for a given analyte calculated as $RI = \alpha_{NIP}/\alpha_{MIP}$.

3. Results and discussion

3.1. Morphological characterisation of polymers

Precipitation polymerisation can be a convenient method for the routine production of imprinted polymers and is proving to be an increasingly popular method for the synthesis of spherical, imprinted polymer particulates (e.g. polymer microspheres). To satisfy different analytical applications, MIPs with

well controlled physical forms in different size ranges are highly desirable. The small MIP nanoparticles are ideal to use in non-separation assay formats (Hunt et al. 2006), whereas the 1.5-5 μm MIP microspheres are very suitable to use in chromatographic techniques (e.g. HPLC, SPE and capillary LC) to provide very fast analytical separations and selective isolations (Pérez-Moral and Mayes 2006).

If one tries to synthesise beaded products with permanent pore structures and average diameters greater than one micrometer, the solubility parameters of the developing polymer network has to be as similar as possible to the solubility parameters of the porogenic solvents. They have to be able to solubilise the growing chains until a critical size. At this point, the solubility parameters are different enough to the solubility parameters of the growing gel (seed) particles and then, an entropic precipitation occurs. With this aim, the polymerisation of divinylbenzene (DVB) in mixtures of acetonitrile and toluene has enabled the production of monodisperse, imprinted polymer beads with average diameters of 5 μm (Wang et al. 2003). Thus, CA-imprinted and non-imprinted polymers were prepared under the optimised conditions described in the Experimental section.

After polymerisation, the polymeric beads were separated from the reaction medium by vacuum filtration on a nylon membrane filter, and then Soxhlet extracted to remove CA and unreacted monomers and vacuum dried overnight to constant mass. The yields were determined by gravimetric analysis. For MIP and NIP the isolated yields were 50% and 60%, respectively. Thus, good yields of potentially useful materials were generated in one single preparative step. Thereafter, the particles were imaged by scanning electron microscopy (SEM) and the specific surface areas of the particles measured by nitrogen sorption porosimetry.

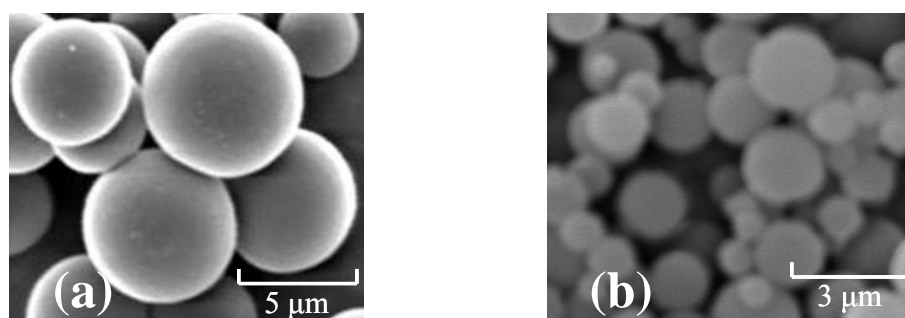


Fig. 1. Scanning electron micrographs of MIP (a) and NIP (b).

Fig. 1 shows a scanning electron micrograph of the MIP and NIP microspheres produced. It can be observed that spherical particles with a narrow size distribution (~ 5 and $1.5 \mu\text{m}$ for MIP and NIP, respectively) were obtained. The physical characteristics for MIP and NIP in terms of specific surface

area (340 and 350 m² g⁻¹, respectively) and average pore volume (0.17 and 0.19 cm³ g⁻¹, respectively) demonstrated that, on the one hand, both polymers have high specific surface areas associated with permanently porous structures and, on the other hand, the presence of template in the precipitation polymerisation did not influence significantly the polymer morphology since MIP and NIP showed similar morphologies.

3.2. Binding properties of the imprinted polymer

The binding properties of MIP and NIP were calculated by modeling the experimental binding data with the Freundlich isotherm (FI) (eq. (1)).

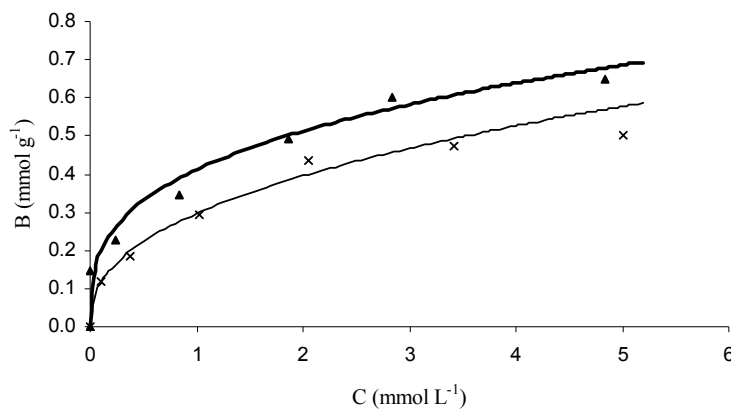


Fig. 2. Caffeic acid adsorption isotherms for MIP (▲) and NIP (x) and their corresponding experimental Freundlich isotherm for MIP (thick line) and NIP (thin line). Binding conditions: quantity of MIP or NIP: 10 mg, solution volume: 3 ml, binding time: 24 h.

Fig. 2 shows the CA adsorption isotherms for MIP and NIP and their corresponding experimental Freundlich isotherms. Table 1 summarises all the fitting parameters (a , m and R^2) and the values of $K_{K_{\min}-K_{\max}}$ and $N_{K_{\min}-K_{\max}}$ calculated from eq. (3) and (4).

Table 1

Freundlich fitting parameters, number of sites ($N_{K_{\min}-K_{\max}}$) and weighted average affinity ($K_{K_{\min}-K_{\max}}$) for CA binding on MIP and NIP

	m	a (l ^m mmol ^{1-m}) g ⁻¹	$N_{K_{\min}-K_{\max}}$ (mmol g ⁻¹)	$K_{K_{\min}-K_{\max}}$ (l mmol ⁻¹)	R^2
MIP	0.32	0.41	0.54	10.02	0.962
NIP	0.41	0.30	0.38	1.57	0.989

$N_{K_{\min}-K_{\max}}$ and $K_{K_{\min}-K_{\max}}$ calculated in the range $\log(K) = -0.7-2.2$

The affinity distribution of MIP and NIP, based on the FI and produced by eq. (2) were plotted in terms of $N(K)$ vs $\log(K)$. For CA interactions, the affinity distributions in $N(K)$ vs $\log(K)$ format was an exponentially decreasing function (see Fig. 3).

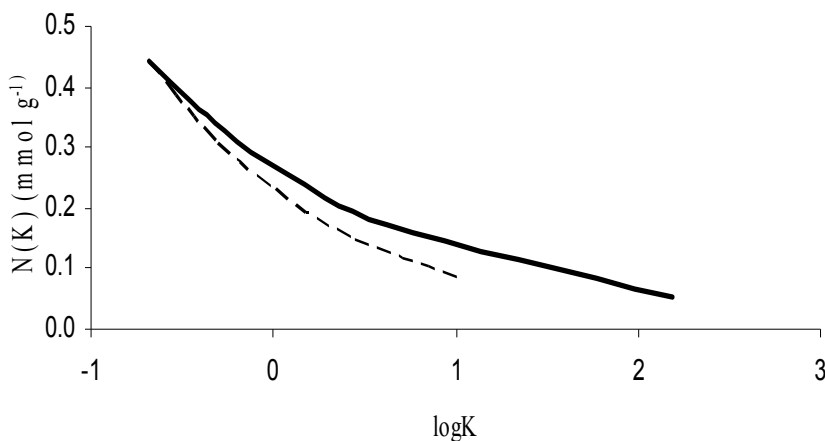


Fig. 3. Affinity distributions for caffeic acid binding to MIP and NIP calculated using the affinity distribution function (Eq. (2)). — MIP, - - - NIP.

The exponentially tailing portion corresponds to the lower concentration portion of the binding isotherm where the high affinity binding sites are preferentially sampled. In this region, the polymer is at low loadings and is far from saturation. For most non-covalent MIPs, this is typically the subset of sites that are measured and utilised in most applications. This is because it is very difficult to reach saturation in most non-covalently imprinted polymers due to their heterogeneity. For the highest association constant, the affinity distribution function tends toward zero while it tends toward infinity for the lowest association constant. As can be seen, the number of sites with any affinity energy is higher in MIP than in NIP in all the range of concentration tested, demonstrating the imprinting phenomenon.

The heterogeneity parameter m is a measure of the ratio of high-to-low affinity sites. In our system MIP showed lower value of m than NIP, which indicates a higher percentage of high-affinity binding sites, as expected (see Table 1). The data also show that $N_{K_{\min}-K_{\max}}$ in MIP is slightly higher than in NIP (0.535 and 0.384 mmol g⁻¹, respectively) and $K_{K_{\min}-K_{\max}}$ values more than 6 times higher in MIP than in NIP (10.022 and 1.570 l mmol⁻¹, respectively). This means that the number of sites with adequate geometry and functionality for CA are higher in MIP, corroborating the imprinting phenomenon.

3.3. Chromatographic evaluation of the polymers

3.3.1. Influence of mobile phase acidity

The molecular recognition properties of the produced MIP polymer were examined by HPLC using acetonitrile as organic mobile phase in isocratic elution. The effects of acetic acid content and flow rate in the mobile phase on the retention properties of CA were investigated. The optimum chromatographic conditions were chosen by comparing the retention time, peak shape and the calculated imprinting factor (*IF*).

When pure acetonitrile at a flow rate of 1 ml min⁻¹ was used as the mobile phase, CA was completely retained by the polymers (no proper peak was observed in 180 min of analysis time). In order to reduce non-specific binding effects, acetic acid (OHAc) was added to the mobile phase (see Fig. 4).

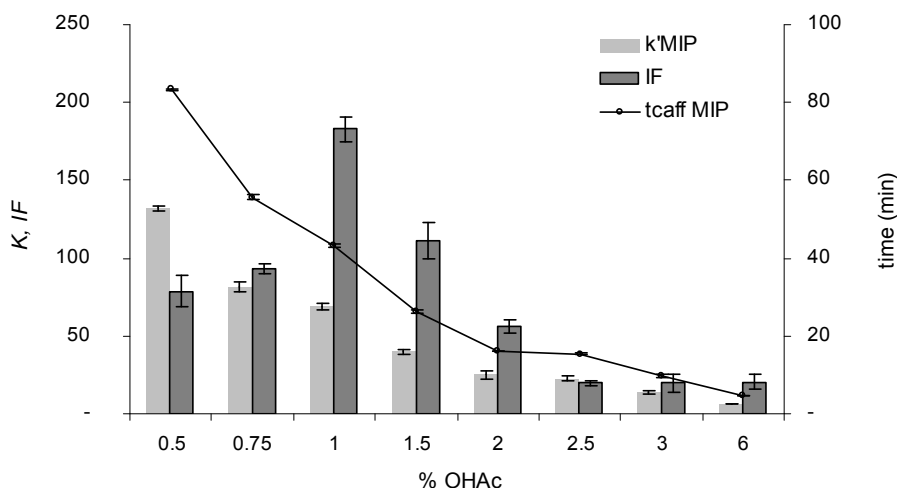


Fig. 4. Variation of t_R , k'_{MIP} and IF of caffeic acid on the MIP column as a function of the percentage of HOAc present in the mobile phase (acetonitrile in isocratic elution; flow rate: 1 ml min⁻¹; detection: 274 nm).

Using 0.5% (v/v) of OHAc, CA was strongly retained on the MIP column (eluting after 83 min) but not in the NIP column (eluting after 2 min). The corresponding k' values were 132.3 and 1.7 for the MIP and NIP, respectively, providing an IF of 78.6. These results demonstrated the existence of an important imprinting effect. Furthermore, as expected from imprinted stationary phases, the peak tailing of the caffeic acid peak was considerably pronounced in the MIP column. This pronounced tailing is a hint of the heterogeneous distribution of binding sites within the polymer, as it has previously discussed in section 3.2. The initial pre-organisation process may give rise to the creation of different interaction modes between the template and the functional groups on the monomer molecules, which will result on

the formation of different recognition sites within the polymer. The variable binding energies or sorption kinetics of these sites would result in the retention of CA to different extent and consequently cause broad elution peaks with characteristic tailing.

When the concentration of OHAc was increased, the retention time of CA in the MIP column, and hence the k'_{MIP} value, decreased. Moreover, with any of the mobile phases used the k' of CA on the imprinted column were much higher than those on the non-imprinted one. We have calculated the IF to evaluate the molecular recognition taking into account the non-specific binding. Compared with the k' , the IF values followed a different trend: it increased when OHAc was increased, reaching a maximum value of 182.9 for 1 % (v/v); after that, it decreased, being virtually constant at OHAc concentrations higher than 2.5 % (v/v). The calculated IF , yet again, supported the existence of specific binding sites in the imprinted polymer.

Besides the drastic decrease in retention time, sharper peaks were obtained as the content in OHAc increased. These effects can be explained by the fact that OHAc interacts with the basic pyridine group on the MIP, thereby competing with the template for binding to the polymer and reducing its retention time.

For further experiments, we used a concentration of OHAc of 2 % (v/v) in order to reduce both the analyte retention time and peak tailing but maintaining a significantly high IF of 56.

3.3.2. Influence of the flow rate on the separation performance

The effect of the mobile phase flow rate on the retention properties of CA on the MIP column was then investigated within the range 0.5-3 ml min⁻¹. As expected, the higher the flow rate, the smaller the retention time of both the void marker and the template. Nevertheless, no significant differences existed amongst the calculated k'_{MIP} values. A flow rate of 2 ml min⁻¹ was chosen as the optimum working value. Compared with lower flow rates, an adequate retention time (9.8 min) and sharper peak were obtained (probably due to the faster mass transfer of CA from relatively inaccessible binding sites to the mobile phase during elution), without excessively compromising the imprinting effect ($IF = 11.9$). On the other hand, higher flow rates resulted in higher consumption of solvents but in no significant improvement on the retention properties of CA. In fact, the IF obtained under the optimised conditions is higher than the one previously reported in imprinted polymers using CA as template (Li et al. 2005; Michailof et al. 2008).

3.3.3. Evaluation of polymer selectivity by HPLC

The polymer selectivity was evaluated under the optimum chromatographic conditions by injecting 5 mM solutions of the template (CA) and the tested related compounds (Fig. 5) onto the columns.

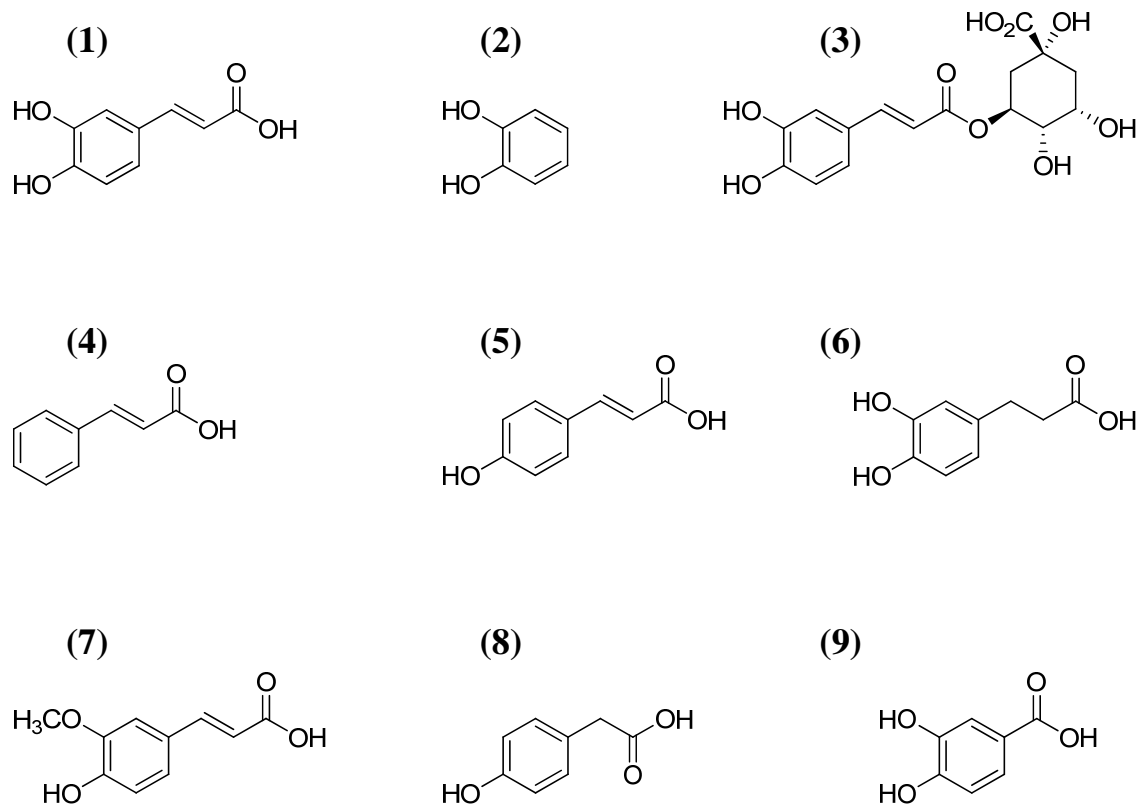


Fig. 5. Chemical structures of the template CA (1) and the tested phenolic compounds CAT (2), CGA (3), CIA (4), COA (5), DHCA (6), FA (7), HBAA (8) and PCA (9).

The selectivity test results may also give aspects of the molecular recognition mechanism.

In view of the retention times observed on the NIP column (see Table 2), all the phenolic compounds examined in this work were able to interact with the polymeric matrix.

Table 2

Retention of the template and its analogues on the NIP and MIP columns. The compounds are arranged according to the elution order on the MIP column. Chromatographic conditions: isocratic elution using acetonitrile/OHAc 98/2 (v/v) at 2 ml min⁻¹ as mobile phase. Detection: 274 nm. For the parameters calculation see experimental part.

Analyte	NIP			MIP			<i>IF</i>	<i>RI</i>
	<i>t_R</i>	<i>k'</i>	α	<i>t_R</i>	<i>k'</i>	α		
acetone (<i>void marker</i>)	0.44	-	-	0.33	-	-	-	-
CAT	0.77	0.74	3.07	0.88	1.66	16.33	2.23	0.19
HBAA	0.71	0.61	3.72	1.50	3.56	7.62	5.79	0.49
CIA	0.75	0.69	3.29	1.62	3.92	6.90	5.66	0.48
FA	0.82	0.86	2.67	1.94	4.88	5.55	5.71	0.48
DHCA	0.80	0.81	2.83	2.75	7.33	3.69	9.09	0.77
COA	0.88	1.00	2.30	3.17	8.62	3.14	8.65	0.73
PCA	1.05	1.39	1.64	5.31	15.08	1.80	10.84	0.91
CA (<i>template</i>)	1.44	2.28	1.00	9.26	27.07	1.00	11.88	1.00
CGA	0.58	0.33	7.01	14.91	44.19	0.61	135.97	11.45

Since the NIP was synthesised without template, it does not possess recognition sites complementary to the spatial structure of any compound and thus, the interactions are non-specific and mainly on the surface of the polymer, e.g. ionic interactions with the basic VP monomer. For this reason, the data obtained in these analyses were standardised by calculating the normalised retention index (*RI*); by definition, the template molecule gives a value of 1, whilst the compounds less strongly retained give smaller values.

The retention (*k'*), selectivity (α) and imprinting factors (*IF*), together with the normalised retention index (*RI*) are reported in Table 2. As it can be seen, the imprinted polymer shows binding properties mainly directed towards the template molecule, although a less marked, but not negligible binding is also present for most of the phenolic compounds studied. Since the retention indices for those compounds, however, are less than one, the polymer is considered selective towards the template in this mobile phase. Nevertheless, there is one CA analogue, CGA, more strongly retained on the MIP than the template itself, i.e. the imprinted polymer shows a strong cross-selectivity for CGA. The elution chromatograms of all the compounds, as well as their *k'* and *IF*, are given in Fig. 6.

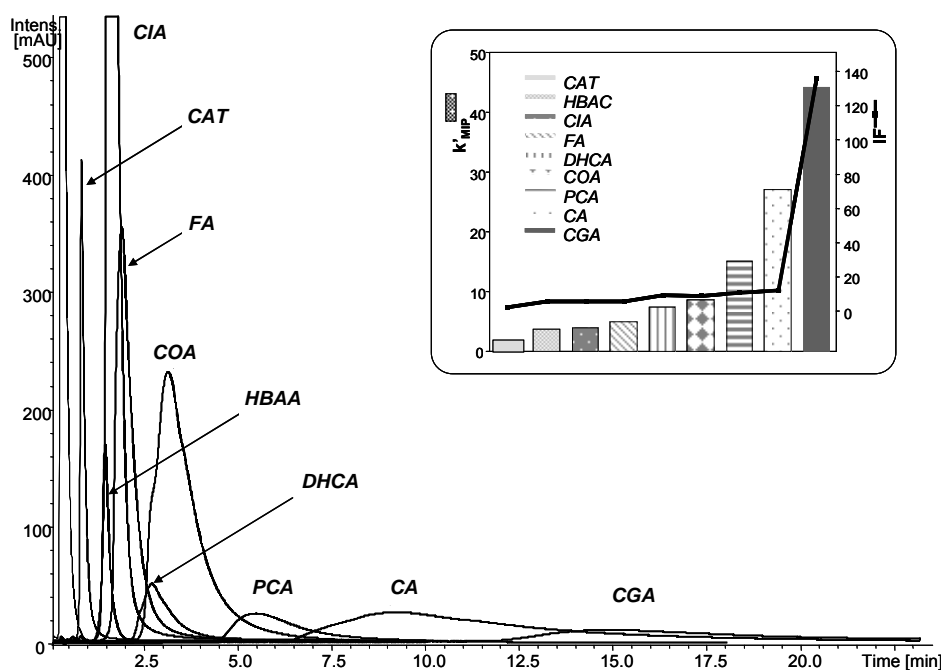


Fig. 6. Elution profiles on MIP column of caffeic acid and its analogues (5mM) and the k' and IF corresponding to each compound. Chromatographic conditions: isocratic elution using acetonitrile/OHAc 98:2 (v/v) at 2 ml min^{-1} as mobile phase. Detection: 274 nm.

According to (Michailof et al. 2008), the interactions between the MIP and the considered phenolic compounds can be explained by keeping in mind their molecular structures which are strongly related to the template molecule. The order of retention on the MIP column is $CAT < HBAAC < CIA < FA < DHCA < COA < PCA < CA < CGA$, which is consistent with the size and shape of the molecule and the presence of double bonds, hydroxyl, carboxyl or methoxy groups in the molecule.

CAT is the smallest molecule, has no acrylic group and, therefore, its retention time is the smallest on the MIP column (1.66 min). PCA and DHCA bear hydroxyl groups in the same positions as CA and probably for this reason they can bind to the sites created for CA, although more weakly since PCA ($RI = 0.91$) is smaller in size than CA and DHCA ($RI = 0.77$) lack the double bond in the three-carbon chain, which makes the molecule less rigid and not able to strongly interact with the specific binding sites. CIA, even though similar in size with CA, is one of the first compounds eluting, since it does not possess the hydroxyl groups in the benzene ring and cannot form the related hydrogen bonds. The existence of the methoxy group in FA and the absence of the hydroxyl group in position 3 in the benzene ring in both HBAAC and COA reduce as well their potency to form strong hydrogen bonds, eluting first HBAAC due to its smaller size.

As previously commented, even though imprinted with CA, the MIP shows very high selectivity for CGA ($RI = 11.41$). Structurally, CGA is the ester formed between CA and quinic acid, and hence

similar shape-selective interaction can be expected for both molecules. Nonetheless, the strong retention of CGA cannot be attributed exclusively to the presence of specific binding sites, but is also due to the larger size and higher polarity than CA.

In any application aimed to detect CA and CGA in the same sample, the cross-selectivity of the MIP for CGA is not a hindrance due to the different retention times of both analogues. Their quantification, however, would not be accurate since the peak tail of CA overlaps with the CGA peak (as can be seen in Fig 5).

(Li et al. 2005), on the contrary, obtained a relatively weak retention of CGA on the MIP column and strong adsorption ability to CA and other structurally related compounds, such as PCA, vanillic and gallic acids. The MIP monolithic stationary phase was prepared by an in situ method using CA as template, tetrahydrofuran and isooctane as solvent, methacrylic acid as monomer and ethylene glycol methacrylate as cross-linker. A different polymerisation technique (monolithic vs. microspheres stationary phase) together with the use of an acidic functional monomer instead of a basic one resulted in the opposite selectivity of the MIP column towards CGA.

3.4. Analysis of caffeic acid in apple juice

The MIP column was used as the stationary phase in HPLC analysis to find out the possibility of separation and quantification of CA from commercial apple juice samples.

Calibration was performed for quantitative determination of CA by the injection of a fixed volume (10 μ l) of standard solutions with concentrations from 1-5 mM of CA in acetonitrile. Good linearity was obtained in this concentration range ($r^2=0.991$). The calibration curve calculated was $A=1540.6x-387.57$, in which x was the amount of CA in mM and A the peak area obtained with the DAD at 274 nm. The apple juice sample were analysed in the MIP column and no CA was detected. Therefore, the samples were spiked with CA at two concentration levels (2 and 3 mM).

Spiked samples were injected directly onto the CA-imprinted column without any previous clean-up step being applied. As can be observed, the high selectivity of the MIP allowed the unambiguous detection of CA while the interferences were rapidly eluted (Fig. 7). Recoveries for all the spiked samples were calculated. Three replicates of each sample were injected, obtaining for 2 mM a mean recovery of $90.5 \pm 1.4 \%$, and $81.1 \pm 1.3 \%$ for 3 mM.

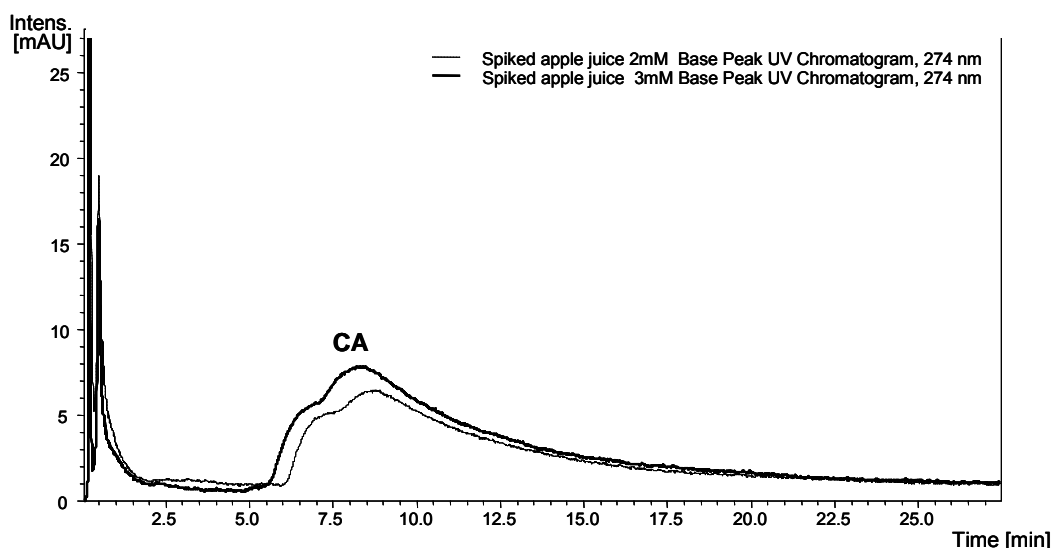


Fig. 7. Elution profile on MIP column of apple juice samples spiked with 2 and 3 mM of CA. Chromatographic conditions: isocratic elution using acetonitrile/OHAc 98:2 (v/v) at 2 ml min⁻¹ as mobile phase. Detection: 274 nm.

A reduction in the retention time was observed at high loads of standard solutions and when the juice samples were injected, which can be attributed to the different affinity binding sites present in the polymer, as was previously demonstrated. Under higher load conditions, the high fidelity binding sites become saturated and the poorer quality binding sites contribute to a greater extent to the CA-MIP interactions, resulting in decreased retention times.

The results demonstrate that, under the optimised conditions, CA can be directly separated from matrix components and thus the use of this MIP allows the screening and selective isolation of CA in less than 25 min using typical instrumentation available in any routine laboratory.

4. Conclusions

In this work, the technique of molecular imprinting by precipitation polymerisation has been successfully used to produce the first caffeic acid (CA) molecularly imprinted polymer (MIP) in the form of well-defined microspheres.

The binding properties of the MIP and the blank polymer (NIP) were evaluated by batch rebinding studies and using the derived adsorption isotherms. The experimental data set was fit to the Freundlich isotherm and from the fitting parameters we calculated the affinity distributions for MIP and NIP demonstrating the imprinting phenomenon and strong adsorption ability of the MIP towards CA.

The polymers were further evaluated as HPLC stationary phases corroborating the imprinting phenomenon once again and selective recognition of CA by the imprinted material since very good selectivity was achieved when CA was perfectly isolated in a matrix with eight structurally related compounds. The performance of the imprinted microspheres was proven superior to conventionally prepared bulk and solution polymers when the imprinted column was used directly with juice samples without any clean-up step allowing an efficient removal and recovery of CA from such complex samples. The CA recoveries obtained were quantitative in all cases and higher than 81 %. It is worthwhile to mention that reproducible responses were noted for both NIP and MIP materials for the template over a 12-month-time-period.

Further research will focus on developing new imprinting materials for the separation and determination of more polyphenols compounds, as well as using the promising CA-MIP as an analytical tool for various potential applications, such as MISPE cartridges or even CA-sensors.

Acknowledgments

Acknowledgments: The authors thank the Spanish Ministry of Education (FPU grants references AP2006-01147, AP2005-2985 and Project CTQ2008-01394) and the Regional Government of Andalusia (Excellence projects P07-FQM-2738, P07-FQM-2625 and P09-CTS-4564) for their financial support.

REFERENCES

- Beltran, A., Marce, R.M., Cormack, P.A.G., Borrull, F., 2009. *J. Chromatogr. A* 1216(12), 2248-2253.
- Ciardelli, G., Borrelli, C., Silvestri, D., Cristallini, C., Barbani, N., Giusti, P., 2006. *Biosens. Bioelectr.* 21(12), 2329-2338.
- Haginaka, J., Sanbe, H., 2001. *J. Chromatogr. A* 913(1-2), 141-146.
- Hunt, C.E., Pasetto, P., Ansell, R.J., Haupt, K., 2006. *Chem. Commun.* (16), 1754-1756.
- Jaroniec, M., Madey, R., 1988. *Physical Adsorption on Heterogeneous Solids*, Elsevier, New York.

- Kang, N.J., Lee, K.W., Shin, B.J., Jung, S.K., Hwang, M.K., Bode, A.M., Heo, Y.S., Lee, H.J., Dong, Z.G., 2009. *Carcinogenesis* 30(2), 321-330.
- Lambropoulos, I., Roussis, I.G., 2007. *Food Res. Int.* 40(1), 176-181.
- Lee, H.Y., S. Kim, B., 2009. *Biosens. Bioelectr.* 25(3), 587-591.
- Li, H., Liu, Y.J., Zhang, Z.H., Liao, H.P., Nie, L.H., Yao, S.Z., 2005. *J. Chromatogr. A* 1098(1-2), 66-74.
- Li, H., Nie, L.H., Yao, S.Z., 2004. *Chromatographia* 60(7-8), 425-431.
- Mayes, A.G., Mosbach, K., 1996. *Anal. Chem.* 68(21), 3769-3774.
- Medina-Castillo, A.L., Fernandez-Sanchez, J.F., Segura-Carretero, A., Fernandez-Gutierrez, A., 2009. *Biosens. Bioelectr.* 25(2), 442-449.
- Medina-Castillo, A.L., Fernandez-Sanchez, J.F., Segura-Carretero, A., Fernandez-Gutierrez, A., 2010a. *Macromolecules* 43(13), 5804-5813.
- Medina-Castillo, A.L., Mistlberger, G., Fernandez-Sanchez, J.F., Segura-Carretero, A., Klimant, I., Fernandez-Gutierrez, A., 2010b. *Macromolecules* 43(1), 55-61.
- Michailof, C., Manesiotes, P., Panayiotou, C., 2008. *J. Chromatogr. A* 1182(1), 25-33.
- Perez-Moral, N., Mayes, A.G., 2006. *Biosens. Bioelectr.* 21(9), 1798-1803.
- Rampey, A.M., Umpleby, R.J., Rushton, G.T., Iseman, J.C., Shah, R.N., Shimizu, K.D., 2004. *Anal. Chem.* 76(4), 1123-1133.
- Reinders, R.D., Biesterveld, S., Bijker, P.G.H., 2001. *Appl. Environ. Microbiol.* 67(6), 2863-2866.
- Sanchez-Barragan, I., Costa-Fernandez, J.M., Pereiro, R., Sanz-Medel, A., Salinas, A., Segura, A., Fernandez-Gutierrez, A., Ballesteros, A., Gonzalez, J.M., 2005. *Anal. Chem.* 77(21), 7005-7011.
- Schweitz, L., Andersson, L.I., Nilsson, S., 1998 *J. Chromatogr. A* 817(1-2), 5-13.
- Sellergren, B., 2001. *Molecularly imprinted Polymers (Techniques and instrumentation in Analytical Chemistry)*, Elsevier, Amsterdam.

- Valero-Navarro, A., Salinas-Castillo, A., Fernandez-Sanchez, J.F., Segura-Carretero, A., Mallavia, R., Fernandez-Gutierrez, A., 2009a. *Biosens. Bioelectr.* 24(7), 2305-2311.
- Valero-Navarro, A., Damiani, P.C., Fernandez-Sanchez, J.F., Segura-Carretero, A., Fernandez-Gutierrez, A., 2009b. *Talanta* 78(1), 57-65.
- Wang, J.F., Cormack, P.A.G., Sherrington, D.C., Khoshdel, E., 2003. *Angew. Chem. Int. Ed.* 42(43), 5336-5338.
- Wei, S., Molinelli, A., Mizaikoff, B., 2006. *Biosens. Bioelectr.* 21(10), 1943-1951.
- Whitcombe, M.J., Vulfson, E.N., 2001. *Adv. Mater.* 13(7), 467-478.
- Ye, L., Cormack, P.A.G., Mosbach, K., 1999. *Anal. Comm.* 36(2), 35-38.
- Yilmaz, E., Haupt, K., Mosbach, K., 2000. *Angew. Chem. Int. Ed.* 39(12), 2115-2118.

BIII.5. Conclusiones del bloque III

En este bloque se ha utilizado la técnica de polimerización por precipitación para producir, de forma exitosa, el primer MIP para ácido caféico en forma de micropartículas esféricas muy bien definidas.

Se llevó a cabo una caracterización morfológica de MIP y NIP mediante microscopía SEM (indicando una baja polidispersidad y tamaño de partícula de ~5 nm y ~1.5 nm para MIP y NIP, respectivamente), y porosimetría de adsorción de nitrógeno (superficie de área específica de 340 y 350 m² g⁻¹ para MIP y NIP y volumen medio de poro de 0.17 y 0.19 cm³ g⁻¹, para MIP and NIP, respectivamente). Las propiedades de enlace de los polímeros fueron evaluadas por análisis en *batch*, a partir del cual se obtuvieron las correspondientes isothermas de adsorción. Estos datos experimentales se ajustaron a la isoterma de adsorción de Freundlich y de los parámetros de ajuste de dicha isoterma se calculó la distribución de afinidad para MIP y NIP (número de sitios de enlace (N_K) = 0.6 y 0.3 mmol g⁻¹, para MIP y NIP, respectivamente y constante de afinidad media (K_N) = 10.0 y 1.6 l mmol⁻¹, para MIP y NIP, respectivamente) demostrando, por un lado, el fenómeno de impronta y por otro lado, una fuerte capacidad de adsorción del MIP hacia ácido caféico.

Los polímeros fueron evaluados como fases estacionarias en columnas de HPLC, corroborando de nuevo el fenómeno de la impronta molecular y demostrando un alto reconocimiento selectivo para ácido caféico al ser perfectamente aislado de una matriz que contenía 8 compuestos estructuralmente relacionados.

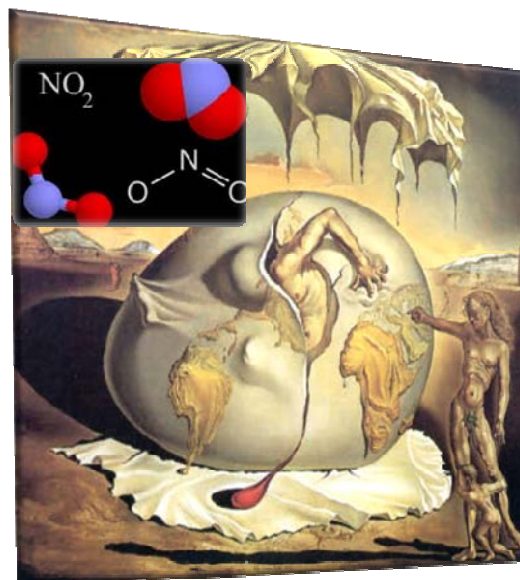
Finalmente, la columna HPLC con el material impreso fue utilizada directamente con muestras de zumo de manzana, sin ningún tratamiento de muestra previo, permitiendo un excelente aislamiento y altas recuperaciones (>80%) de ácido caféico en esta matriz tan compleja.

Cabe destacar que tanto MIP como NIP ofrecieron respuestas altamente reproducibles durante más de un año de uso.

BIII.6. Bibliografía del bloque III

1. Naczk, M.; Shahidi, F. Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2006**, *41*, 1523-1542.
2. Manach, C.; Scalbert, A.; Morand, C., et al. Polyphenols: food sources and bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition* **2004**, *79*, 727-747.
3. Harnly, J.M.; Bhagwat, S.; Lin, L.Z. Profiling methods for the determination of phenolic compounds in foods and dietary supplements. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2007**, *389*, 47-61.
4. Cheynier, V. Polyphenols in foods are more complex than often thought. *American Journal of Clinical Nutrition* **2005**, *81*, 223S-229S.
5. Pietta, P.; Minoggio, M.; Bramati, L.; Simonetti, P. Polyphenol pattern and antioxidant activity of different tomato lines and cultivars. *Annals of Nutrition and Metabolism* **2003**, *47*, 64-69.
6. Kondratyuk, T.P.; Pezzuto, J.M. Natural product polyphenols of relevance to human health. *Pharmaceutical Biology* **2004**, *42*, 46-63.
7. Yao, L.H.; Jiang, Y.M.; Shi, J. Flavonoids in food and their health benefits. *Plant Foods for Human Nutrition* **2004**, *59*, 113-122.

8. D'Archivio, M.; Filesi, C.; Vari, R. Bioavailability of the Polyphenols: Status and Controversies. *International Journal of Molecular Sciences* **2010**, *11*, 1321-1342.
9. Dang, S.S.; Wang X.F.; Zhai, S. R. Review of the pharmacological action and mechanism of caffeic acid phenethyl ester. *International Journal of Infectious Diseases* **2010**, *14*, S94.
10. Hirose, M.; Takesada, Y.; Tanaka, H.; Tamano, S.; Kato T.; Shirai, T. Carcinogenicity of antioxidants BHA, caffeic acid, sesamol, 4-methoxyphenol and catechol at low doses, either alone or in combination, and modulation of their effects in a rat medium-term multi-organ carcinogenesis model. *Carcinogenesis* **1997**, *19*, 207-212.



BLOQUE EXPERIMENTAL IV

**FASES SENSORAS NANOESTRUCTURADAS BASADAS
EN FTALOCIANINAS DE HIERRO (FePc) PARA LA
DETERMINACIÓN ÓPTICA DE NO₂**

BIV. FASES SENSORAS NANOESTRUCTURADAS BASADAS EN FTALOCIANINAS DE HIERRO (FePc) PARA LA DETERMINACIÓN ÓPTICA DE NO₂

BIV.1. Importancia en la detección de NO₂

Cada día son más los organismos tanto públicos como privados que se preocupan por la protección del medio ambiente y, día a día, aparecen nuevas directrices y resoluciones sobre cómo controlar o cómo evaluar la contaminación ambiental. La nueva legislación relativa a la calidad del aire ambiente y a una atmósfera más limpia en Europa (Directiva 2008/50 CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 21 de mayo de 2008) supone un incremento en el control de parámetros químicos y, a la vez, una disminución de los valores límite que tienen que ser detectados. Ello conlleva la puesta en práctica de nuevas medidas de detección y control de contaminantes en la atmósfera en términos de polución urbana, regional y global, y en consecuencia la necesidad de disponer de nuevas herramientas analíticas más potentes y/o versátiles para el control de la calidad del aire tanto en recintos cerrados como zonas más o menos abiertas^{1,2}.

Los óxidos de nitrógeno (NO_x) conforman un grupo de gases constituidos por nitrógeno y oxígeno, siendo los más comunes el óxido nítrico (NO) y el dióxido de nitrógeno (NO₂). Son gases incoloros con cierta tonalidad marrón que pasan a rojizos a temperaturas superiores a 21 °C. Los óxidos nitrogenados se liberan en el aire desde los tubos de escape de los automóviles, o cuando se quema carbón, petróleo, madera o gas natural. Cuando los óxidos nitrogenados se combinan con compuestos orgánicos volátiles, forman ozono lo que contribuye considerablemente a la formación del *smog* fotoquímico³⁻⁵.

La reacción del NO₂ con sustancias químicas producidas por la luz solar conlleva a la formación de ácido nítrico, el principal constituyente de la lluvia ácida. Respirar altos niveles de óxido de nitrógeno provoca la aparición de quemaduras, espasmos y dilatación de los tejidos en las vías respiratorias, reduciendo la oxigenación, produciendo acumulación de líquido en los pulmones y eventualmente la muerte⁶. Junto con ello, el NO₂ es un gas indicativo de la aparición de un incendio ya que su concentración incrementa considerablemente en los primeros instantes de una combustión, siendo, por tanto, un compuesto químico a determinar en la nueva generación de alarmas anti-incendios⁷.

Desde los años 90, la Unión Europea está intentando regular la emisión de contaminantes a la atmósfera. Así, la Directiva del Consejo 96/62/CE de 27 de septiembre de 1996 sobre evaluación y gestión de la calidad del aire ambiente, exige a la Comisión que presente propuestas de regulación de los contaminantes que figuran en el anexo I de dicha directiva y en el que se encuentra el NO₂, estableciéndose los umbrales superior e inferior de evaluación de esta molécula en el Art. 5 y Anexo II (ver Tabla BIV. 1)

Tabla BIV. 1. Valores umbrales superiores e inferiores de evaluación de NO₂ recogidos en la Directiva Europea 2008/50/CE, Anexo II, A.

	Valor límite horario para la protección de la salud humana	Valor límite anual para la protección de la salud humana	Nivel crítico anual para la protección de la vegetación y los ecosistemas naturales
Umbral superior de evaluación	70 % del valor límite (140 µg m ⁻³ , que no podrá superarse más de 18 veces por año civil)	80 % del valor límite (32 µg m ⁻³)	80 % del nivel crítico (24 µg m ⁻³)
Umbral inferior de evaluación	50 % del valor límite (100 µg m ⁻³ , que no podrá superarse más de 18 veces por año civil)	65 % del valor límite (26 µg m ⁻³)	65 % del nivel crítico (19,5 µg m ⁻³)

En lo relativo a la Gestión de la Calidad del Aire Ambiente (Capítulo III, Art. 13), el Anexo XI define los valores límite y umbral de alerta para la protección de la salud humana así como la fecha en la que debe alcanzarse (ver Tabla BIV. 2)

Tabla BIV. 2. Valores límite para la protección de la salud humana de NO₂ recogidos en la Directiva Europea 2008/50/CE, Anexo XI.

	Período medio	Valor límite	Fecha en la que debe alcanzarse
NO ₂	1 hora	200 µg/m ³ , que no podrá superarse más de 18 veces por año civil	1 de enero de 2010
	Año civil	40 µg/m ³	1 de enero de 2010

También, esta Directiva regula el nivel umbral de alerta para el NO₂ en 400 µg m⁻³ e indica que deberán medirse durante 3 horas consecutivas en lugares representativos de la calidad del aire en un área de al menos 100 km² o en una zona o aglomeración entera, si esta última superficie es menor.

BIV.2. Ftalocianinas de hierro (FePc). Generalidades y propiedades ópticas

Las ftalocianinas (Pc) son compuestos macrocíclicos aromáticos conjugados (con 18 electrones- π), que están muy relacionados estructuralmente con las porfirinas biológicas (véase la Fig. BIV. 1).

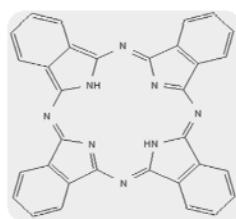


Fig. BIV. 1. Estructura molecular de una ftalocianina

Al igual que las porfirinas, las Pc pueden coordinar en el centro de su estructura a más de 70 iones metálicos para dar lugar a las metalo-ftalocianinas (MPc). Desde su descubrimiento, hace más de 70 años, las Pc y sus derivados han sido extensivamente usados como colorantes o pigmentos. En la actualidad, estos compuestos están siendo usados en campos muy diversos como es la generación de materiales fotoconductores⁸, como catalizadores industriales^{9, 10} o en el diseño de sensores^{11, 12}. En este último campo, la generación de membranas sensoras basadas en la inmovilización de MPc utilizando como metales Cu y Zn, fundamentalmente, ha sido ampliamente descrita para llevar a cabo la detección óptica de una gran variedad de moléculas^{13, 14}. Estas MPc (y en general, todas aquellas formadas con cationes metálicos divalentes) son capaces de coordinar ligandos de muy diferente naturaleza (que contengan O o N como átomos donores) gracias a las dos posiciones axiales vacantes con las que cuentan, produciéndose un cambio en las propiedades ópticas de los complejos, permitiendo así la monitorización del ligando en cuestión. Las MPc basadas en estos dos metales de transición han sido ampliamente utilizadas, entre otras cosas, por la facilidad de disolución que presentan en multitud de disolventes orgánico. No ocurre esto, sin embargo, con metales como el hierro; dando lugar a MPc prácticamente insolubles en cualquier disolvente. Sin embargo, el uso de este elemento, como metal de transición de bajo coste y reducido impacto ambiental, hace que su uso para la generación de *ftalocianinas de hierro (FePc)* y por tanto, para la generación de membranas sensoras basadas en estos complejos, sea un reto investigador que puede ofrecer importantes avances en la generación de este tipos de fases sensoras.

Para poder incorporar las especies FePc en una fase sólida, estas tienen que estar completamente solubilizadas. Una forma de solubilización, que ha sido ampliamente utilizada y descrita en literatura, conlleva la formación de complejos hexacoordinados por adición de ligandos axiales N-donores. Como ya se ha

explicado con anterioridad, la habilidad de las MPc (con M²⁺) para coordinar ligandos adicionales o moléculas de disolvente que contengan nitrógeno u oxígeno como átomos donores es bien conocida; en general, estos ligandos se coordinan por encima y por debajo del plano definido por el macrociclo¹⁵.

Esta interacción produce un cambio en las *propiedades ópticas de la FePc*. En general, el espectro de absorción UV-Vis de las Pc presenta una banda intensa en la zona del rojo, llamada **banda Q**, que se corresponde con la transición π - π^* menos energética de los ligandos de la propia Pc. Se ha demostrado que los orbitales ocupados de más alta energía, son orbitales de tipo macrocíclico y no orbitales de tipo metálico¹⁶. Por tanto, el origen de la banda Q debe ser una transición entre los orbitales a_{1u} y e_g^* del anillo macrocíclico (ver Fig. BIV. 2).

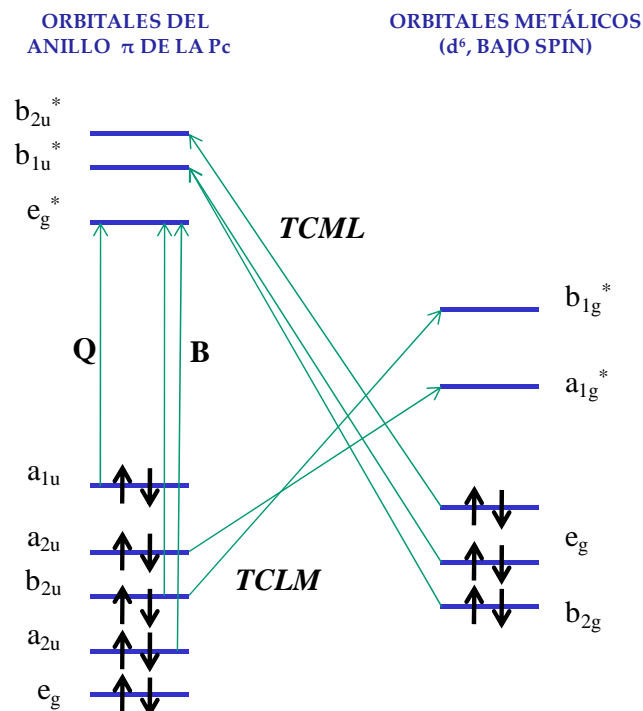


Fig. BIV. 2. Origen de las bandas Q y B y posibles direcciones para las transiciones de transferencia de carga (TC) entre el metal central y el anillo de Pc

La segunda transición de más baja energía, la llamada **banda B**, aparece en la zona del UV y tiene su origen en una superposición de varias bandas de absorción. Las MPc muestran, además, bandas de transferencia de carga (TC), que pueden ser debidas a transferencias de carga metal-ligando (TCML) o a transferencias de carga ligando-metal (TCLM). Debido a que estas TC pueden implicar a diversos orbitales del anillo de la Pc, existen una gran variedad de nuevas posibles transiciones π - π^* (ver Fig. BIV. 2).

En la Fig. BIV. 2 el diagrama energético ha sido construido utilizando las posibles transiciones permitidas por las reglas de simetría para una FePc (Fe, metal d^6 de bajo spin). Debido a que las transiciones para TCML terminan en orbitales b_{1u}^* y b_{2u}^* , es de esperar que estas bandas aparezcan a mayores energías (menores λ) que la banda Q; mientras que para las TCLM, las energías de estas transiciones se solapan y modifican dicha banda. De hecho, esta banda Q estará muy influenciada tanto por el metal central como por los ligandos axiales. En las FePc hay una retrodonación de electrones- π desde los orbitales d del metal a los orbitales π^* del macrociclo¹⁷; la energía de las transiciones π - π^* , y por tanto de la banda Q, estarán fuertemente influenciadas por esta retrodonación. La introducción de ligandos axiales modifica la retrodonación π hacia el macrociclo y como consecuencia, la energía de las transiciones π - π^* se ve muy afectada. De hecho, en el caso de FePc, se ha observado que la banda Q experimenta desplazamientos batocrómicos cuando se incrementa la fuerza electrón-dador de los sustituyentes, mientras que si los ligandos axiales tienen un carácter electrón-atrayente, se produce una disminución en la λ de la banda. En la Fig. BIV. 3 se puede observar un espectro típico de absorción UV-Vis de una FePc disuelta en piridina (que a su vez se coordina axialmente con la FePc) y en la que se observa la aparición de la banda Q con un máximo en torno a 690 nm.

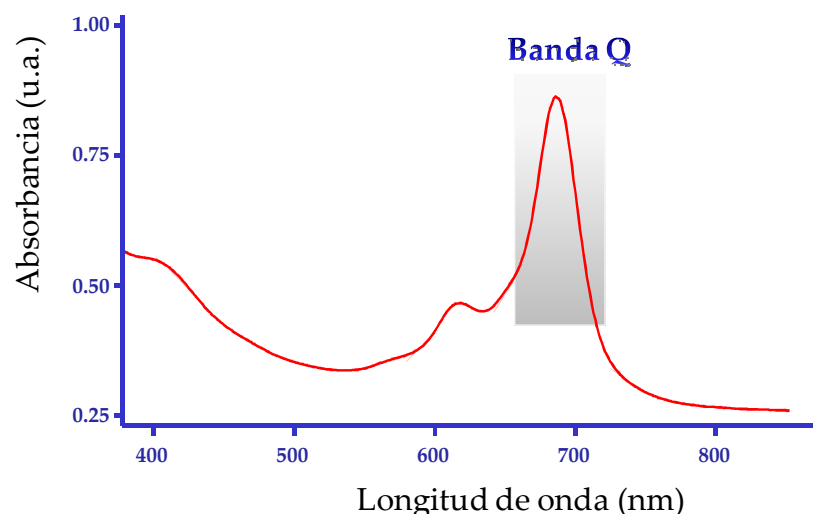


Fig. BIV. 3. Espectro de absorción UV-Vis de una FePc disuelta en piridina

BIV.3. Generación de las membranas sensoras

Para llevar a cabo la generación de las membranas sensoras se usará como soporte sólido el material AP200/19 (soporte nanoestructurado de óxido-hidróxido de Aluminio que presenta nanoporos de 19 nm de diámetro y un volumen total de poros de 20 ml m⁻²) que ya fue descrito en la sección 1 del apartado NANOTECNOLOGÍA Y CIENCIA DE LOS MATERIALES APLICADAS AL DESARROLLO DE FASES SENSORAS ÓPTICAS Y NUEVOS MATERIALES.

Para depositar las FePc en las membranas de óxidos metálicos nanoestructurados, lo que se pretende es introducir el complejo en los nanoporos del material. Para ello se preparará un cóctel que contendrá tanto la FePc, como el ligando (amina o amina + fosfito orgánico, dependiendo del caso) y el disolvente adecuado (THF). Este cóctel se depositará por spin-coating sobre la membrana nanoestructurada AP200/19. La Fig. BIV. 4 muestra el esquema de fabricación de las fases sensoras.

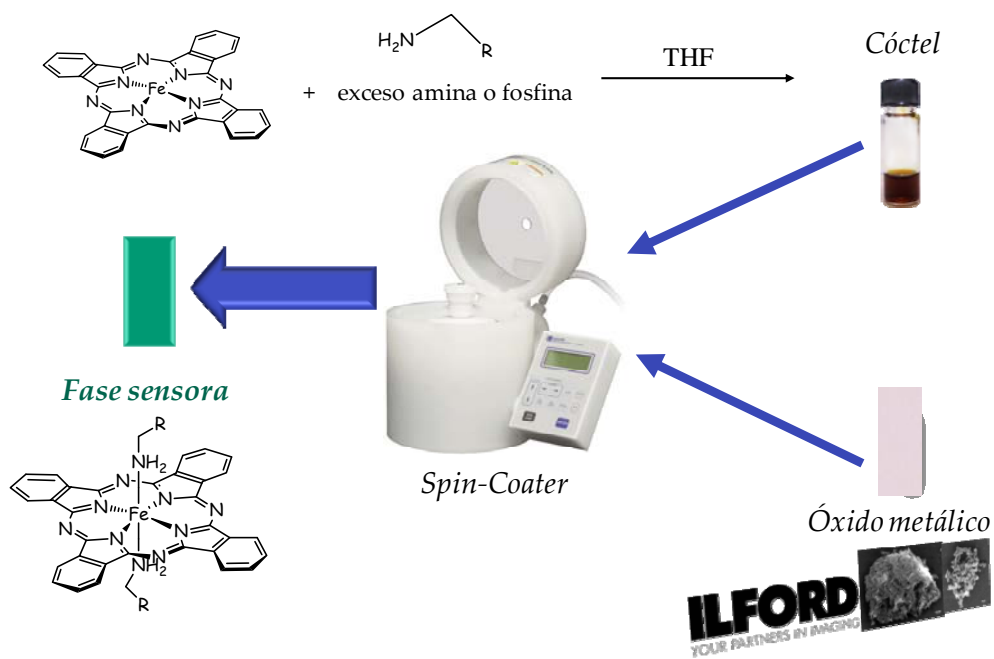


Fig. BIV. 4. Esquema de fabricación de las fases sensoras

La Fig. BIV. 5 muestra cómo se produce la inclusión del luminóforo en los poros del material.

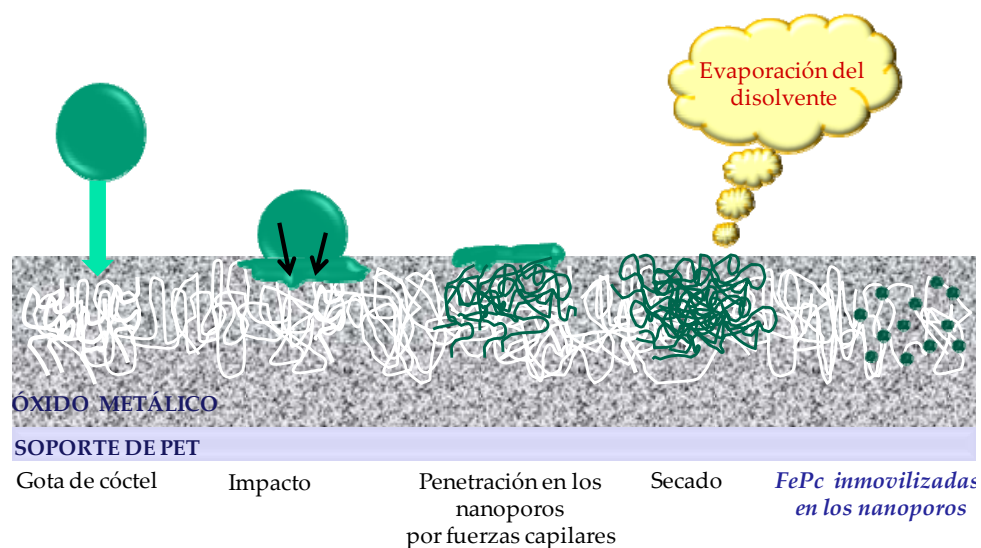


Fig. BIV. 5. Principio de incorporación de reactivos ópticamente activos en la nanoestructura

BIV.4. Sistema de medida

El mecanismo para poder detectar NO₂ con estas membranas sensoras está basado en el intercambio de una amina (NR₃) coordinada axialmente a la FePc, por una molécula de NO₂ que es una especie π -electrón atrayente. Este intercambio producirá una disminución en la intensidad de la banda Q, que puede ser correlacionada con la concentración de especie gaseosa. En la Fig. BIV. 6 se puede ver un esquema del intercambio molecular entre FePc(NR₃) y NO₂ y los cambios en el espectro de absorción a los que da lugar.

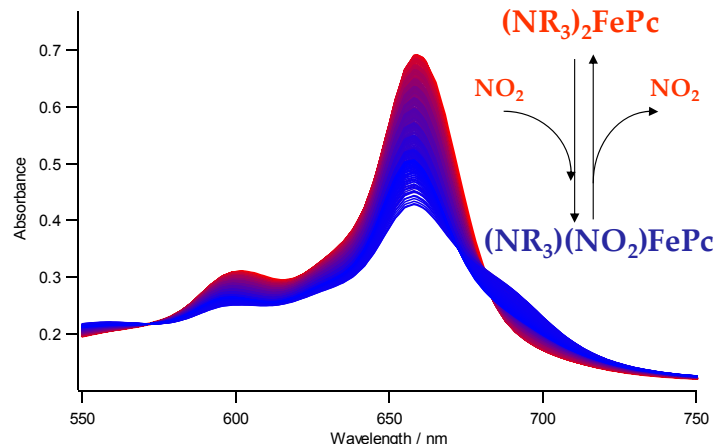


Fig. BIV. 6. Cambio del espectro de absorbancia de una membrana de FePc(NR₃)₂ inmovilizada en AlOOH antes y después de la exposición a NO₂

Para poder llevar a cabo estas medidas se usará una estación de gases (ver Fig. BIV. 7) que cuenta con 4 controladores de flujo másico controlados por un Software basado en Labview, que permite controlar de forma automatizada la humedad, el flujo y la concentración de NO₂, así como cualquier interferente gaseoso que se desee ensayar.

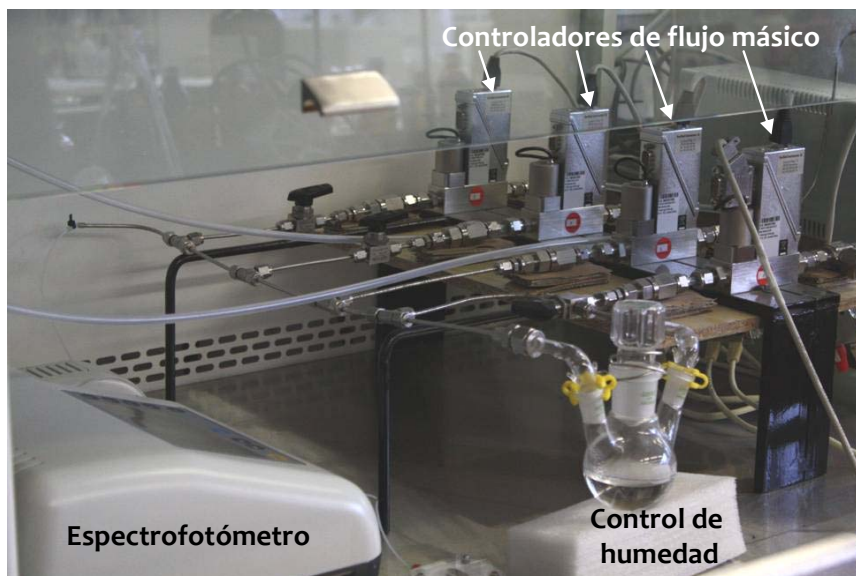


Fig. BIV. 7. Fotografía de la estación de gases

El cambio óptico de las fases sensoras basadas en $\text{FePc}(\text{NR}_3)$ es un cambio de color, es decir, un cambio en su espectro de absorción. Por tanto, la medida analítica se va a llevar a cabo con un espectrofotómetro equipado con una celda de medida especialmente diseñada para la implementación de las fases sensoras ópticas.

Este espectrofotómetro está equipado con un detector PDA y permite registrar un espectro de emisión completo (300 a 900 nm) en 10 ms. Además está controlado, mediante puerto RS232, por el mismo software que la estación de gases, de forma que se puede automatizar la recogida de espectros en los diferentes ambientes que se generen en la celda de medida, informando de cómo varía el espectro de absorbancia con el tiempo (ver Fig. BIV. 6).

De toda esta información y haciendo uso de macros generadas en Igor Pro, se puede conseguir extraer como varía la absorbancia a una determinada longitud de onda, normalmente máximo de absorción, en función del tiempo para un determinado flujo, humedad y concentración de gases (véase la Fig. BIV. 8). Como portador se usa aire sintético.

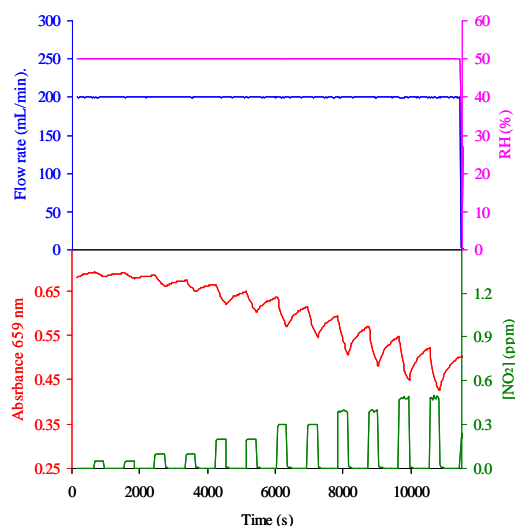


Fig. BIV. 8. Graficas obtenidas con el Igor Pro tras el tratamiento de la información obtenida con el espectrofotómetro y el programa de Labview de control de la estación de gases.

BIV.5. Objetivos del bloque IV

Los principales objetivos de este bloque experimental son:

1. Hacer una revisión de la investigación que ha sido desarrollada, durante los últimos años, por nuestro grupo de investigación en el desarrollo de fases sensoras basadas en la deposición de ftalocianinas de hierro (FePc) sobre soportes nanoestructurados de óxidos metálicos, para la detección óptica de NO₂ y CO.
2. Sintetizar nuevas FePc modificando la naturaleza de los ligandos que pueden unir para dar lugar a nuevos complejos octaédricos. Mediante la colaboración con el Departamento de Química de la Universidad de Almería, caracterizar estructuralmente las nuevas FePc sintetizadas por RMN multinuclear (¹H, ¹³C, ¹⁵N, ³¹P, ⁵⁷Fe). Llevar a cabo la deposición de estos nuevos complejos sobre nanoestructuras de óxidos metálicos y evaluarlos como fases sensoras para la detección óptica de NO₂. Finalmente se llevará a cabo un estudio de

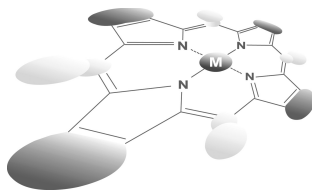
estabilidad térmica y temporal de las membranas generadas para evaluar las mejoras en cuanto a estabilidad conseguidas frente a aquellas sintetizadas previamente por nuestro grupo de investigación.

BIV.6. Capítulos del bloque IV

En este bloque experimental se han llevado a cabo los siguientes capítulos:

Capítulo 6: Iron-phthalocyanines complexes immobilized in nanostructured metal oxide as optical sensors of NO_x and CO: NMR and photophysical studies. *J. Porphyrins Phthalocyanines* 13 (2009) 616-623.

Capítulo 7: Octahedral iron (II) phthalocyanines complexes: multinuclear NMR and relevance as NO₂ chemical sensors. *Dalton Trans.* 39 (2010) 6231-6238.



Iron-phthalocyanine complexes immobilized in nanostructured metal oxide as optical sensors of NO_x and CO: NMR and photophysical studies

Angel Valero-Navarro^a, Jorge F. Fernandez-Sanchez^{*a,b}, Antonio Segura-Carretero^a, Ursula E. Spichiger-Keller^b, Alberto Fernandez-Gutierrez^{*a}, Pascual Oña^c and Ignacio Fernandez^{*c}

^a Department of Analytical Chemistry, Faculty of Sciences, University of Granada, C/Fuentenueva s/n, E-18071 Granada, Spain

^b Centre for Chemical Sensors. Swiss Federal Institute of Technology (ETH-Z), Technoparkstrasse 1, 8005 Zurich, Switzerland

^c Department of Organic Chemistry, University of Almeria, Carretera de Sacramento s/n, E-04120 Almería, Spain

Received 9 September 2008

Accepted 10 October 2008

ABSTRACT: This paper presents the research that is currently undergoing in our group toward the development of optical sensing layers based on iron(II) phthalocyanine complexes immobilized on nanostructured solid supports. Several FePc-N donor ligands have been prepared and coated into different nanostructured metal oxides. Optical properties, chemical variables, analytical features, selectivity rates, response times and type of nanostructure supports have been evaluated; in some cases, interesting correlations between them have been deduced. In addition, thermostability studies have been carried out, providing access to a second generation of nanostructured metal oxides.

KEYWORDS: iron(II) phthalocyanine, N-donor ligand, nanostructure metal oxide, optical sensor, NO₂, CO.

INTRODUCTION

Over the last hundred of years industrial expansion has led to unprecedented environmental damage due to pollution. Nitrogen oxides (NO_x) and CO are amongst the most toxic gaseous pollutants. NO is oxidized in the atmosphere to NO₂, one of the major causes of outdoor air pollution which directly affects human health. Also, NO₂ concentrations rise immediately when there is a fire, and the concentrations do not depend on the type of material being burnt [1]. Therefore, NO₂ is an early indicator of the heat produced by fire and its detection would be much more efficient than when it is noticed

by other techniques used in commercially available fire alarms. False alarms can also be reduced since smoke and ammonia can be readily differentiated from NO₂, the concentration of which rapidly increases with increasing heat [1]. In addition, among other processes, CO is produced by the incomplete combustion of wood or hydrocarbon products [2]. It is in fact a byproduct in almost all combustion processes. CO causes tissue hypoxia by displacing oxygen from carboxyhemoglobin, inhibiting the transfer of oxygen in organisms. The diagnosis of CO poisoning is difficult because the initial symptoms tend to be very vague and may progress rapidly to coma and death [2]. It has been found that the concentration of CO in breath increases upon poisoning with this gas [3]. Therefore, the availability of a rapid, cheap, and non-invasive diagnostic test for abnormal CO exposure in hospital emergency departments may enable the quick detection of CO poisoning and thus prevent casualties.

*Correspondence to: Jorge F. Fernández-Sánchez, email: jffernan@ugr.es, tel: +34 958243296, fax: +34 958249510; Alberto Fernández-Gutiérrez, email: albertof@ugr.es, tel: +34 958243297, fax: +34 958249510 and Ignacio Fernandez, email: ifernan@ual.es

Chemical sensors, especially optical sensors, are an elegant alternative to traditional analytical instruments and semiconductor sensors. Gas-selective chemical sensors allow the detection of different gaseous species by their selective chemical interaction, frequently with an organometallic complex (OMC) [4]. The chemical interaction between the specific gas molecule and the selective indicator compound are detected by a change in the optical absorption or emission spectrum. From transmission measurements in the visible region of the electromagnetic spectrum, it is thought that appropriate conjugated π -systems similar to currently available macrocycles may be useful as gas-sensing platforms. Typical representatives of this class of compounds are phthalocyanines (Pcs). Thus, the exploitation of free and metal-containing phthalocyanines (Pc and MPc) as well as porphyrins, as chemically interactive material in chemical sensors, has become the subject of an enormous research effort [5].

To integrate FePc species into a solid phase, it has to be solubilized; one approach that has been widely reported in the literature involves the formation of six-fold coordinated complexes by the addition of N-donor axial ligands. The ability of metal(II) Pcs to coordinate additional ligands or solvent molecules containing nitrogen or oxygen donor atoms is well known; in general, the ligands are attached above and below the plane of the macrocycle [6].

The spectrum of the iron(II) phthalocyanine itself [Fe(Pc)] shows an absorption maximum, λ_{max} , at the Q band which corresponds to the lowest energetic π - π^* ligand transition [7]. In addition, it is known that in metallophthalocyanines there is a π back donation of electron from the metal d orbitals to the macrocycle ligand π^* orbitals. The π - π^* transition energy and therefore the Q band, is strongly influenced by this π -back donation. The introduction of axial ligands modifies this π -back donation to the macrocycle and therefore the π - π^* transition energy is therefore affected. In fact, it was found that the spectrum of the Q band shows a bathochromic shift, with increasing donor strength of the substituents. Thus the position of λ_{max} is dependent on the donor and acceptor strength of the ligands. So, in the presence of strongly coordinating solvents or ligands such as pyridine, λ_{max} for the Q band is observed in the range of 650–670 nm. This absorption band is attributed to the 2:1 complex (FePc(N-Donor ligand)₂). In addition, a shoulder appears around 690 nm which is attributed to the 1:1 complex (FePc(N-Donor ligand)), and a third band around 560 nm indicates the formation of the phthalocyanine radical cation [8].

In order to develop NO₂ and CO-sensing layers based on Fe(II)Pcs, several gas-permeable supports and a variety of techniques have been used [8]. One very promising approach is to use porous material specified by a large specific surface area [9]. Nanoporous metal oxides are characterized by a well-controlled nanoporous structure (pores are in the range of 10 to 50 nanometers of diameter) and they show extremely high specific porosity and

surface area due to their characteristics of nano-sized crystallites or particles [9]. There has been a lot of emphasis on nanostructured metal oxides as gas-sensing materials [10], since grain-size reduction and gas-diffusion control have proven to be useful for improving gas-sensing properties [11]. Nanoparticulate metal oxides have controllable nanoporous structures, which along with their characteristic size and extremely high specific areas, make them useful for sensing applications. Furthermore, it is now generally recognized that the nanoscale control of metal oxide surface morphologies allows for significant enhancement of gas-sensing properties [9].

Attending to this information, our research group has proposed the use of N-donor ligand-Fe(II)Pcs complexes immobilized in nanostructure metal oxides (AlOOH and SiO₂, among others) as NO₂ and CO sensing layers. We have characterized these complexes in solution and solid state by NMR and X-ray, respectively, and the solid sensing films have been evaluated by spectrophotometry. In addition, we have established the recognition mechanism, have pointed out the dependence of the sensing layer with the temperature, and have proposed new materials to increase their resistance. Finally, we would like to shed light on the work we are carrying out towards increasing the analytical features of these sensing layers, expanding their applicability in real applications.

DISCUSSION

The aim of this paper is to resume the research that the authors have developed during the last five years on the development of NO₂-sensing layer with optical recognition. Therefore, all the information presented in this paper has been previously published in references 9, 12–17, which can be consulted for the details about materials and experiences.

Optical properties of FePc-N donor ligand sensing films and recognition mechanism

As mentioned in the introduction, a stable solution of the FePc can only be achieved by ligands that solubilize the metal complex within the solid support. We have evaluated eleven different N-donor ligands (see Table 1). All of the formed FePc-N donor ligand complexes provide similar optical properties. Figure 1 shows the typical absorption spectra of these complexes as well as the changes provided when they are exposed to NO₂ or CO. The FePc-N donor ligand presents a Q band between 652 and 664 nm which is reduced in intensity when the sensing film is exposed to NO₂ or CO, whereas a shoulder at 690 nm indicates that apparently just one ligand is coordinated to the metal center [8].

According to these results we have proposed a recognition mechanism which is based on the ligand exchange of one of the amines (NR₃) by a σ donor and π -electron acceptor such as NO₂ and/or CO [12], producing

Table 1. Amines^a tested as ligands for FePc. Results of experiments where the non-chemically modified AIOOH film was exposed to ^{*}200 ppb NO₂ and [†]50 ppm CO for 300 s at 50% RH and at a flow-rate of 200 mL/min. ($\Delta A/A_0$ is the relative change in absorbance). Fernández-Sánchez JF et al., *Second Generation Nanostructured Metal Oxide Matrices to Increase the Thermal Stability of CO and NO₂ Sensing Layers Based on Iron(II) Phthalocyanine*. *Adv. Funct. Mater.* 2007; **113**: 630. Copyright Wiley-VCH Verlag GmbH & Co.KGaA. Reproduced with permission

Amine	Comments	λ_{\max}	$\Delta A/A_0^*$	$\Delta A/A_0^\dagger$
DBA	Co-ordinates badly with FePc, probably sterically hindered	—	—	—
DA	Sensitive, reversible	659 nm	7%	7%
pDA	Irreversible	664 nm	1%	1%
DOA	Reversible, low A ₀	652 nm	2%	1%
BEHA	Co-ordinates badly with FePc, probably sterically hindered	—	—	—
BA	Sensitive, mostly reversible	662	4%	3%
PRLD	No response with NO ₂ and CO	662	0%	0%
PRL	Co-ordinates badly with FePc, probably sterically hindered	—	—	—
IMD	Irreversible	662	1%	1%
PRLN	No response with NO ₂ and CO	661	0%	0%
IND	Co-ordinates badly with FePc, probably sterically hindered	—	—	—

^a Dibenzylamine (DBA), decylamine (DA), *para*-decylaniline (pDA), dioctylamine (DOA), *bis*-(2-ethyl hexyl)-amine (BEHA), benzylamine (BA), pyrrolidine (PRLD), pyrrole (PRL), imidazole (IMD), 3-pyrroline (PRLN) and indole (IND).

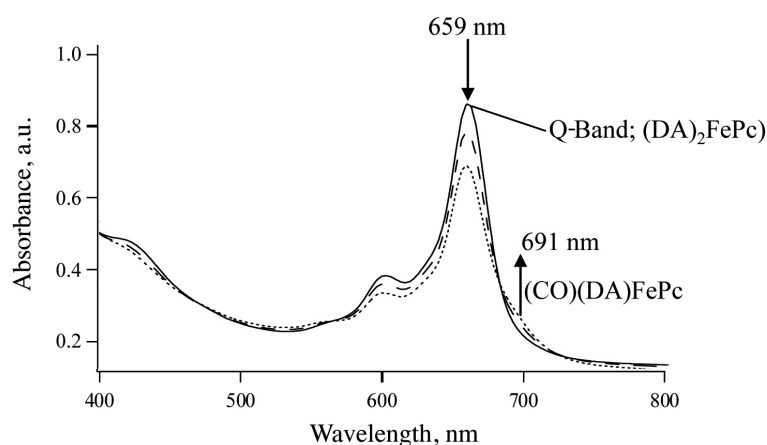


Fig. 1. Spectra of the optical sensing layer based on a FePc(DA)₂ in AIOOH positively charged membrane at the initial state (— solid line; before NO₂ or CO exposure), after exposure to 50 ppm (---, dash line) and to 100 ppm (···, dotted line) of CO for 300 s in air of 50% relative humidity. Fernández-Sánchez JF et al., *Second Generation Nanostructured Metal Oxide Matrices to Increase the Thermal Stability of CO and NO₂ Sensing Layers Based on Iron(II) Phthalocyanine*. *Adv. Funct. Mater.* 2007; **113**: 630. Copyright Wiley-VCH Verlag GmbH & Co.KGaA. Reproduced with permission

a decrease in the absorbance of the Q band [13]. The results show that NO₂ and CO induce the Q band at 659 nm to decrease in intensity (concentration of the 2:1 complex in the film decreases), whereas the shoulder at 690 nm becomes more prominent and indicates that only one N-donor-ligand is coordinated to the metal center (increase in the concentration of the 1:1 complex). The spectral changes shown in Figure 1 indicate that the 18-electron coordinatively saturated FePc(DA)₂ complex can lose an amine ligand, presumably *via* a dissociative mechanism in which the NO₂ or CO molecule occupies the vacant coordination position [13]. The two isobestic

points at $\lambda \sim 570$ nm and $\lambda \sim 680$ nm show that no side reactions additional to this ligand exchange are involved. The proposed mechanism has been confirmed by NMR [12] (see Figure 2).

Effect of chemical variables

Several chemical variables which affect the sensing response have been evaluated, such as type and concentration of the N-donor ligand, concentration of FePc, and sort of nanoporous solid support.

To evaluate the N-donor ligand effect the films prepared were characterized by measuring the relative change in absorbance at λ_{\max} (see Table 1) and by NMR measurements at room temperature [14]. The experimental results show that DBA, BEHA, PRL and IND coordinate badly to FePc, probably due to sterical hindrance; the secondary amines DOA, PRLD and

PRLN provide films which do not respond at all to NO₂ or CO, or with very low sensitivity (low A₀ and $\Delta A/A_0 < 1\%$); the aromatic amines pDA and IMD were able to dissolve the metal complex and seem to be coordinated to the metal center in a stable molar ratio ($\lambda_{\max} = 662\text{--}664$ nm) but provide sensing films which do not respond reversibly to NO₂; and, only the primary amines DA and BA provide reversible and sensitive sensing films for both NO₂ and CO gas. This study concluded that the most favorable N-donor ligands to enable a reversible ligand exchange between the amine and a gas molecule at the metal center are primary amines directly attached to sp³ carbons, selecting decylamine as the preferable amine for

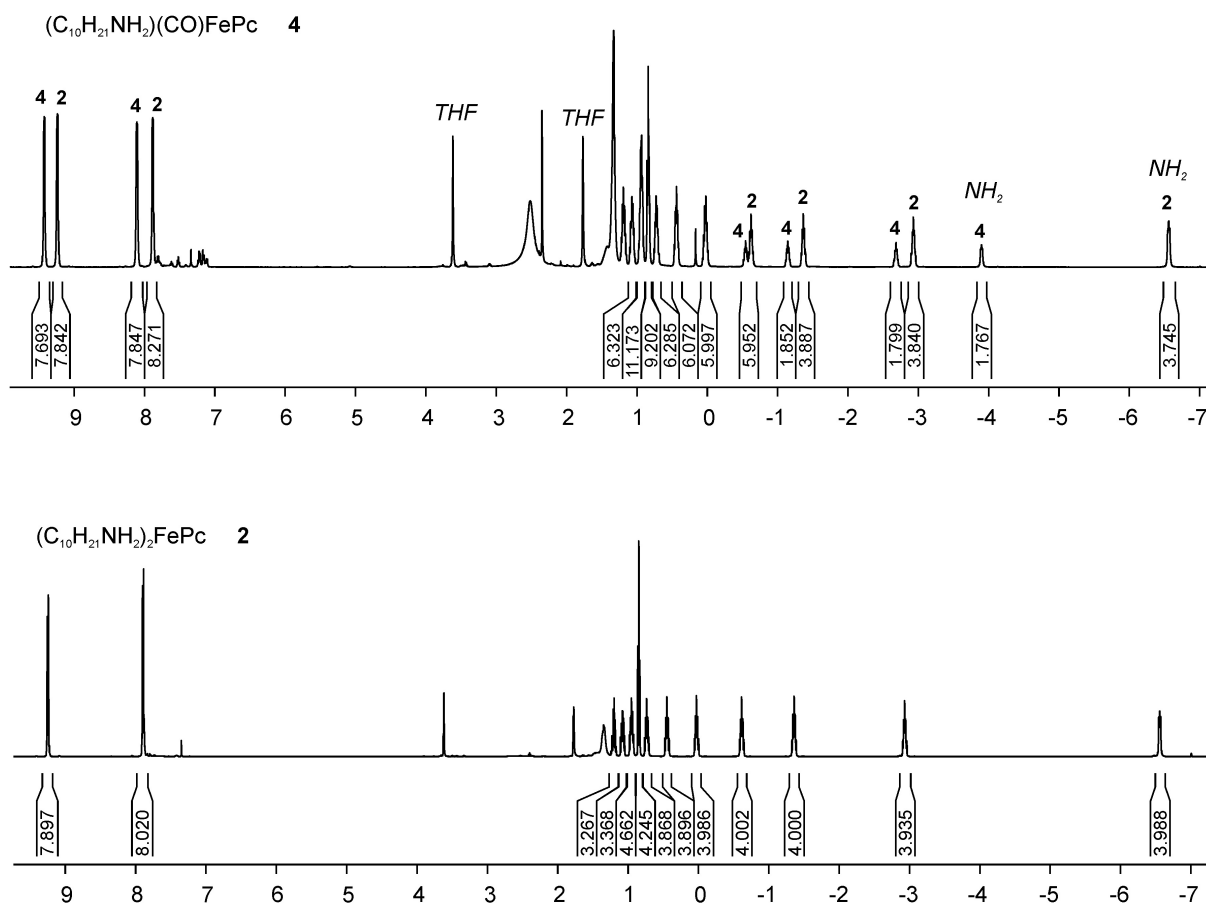


Fig. 2. ^1H NMR spectrum of the mixture of $\text{FePc}(\text{decylamine})_2$ **2** and $\text{FePc}(\text{decylamine})(\text{CO})$, **4** (top), prepared by treating an NMR sample of **2** in the NMR tube with CO (3 bars). The spectrum of pure **2** (bottom) is also shown. (500.23 MHz, 298 K in $\text{THF}-d_8$ solution). *Fernández I et al., Solution NMR and X-Ray Structural Studies on Phthalocyaninatoiron Complexes. Helv. Chim. Acta 2006; 89: 1485.* Copyright Wiley-VCH Verlag GmbH & Co.KGaa. Reproduced with permission

the FePc-complex. This commercially available reagent provides the best sensitivity achieved and also produces reversibility of the reaction with both NO_2 and CO.

The effect of the concentration of DA has also been tested. An increase in the DA concentration produced an increase in the sensing response (A_0-A_x at 659 nm) up to $10 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, between 10 and $15 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ it remains constant upon exposure to 200 ppb NO_2 . At higher concentrations than $15 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, A_0-A_x starts to decrease. Concentrations of the N-donor ligand higher than $15 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ obviously limit the accessibility of NO_2 to the metal center and inhibit the exchange of one axial ligand to NO_2 . Therefore a molar ratio of 30:1 DA relative to FePc was selected as optimum value.

Another important parameter to keep in mind is the concentration of FePc. Figure 3 shows that an increase in the FePc concentration provides an increase in A_0-A_x up to $1.5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. Higher FePc concentrations produce, first, a plateau and then a decrease in A_0-A_x . It is worth mentioning that the absolute absorbance (A_0) increases suddenly (slope of $0.48 \text{ mL}\cdot\text{mg}^{-1}$) up to a concentration of $1.5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ (see Figure 3b). In this concentration range, the increase in absorbance goes along with an increase in sensitivity. Nevertheless, a further increase in the amount of metal complex

added onto the nanoporous substrate does not provide a proportional increase in the A_0-A_x . This phenomenon cannot be attributed to aggregation FePc-complexes because the absorption spectra of the sensing films did not change when the concentration was increased. Therefore, it was ascribed to the incorporation of the organometallic complex in two different environments which obviously influence its absorption coefficient while the electromagnetic spectrum is not modified. This phenomenon was supposed to be due to the two different types of pores of nano and macro sizes in the nanostructured AlOOH membrane and it was later confirmed when using other sensing films [15].

To evaluate the effect of the nanoporosity of membranes, several nanostructure solid supports were investigated (see Table 2). Thus, the effect of the kind of oxide, the sign of the charge, the total pore volume (TPV), the pore diameter (PD) and the polyvinyl alcohol (PVA) percentage were analyzed to obtain the best conditions. This study concluded that the kind of oxide, TPV, PD and percentage of PVA do not affect the sensor response. However, the sensitivity to the membranes based on positively charged substrates is completely different to that of the negatively charged ones, thus the substrate charge sign proves to be a critical parameter.

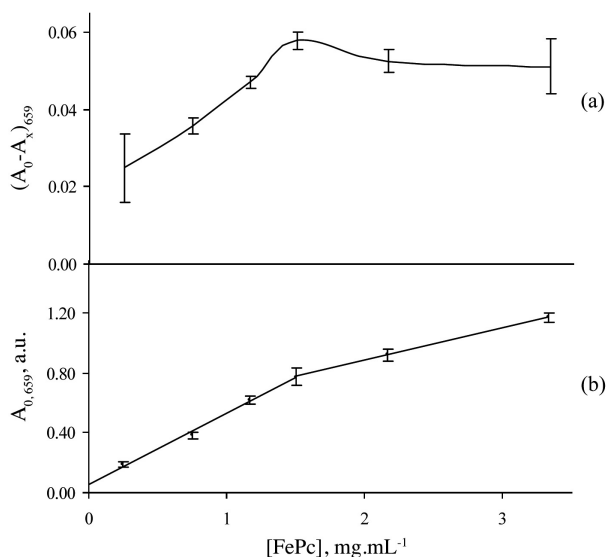


Fig. 3. Effect of the FePc concentration on the a) sensor response ($A_0 - A_x$; A_0 , absorbance before NO_2 exposure; A_x , Absorbance on exposure to 200 ppb NO_2) and b) the absorbance of the optical sensor in absence of NO_2 . [DA] = 12.5 mg.mL⁻¹, AP200/19 AIOOH membrane, $\lambda_{\text{max}} = 659$ nm, relative humidity 50% and flow rate 200 mL.min⁻¹. Fernández-Sánchez JF et al., *Novel Optical NO_2 -Selective Sensor Based on Phthalocyaninato-iron (II) Incorporated into a Nano structural Matrix*. *Sens. Actuators B*, 2006; **113/2**: 630–638. Copyright Elsevier. Reprinted with permission

Analytical performances

Positively charged nanoparticulate AIOOH films (TPV = 20 mL.m⁻²; PD = 19.2 nm) incorporating FePc (DA)₂ were studied as optimum sensing film between 0.05 and 0.4 ppm NO_2 (50% RH) as well as between 5 and 125 ppm CO (50% RH) at 659 nm. The regression equations obtained were $A = 0.0018 + 0.216 C$ for the varying partial pressure of NO_2 and $A = 0.0012 + 0.0006 C$ for CO. The correlation coefficients were > 0.99. The detection limits (LOD) for the NO_2 - and CO-sensitive films were 20 ppb and 15 ppm, respectively. These values are considerably lower than the lethal concentration level LC50 (1 h) (115 ppm for NO_2 and 3760 ppm of CO) and the proposed sensing layers also allow the determination of NO_2 and CO at levels lower than those acceptable at the workplace (TLV-TWA of 3 ppm for NO_2 and 25 ppm for CO).

On the other hand, the experimental data show the surprisingly high sensitivity of the nanostructured AIOOH matrix together with a considerably higher sensitivity of the sensing film when exposed to NO_2 than to CO.

In addition, the selectivity of the proposed sensing layer was established by a systematic study of the effect of interfering compounds (humidity, CO_2 , SO_2 and NO) which might occur together with NO_2 or CO. To our delight, no significant interferences were detected with these gases.

Referred with the selectivity of the sensing layers between NO_2 and CO, the tolerance level of CO in the determination of 200 ppb NO_2 was 5 ppm and the tolerance level of NO_2 in the determination of 50 ppm CO was estimated to be 20 ppb.

Lastly, the NO_2/CO -sensitive membranes discussed here show t_{95} -response times < 300 s from pure air 50% RH to 200 ppb NO_2 and 50 ppm CO, and < 500 s from 200 ppb $\text{NO}_2/50$ ppm CO to pure air 50% RH. This response time, 300 s (5 min), is relatively good compared with other sensing layers which have been published [4]; the usual response time for NO_2 -sensing layers is around 600 to 1200 s (10 to 20 min). In any case, future investigations must be focused on the reduction of response time.

In comparison with other state-of-the-art chemical sensors for determining NO_2 published in 2008 [16], the proposed sensing layer shows the best sensitivity because only one of it [16d] can detect 20 ppb NO_2 . On the other hand, the proposed NO_2 -sensitive layer shows longer response time and poor stability. This is due to the intrinsic properties of the kind of sensor: optical sensors show high sensitivity but larger response time and poor stability [4], and electrochemical sensors provide lower sensitivity but shorter response time and very high stability. Therefore, many efforts must be focused on increasing the stability and shortening the response time of optical sensing layers.

Thermostability and second generation of metal oxide supports

One of the most important requirements for NO_2 - or CO-sensing films is their stability at high temperatures [14].

Table 2. Nomenclature and composition for the tested nanoporous membranes and their sensor responses with 200 ppb of NO_2 . Reference 13. Copyright Elsevier. Reprinted with permission

Name	Oxide	Charge	Pore volume, mL.g ⁻¹	Coating weight, g.m ⁻²	Total pore volume, mL.m ⁻²	Pore diameter, nm	PVA ^a , %	$A_0 - A_x$
AP171/14	AIOOH	+	0.6	28.5	17.1	14.2	9	0.052 ± 0.006
AP200/19	AIOOH	+	0.7	28.5	20.0	19.2	10	0.050 ± 0.003
SP88/31	SiO ₂	+	1.1	8.0	8.8	31.8	25	0.056 ± 0.004
SN27/32	SiO ₂	-	1.35	2	2.7	31	8	0.010 ± 0.003
SN54/32	SiO ₂	-	1.35	4	5.4	31.8	6	0.013 ± 0.004

^a Polyvinyl alcohol, PVA

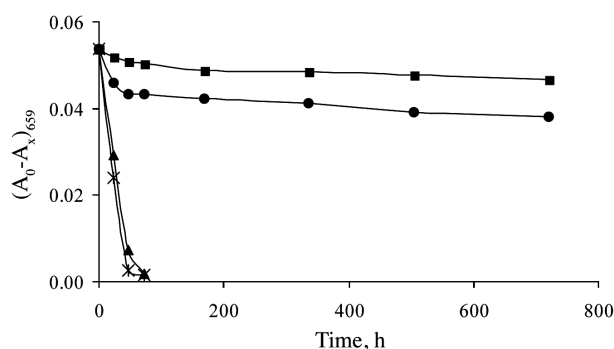


Fig. 4. Stability study at (■) 4 °C, (●) 25 °C, (▲) 60 °C and (✱) 80 °C exemplified by FePc(DA)₂ incorporated into a positively charged AlOOH layer. A₀ is the absorbance before exposure to NO₂ and A_x is the absorbance on exposure to 200 ppb NO₂ for 300 s in air of 50% RH. Fernández-Sánchez JF *et al.*, *Second Generation Nanostructured Metal Oxide Matrices to Increase the Thermal Stability of CO and NO₂ Sensing Layers Based on Iron(II) Phthalocyanine*. *Adv. Funct. Mater.* 2007; **113**: 630. Copyright Wiley-VCH Verlag GmbH & Co.KGAA. Reproduced with permission

Figure 4 shows the results of the thermostability study.

From these experiments it may be concluded that the sensing films containing FePc(DA)₂ are stable for at least one month at 4 °C and at 25 °C but are unstable when stored at higher temperatures. In addition, it is shown that the FePc(DA)₂ films are more stable than the FePc(BA)₂ ones.

It was demonstrated photophysically and by NMR that evaporation of the N-donor ligand seems to be responsible for the poor thermostability. Therefore, the

higher thermostability of the film based on FePc(DA)₂ compared to those based on FePc(BA)₂ can be explained by the higher boiling point of decylamine. In addition, it was demonstrated by NMR methodology that no oxidation process occurs after the membranes were heated up [14].

To increase the thermostability we proposed an appropriate chemical modification of the nanostructured matrix to prevent the evaporation of the amine but still allow diffusion of CO and NO₂ [14]. Three different chemical modifications were evaluated: chemical modification with amines, addition of a gas-fading agent, and modification with alumina oligomers (see Table 3 and Figure 5).

By adding the amine directly into the metal oxide matrix it was hoped that the evaporation of the amine would be prevented. Thus we used two different amine derivatives, affording the so-called monoamine (primary amine) and diamine (secondary amine) modified nanostructured matrices, labeled M and D. Anti-gas-fading agents, G, were added to avoid the degradation of active compounds by oxidation, and alumina oligomers, A, A^L, A³⁰ were used to improve the diffusion of CO and NO₂.

This study concluded that the addition of an anti-gas-fading agent affects neither sensitivity nor thermostability. Therefore, oxygen, ozone or other gases are not thought to be responsible for the degradation of the membranes at higher temperatures, which agrees with the NMR results, in which no oxidation process was detected [14].

The incorporation of amines M or D into the nano-particulated matrix improves the stability of the films

Table 3. Nomenclature and composition of the chemically-modified, positively-charged, nanostructured, metal-oxide supports (called “second-generation” supports). Abbreviations for the additives: M, monoamine; D, diamine; A, alumina oligomers; and G, anti-gas-fading additives. Fernández-Sánchez JF *et al.*, *Second Generation Nanostructured Metal Oxide Matrices to Increase the Thermal Stability of CO and NO₂ Sensing Layers Based on Iron(II) Phthalocyanine*. *Adv. Funct. Mater.* 2007; **113**: 630. Copyright Wiley-VCH Verlag GmbH & Co.KGAA. Reproduced with permission

Foil	Pore volume, mL/g	Coating weight, g/m ²	Total pore volume, mL/m ²	Pore diameter, nm	Modified by
SP237/27D	1.41	16.8	23.7	27	Diam.
SP268/27D	1.41	19	26.8	27	Diam.
SP168/27D	1.41	11.9	16.8	27	Diam.
SP268/27DG	1.41	19	26.8	27	Diam. + g.f.
SP268/27DA	1.41	19	26.8	27	Diam. + Al-Ol.
SP168/27DA	1.41	11.9	16.8	27	Diam. + Al-Ol.
SP268/27DAG	1.41	19	26.8	27	Diam. + Al-Ol. + g.f.
SP168/27MA	1.41	12	16.8	27	Monoam. + Al-Ol
SP168/27A ^L	1.41	12	16.8	27	Locron Al-Ol
SP168/27A ³⁰	1.41	12	16.8	27	Al ₃₀ ¹⁸⁺ Al-Ol
AP268/16	0.64	42	26.8	16.5	—
AP168/16	0.64	26.3	16.8	16.5	—
AP268/16G	0.64	42	26.8	16.5	g.f.

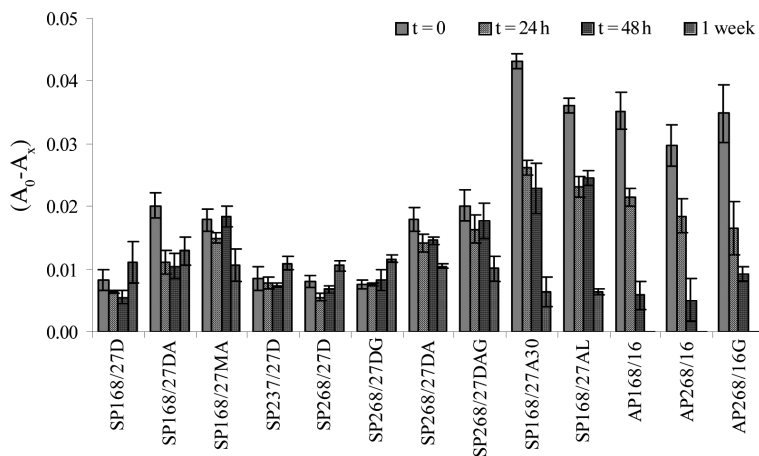


Fig. 5. Thermostability study of the second generation of nanostructured sensing films incorporating FePc(DA)₂ within chemically modified solid supports at 60 °C. A₀ is the absorbance before exposure to NO₂, and A_x is the absorbance on exposure to 200 ppb NO₂ for 300 s in air at 50% RH. *Fernández-Sánchez, JF et al., Second Generation Nanostructured Metal Oxide Matrices to Increase the Thermal Stability of CO and NO₂ Sensing Layers Based on Iron(II) Phthalocyanine. Adv. Funct. Mater. 2007; 113: 630. Copyright Wiley-VCH Verlag GmbH & Co.KGaA. Reproduced with permission*

but decreases sensitivity. Since the sensitivity of the metal complex to CO and NO₂ relies on the reversible exchange of one of the bound amine ligands, this mechanism seems to be influenced by the amine added to the matrix. The iron(II) complex may be chemically bound on one hand to the amine which is immobilized on the nanoparticulated matrix, and on the other to free amine, thus it decreases the evaporation of the N-donor ligand (increase of the thermostability) since one of the amine is chemically bounded to the solid surface, but decrease the sensitivity as only one amine can be replaced by NO₂ or CO because the other is chemically bounded to the surface.

Thus, the attachment of the structurally bound amine to the nanoparticulate matrix reduces the sensitivity of the film to CO and NO₂, but influences thermostability in a positive manner. The incorporation of both alumina oligomers and amines (ML and DL membranes) results in sensing films which are more stable than the non-chemically modified membranes and more sensitive than amine-modified membranes. The two chemical agents also have an additional effect: on one hand, the structurally bound amine provides higher thermostability and, on the other, the alumina oligomers improve sensitivity.

FUTURE RESEARCH DIRECTIONS

The future research on the development of optical sensors based on FePc complexes for determining NO₂ and CO is focused on three different aspects: increasing their thermostability, decreasing response time, and their implementation in portable devices.

As demonstrated in the thermostability study, the evaporation of the N-donor ligand is the main factor

responsible for the poor thermostability of the FePc-N donor ligand-sensitized sensing films. Thus, several strategies are being evaluated in order to avoid the evaporation of the ligands. One consists of the synthesis of novel FePc complexes which contain two different axial ligands, one which can be easily replaced by CO and NO₂ in order to maintain the selectivity, and another which forms a highly stable chemical bond with the metal center to increase thermostability.

The second strategy involves the synthesis of novel FePc's complexes where the N-donor ligand are chemically bounded to the planar structure of the Pc, allowing one of the NR₃ moieties to be always close to the metal center even when the gas molecule is bound. This strategy could provide similar sensitivity than FePc(DA)₂ and additional reversibility to the whole system, avoiding the undesired evaporation of the ligand.

of the ligand.

The third approach relates to the use of the magnetic properties of some metal oxide such as magnetite (Fe_xO_y) to incorporate magnetic properties into the sensing material. This magnetic metal oxide can be synthesized in a nanoscale (magnetic nanoparticles based on metal oxides) and, in addition, can be chemically modified in order to make them dispersible in water and/or in organic media. These magnetic metal oxide nanoparticles can be then incorporated into polymeric films doped with FePc complexes, showing magnetic properties to the state-of-the-art optical sensing films [17]. It allows reduction on size of these conventional materials being able to be collected by magnets and concentrated in the tip of an optical fiber, *a priori*, increasing their sensitivity and decreasing the response time.

This third approach is not the only approximation to implementing FePc-N donor ligand-sensitized films in portable devices. Another possibility is the synthesis of polymeric nanoparticles which contain NO₂ or CO-sensing complexes and coating these on the end of an optical fiber. This approach requires firstly increasing the sensitivity of the sensing material and then optimizing the production of polymeric nanoparticles.

Acknowledgements

The authors thank to the Spanish Ministry of Education (FPU grant reference AP2006-01147 and Project CTQ2007-60079), the Regional Government of Andalusia (Excellence projects RNM-666, P07-FQM-02625 and P07-FQM-02738), the Andalusian Water Agency (agreement 2243) and Ilford Imaging Switzerland for their financial support. IF thanks the Ramón y Cajal program for funding.

REFERENCES

1. a) Nezel T, Spichiger-Keller UE, Ludin C and Hensel A. *Chimia* 2001; **55**: 725. b) Hensel A. *Ph.D. Thesis*, Universität der Bundeswehr München 2001.
2. McGuffie C, Wyatt JP, Kerr GW and Hislop WS. *J. Accid. Emerg. Med.* 2000; **17**: 38.
3. Cunnington AJ and Hormbrey P. *Postgrad. Med. J.* 2002; **78**: 233.
4. Narayanaswamy R and Wolfbeis OS. (Eds.) In *Optical Sensors: Industrial, Environmental and Diagnostic Applications* Springer: Heidelberg, 2004.
5. a) Snow AW and Barger WR. In *Phthalocyanines – Properties and Applications*, Leznoff CC and Lever ABP. (Eds.) VCH: New York, 1989. b) Di Natale C, Macagnano A, Repole G, Saggio G, D'Amico A, Paolesse R and Boschi T. *Mater. Sci. Eng.* 1998; **5**: 209.
6. a) Lever ABP. *Adv. Inorg. Chem. Radiochem.* 1965; **7**: 27. b) Lever ABP. *J. Porphyrins Phthalocyanines* 2004; **8**: 1327.
7. Ouedraogo GV, More C, Richard Y and Benlian D. *Inorg. Chem.* 1981; **20**: 4387.
8. Nezel T. *Ph.D. Thesis: Investigation and development of selective polymeric liquid membranes for optical detection of NO₂ with chemical sensors*, ETH Nr. 14602, 2002.
9. a) Steiger R, Beer R, Fernández-Sánchez JF and Spichiger-Keller UE. *Solid St. Phenom.* 2007; **121–123**: 1193. b) Spichiger S, Fernández-Sánchez JF and Spichiger-Keller UE. *Metal oxide membrane with a gas-selective compound*. International Patent WO2006EP04396
10. a) Shipway AN, Katz E and Willner I. *Chem. Phys. Chem.* 2000; **1**: 18. b) Shi J, Zhu Y, Zhang X, Baeyens WRG and Garcia-Campaña AM. *Trends Anal. Chem.* 2004; **23**: 351. c) Baraton MI and Merhari L. *J. Nanoparticle Res.* 2004; **6**: 107.
11. Shimizu Y, Hyodo T and Egashira M. *J. Eur. Ceram. Soc.* 2004; **24**: 1389.
12. Fernández I, Pregosin PS, Albinati A, Rizzato S, Spichiger-Keller UE, Nezel T and Fernández-Sánchez JF. *Helv. Chim. Acta* 2006; **89**: 1485.
13. Fernández-Sánchez JF, Nezel T, Steiger R and Spichiger-Keller UE. *Sens. Actuators B* 2006; **113**: 630.
14. Fernández-Sánchez JF, Fernández I, Steiger R, Beer R, Cannas R and Spichiger-Keller UE. *Adv. Funct. Mater.* 2007; **17**: 1188.
15. a) Fernández-Sánchez JF, Cannas R, Spichiger S, Steiger R and Spichiger-Keller UE. *Anal. Chim. Acta* 2006; **566**: 271. b) Fernández-Sánchez JF, Cannas R, Spichiger S, Steiger R and Spichiger-Keller UE. *Sens. Actuators B* 2007; **128**: 145. c) Medina-Castillo AL, Fernández-Sánchez JF, Nazeeruddin MdK, Segura Carretero A, Fernández-Gutiérrez A, Gratzel M and Spichiger-Keller UE. *Analyst* 2007; **132**: 929.
16. a) Plashnitsa VV, Ueda T, Elumalai P and Miura N. *Sens. Actuators B* 2008; **130**: 231. b) Fu T. *Electroanalysis* 2008; **20**: 68. c) Hashishin T and Tamaki J. *J. Nanomaterials* 2008; ID 352854. d) Varenne C, Mazeta L, Bruneta J, Wierzbowska K, Paulya A and Laurona B. *Thin Solid Films* 2008; **516**: 2237.
17. Fernández-Sánchez JF, Medina-Castillo AL, Segura-Carretero A and Fernández-Gutiérrez A. In *Metal Oxide Nanostructured Material in the Development of Optical Sensors*, Umar A and Hahn YB. (Eds.) ASP: 2008 (in press).

Octahedral iron(II) phthalocyanine complexes: multinuclear NMR and relevance as NO₂ chemical sensors†

Pascual Oña-Burgos,^a María Casimiro,^a Ignacio Fernández,^{*a} Angel Valero Navarro,^b Jorge F. Fernández Sánchez,^{*b} Antonio Segura Carretero^b and Alberto Fernández Gutiérrez^b

Received 20th November 2009, Accepted 5th May 2010

First published as an Advance Article on the web 3rd June 2010

DOI: 10.1039/b924429h

The synthesis of new phthalocyanine iron(II) (FePc) based coordination complexes **2–7**, their structural characterization by multinuclear NMR (¹H, ¹³C, ¹⁵N, ³¹P, ⁵⁷Fe), and their use as improved sensitive and cheap optical NO₂ sensors is described. $\delta(^{15}\text{N})$ and $\delta(^{57}\text{Fe})$ values obtained *via* HMQC NMR methods show an interesting trend, the larger the chemical shift value the more the selectivity towards NO₂. Among all the sensing films prepared, the novel mixed ligand phosphite-amine [FePc(benzylamine)(P(OEt)₃] (**7**) immobilized into AP200/19 showed the best sensitivity, reversibility (LOD and LOQ of 1.2 ppb and 4.0 ppb, respectively), and thermostability in the range of 4 to 25 °C.

Introduction

Chemical sensors are devices that transform chemical information into an analytically useful signal. This information may originate from a chemical reaction or from a physical property of the system. The development of instrumentation, microelectronics and computers makes possible the design of sensors using most of the known chemical and/or physical principles. Nitrogen dioxide (NO₂) is an extremely toxic gas generated primarily from the liberation of nitrogen contained in fuel as a byproduct of combustion processes.¹ NO₂ is also a source of acid rain, damaging buildings and polluting water sources.² Thus, monitoring NO₂ plays an important role making the environment safer and cleaner. The implementation of optical sensors has received growing interest since they offer potential advantages over other analytical methods,³ *i.e.* sensors are easily miniaturized, they can be prepared as disposable low-cost sensors and, when coupled to optical fibers, pose potential non-invasive monitoring capabilities which are less sensitive to electromagnetic interference.⁴

Phthalocyanines (Pc's) and their analogues have been investigated for many years, especially with regard to their properties as dyestuffs, paints and colors.⁵ Together with porphyrins, both represent a large family of functional molecular materials with high chemical and thermal stability. The Pc molecule has a two dimensional π -electron conjugated system (18 electrons) that can incorporate about 70 different metals.⁶ Metallo-phthalocyanines and metallo-porphyrins are attractive systems for the optical detection of volatiles because of their open coordination sites for axial ligation^{5b} and intense coloration. Organic thin films based on metals different than iron have been developed and described

as optical chemically interacting materials for the detection of a variety of molecules.⁷ The use of iron as a low cost and reduced environmental impact transition metal makes exploring their use in sensing layers a worthwhile pursuit.

Representative varieties of optical devices and sensors have been developed to date, *i.e.* azo compounds immobilized at the nanopores of a sol-gel structure,⁸ porous glass doped with sulfanilamides and naphthylamines,⁹ blue-green sol-gel acid-base indicators embedded in a hydro-gel matrix,¹⁰ poly(3-octylthiophene-2,5-diyl) systems,¹¹ ZnO nanowires,¹² or phenylenediamines immobilized in polydimethylsiloxanepolycarbonate block copolymers.¹³ Some of us have already reported AIOOH nanostructured films doped with phthalocyaninato-iron(II) complexes, and tested their sensor abilities against CO and NO.¹⁴

In this paper we present the synthesis of some new iron(II) Pc-based coordination complexes, their structural characterization by multinuclear NMR (¹H, ¹³C, ¹⁵N, ³¹P, ⁵⁷Fe), and their use as reactive, sensitive and cheap optical sensors for NO₂ determinations.

Results and discussion

Synthesis of FePc complexes

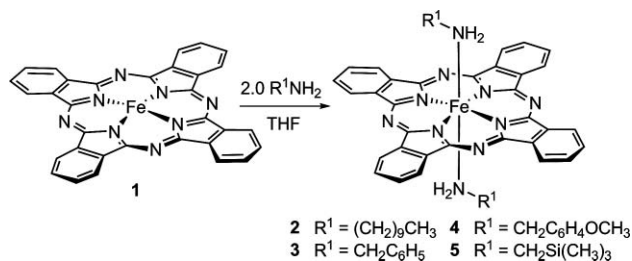
Inspired by the work of Watkins and Balch in the 70's,¹⁵ where a number of bis adducts and mixed-ligand ferrous phthalocyanine were isolated, we decided to extend the variety of these two families of compounds and apply their attractive coordination properties of the iron metal on the field of sensors. As shown in Scheme 1, reaction of two equivalents of amine (decylamine, benzylamine, *para*-methoxybenzylamine, or trimethylsilylmethylenamine) with FePc (**1**), in THF solution, affords complete conversion to the bis-amine iron complexes, **2–5**, respectively. Complexes **2** and **3** had been previously characterized by us¹⁴ and they will be considered as model compounds.

The NMR spectra of compounds **2–5** indicate that they are all diamagnetic. Supporting the proposed composition is the elemental analysis of freshly prepared samples, which were thoroughly consistent for all of them. These iron complexes investigated may be ascribed into derivatives of six-coordinate bis-amine

^aÁrea de Química Orgánica, Universidad de Almería, Carretera de Sacramento s/n, 04120, Almería, Spain. E-mail: ifernan@ual.es; Fax: +34 950 015481; Tel: +34 950 015648

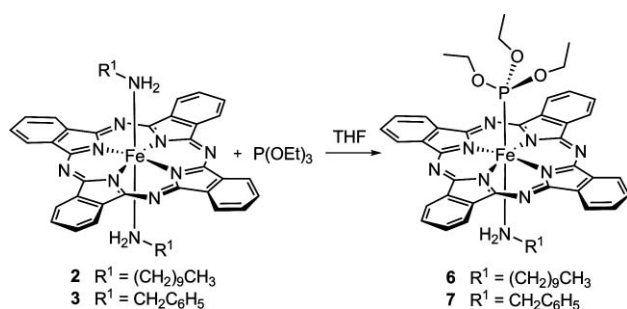
^bDepartment of Analytical Chemistry, University of Granada, Avenida Fuentenueva s/n, 18071, Granada, Spain. E-mail: jffernan@ugr.es

† Electronic supplementary information (ESI) available: 1D and 2D NMR spectra, absorption spectra, spectrophotometry calibration curve, and stability graphs as a function of time and temperature. See DOI: 10.1039/b924429h



Scheme 1 Synthesis of bis-amine PcFe(II) complexes 2–5.

phthalocyanine complexes with the two new nitrogen donors occupying *trans*-axial positions. On the other hand, treatment of 60 mM samples of **2** or **3** with one equivalent of triethylphosphite in THF solution at room temperature allowed, without the need of any heat, the quantitative formation of mixed-ligand complexes **6** and **7** (Scheme 2).



Scheme 2 Synthesis of mixed ligand amine-phosphite PcFe(II) complexes 6 and 7.

Products **6** and **7** were obtained in analytical pure form (correct elemental analysis) in good isolated yield after recrystallization and solvent evaporation in two consecutive times. It is worth mentioning the change in color experienced from green to bright blue immediately after addition of the phosphite. When one or more equivalents of triethylphosphite are added to a THF solution of bis-amine FePc, only the replacement of one equivalent of amine is produced, proving the high stability of the resulting mixed-ligand complex. At 500 MHz the various signals of the aliphatic H-atoms in complexes 2–7 are well dispersed (see ESI†).¹⁶ In all cases it has been possible to verify the adduct stoichiometry by comparing the integrated intensities of the adduct protons with the intensities of the proton resonances due to the phthalocyanine moiety.

The low frequency signals arise as a consequence of the local anisotropic effects associated with the phthalocyaninato structure.^{16,17} The specific assignment of the NH₂ resonances follows from two independent NMR experiments. In the first of these, the ¹H, ¹³C gHMQC spectra showed no cross-peak between the lowest frequency resonance ($\delta_{\text{H}} = -4$ to -7 ppm) with any carbon signal. And further, the ¹H, ¹⁵N gHMQC spectra, shown in Fig. 1, correlate these low frequency NH₂ signals to their respective nitrogen-15 resonances with clear one bond couplings between both nuclei. ¹⁵N chemical shifts and coupling constants observed for the whole set of complexes are presented in Table 1.

The coordination shifts were all negative (higher shielding of ¹⁵N), and showed up in the expected region.^{18,19} The increase in nitrogen shielding on metal complexation matches earlier

Table 1 Nitrogen-15, phosphorus-31 chemical shifts (in ppm) and coupling constants (in Hz) for FePc complexes 2–7^a

	δ (¹⁵ N)	δ (³¹ P)	J (¹⁵ N, ¹ H)	J (⁵⁷ Fe, ³¹ P)	J (³¹ P, ¹⁵ N)
2	-34.8	—	66.4	—	—
3	-30.5	—	68.0	—	—
4	-27.6	—	66.4	—	—
5	-50.9	—	68.4	—	—
6	-1.34	+131.8	64.0	79.2	65.8
7	+3.45	+131.6	67.6	79.8	62.2

^a In THF-*d*₈ with nitrogen relative to NH₃ and phosphorus relative to 85% H₃PO₄.

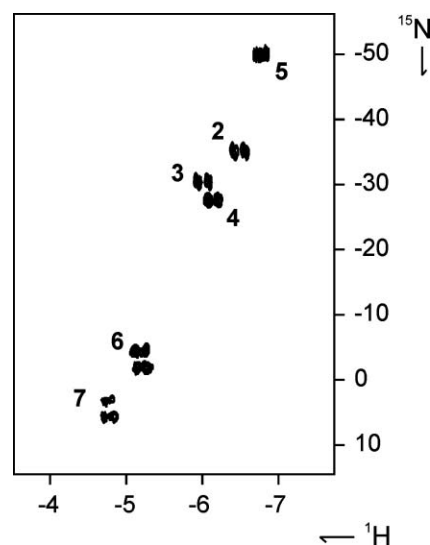


Fig. 1 Section of the ¹H, ¹⁵N gHMQC NMR spectra (500.13 MHz, ambient temperature in THF-*d*₈ solution) of bis-amine complexes 2–5 and mixed amine-phosphite complexes 6–7. (**2**: $\delta_{\text{N}} = -34.8$ ppm; **3**: $\delta_{\text{N}} = -30.5$ ppm; **4**: $\delta_{\text{N}} = -27.6$ ppm; **5**: $\delta_{\text{N}} = -50.9$ ppm; **6**: $\delta_{\text{N}} = -1.34$ ppm, ² J (³¹P, ¹⁵N) = 65.8 Hz; **7**: $\delta_{\text{N}} = 3.45$ ppm, ² J (³¹P, ¹⁵N) = 62.2 Hz).

observations of similar trends in δ_{N} of metal complexes and parallels the effects induced by alkylation or protonation of a nitrogen lone pair.^{19,20} As a matter of fact, the coordination of aniline to transition metals such as ruthenium, platinum or tungsten result in coordination chemical shifts of -62.1 , -23.5 and -19.5 ppm for [TpRu(PMe₃)₂(NH₂Ph)][OTf] (Tp = hydridotris(pyrazolyl)borate), [(NCN)Pt-(Me)₂][BAR₄] (NCN = 2,6-pyrazolyl-(CH₂)₂C₆H₃), and [Tp*W(CO)(η -2-Ph≡CMe)-(NH₂Ph)][BAR₄] (Tp* = hydridotris(3,5-dimethylpyrazolyl)borate), respectively.²¹ The origin of these phenomena is generally attributed to changes in the paramagnetic shielding term, where the relatively small negative nitrogen coordination chemical shift found ($\delta^{15\text{N}}_{\text{complex}} < \delta^{15\text{N}}_{\text{ligand}}$) are attributable to the stabilization on coordination of both frontier orbitals for the resonant atom, so that the effective ΔE (see below) is not greatly changed.^{18b-18c,19,20}

The significant down field nitrogen shift experienced by complexes 6–7 compared to 2–5 is associated with the ligand-field-strength parameter of the *trans* phosphite which is a better π -acceptor. This effect has been previously shown in cyclopalladated nitrosoamine complexes [(Pd(μ -OAc)(O=NN-(CH₃)C₆H₄))₂] and [PdCl{O=NN-(CH₃)C₆H₄}{P(OMe)₃}], where the incorporation of the phosphite moiety produces a higher frequency shift of 23.5 ppm.²² The one-bond coupling constants ¹ J (¹⁵N, ¹H) detected

on each 2D map (Table 1) appear to be smaller than might be expected for a simple sp^3 hybridized nitrogen atom which is commonly used as diagnostic tool for complexation.^{18c,20,21} More attractive, is the way of proving the formation of mixed aminophosphite complexes through the observation of $^2J(^{31}\text{P},^{15}\text{N})$, with values of 65.8 and 62.2 Hz for **6** and **7**, respectively (Fig. 1). These values are in accord with previous phosphorus–nitrogen metal through (M = Pt, Rh, Au, Mo, W) values described in the literature.²³

Complex **5** showed the lowest nitrogen chemical shift of the whole set, which is related to the fact that $\text{NH}_2\text{CH}_2\text{TMS}$ is the most electron-withdrawing amine employed herein. In sharp contrast, the *para*-methoxybenzylamine FePc complex **4** showed the highest frequency chemical shift of all the bis-amine molecules **2–5**. Chemical shift studies of aliphatic amines²⁴ have already revealed that substituent effects are rather large for α - and β -substituents whereas the increments for γ -, δ - and ϵ -groups are of minor importance.^{18,19,24}

For the silicon-containing complex **5**, we performed a $^1\text{H},^{29}\text{Si}$ gHMQC (Fig. 2) which revealed a ^{29}Si resonance for the Me_3Si group at $\delta_{\text{Si}} -2.54$ ppm, that falls in the region found for tetraalkyl derivatives, but is slightly shifted to lower frequencies compared to TMS.

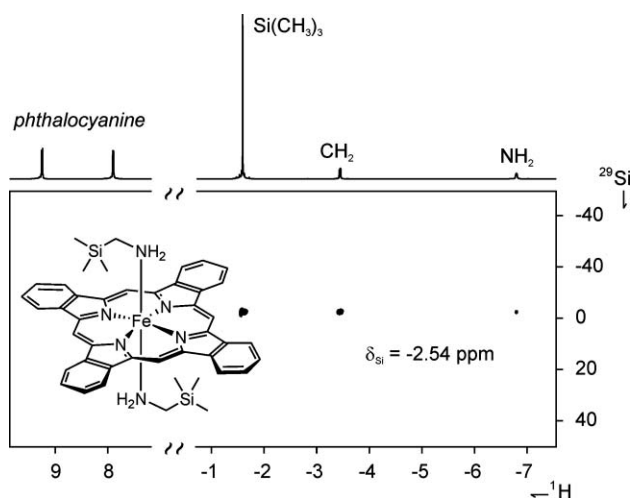


Fig. 2 Section of the $^1\text{H},^{29}\text{Si}$ gHMQC NMR spectra (500.13 MHz, ambient temperature in $\text{THF-}d_8$ solution) of bis(trimethylsilylmethyleneamine)FePc complex **5**, showing three cross-peaks between silicon and NH_2 , CH_2 , and Me_3Si groups.

Considering now the mixed-ligand complexes **6** and **7**, ^1H chemical shifts for coordinated triethylphosphite are also shielded by the ring current and appear at $\delta_{\text{H}} -0.18$ (CH_2) and $+1.29$ (CH_3) ppm which compared to the free phosphite corresponds to delta differences ($\Delta\delta_{\text{H}}$) of -2.59 and -1.53 , respectively.

The ^{31}P NMR spectra for **6** and **7** showed singlets located at δ 131.8 and 131.6 ppm, respectively with relatively small coordination chemical shifts (compared to free phosphite) of $\Delta\delta_{\text{P}}$ -7.0 and -7.2 ppm, respectively.

Fe-57 NMR

NMR studies of the ^{57}Fe nucleus ($I = 1/2$, 2.2% natural abundance), 7.4×10^{-7} times as sensitive as the proton, present an

interesting challenge to research groups fascinated on structural features.²⁵ In most of the cases ^{57}Fe measurements require isotopic enrichment of the metal, hours of NMR time, and large volumes (10–20 mm diameter NMR tubes). Naturally, indirect detection has become an attractive alternative method due the higher sensitivity gain. At natural abundances of ^{57}Fe , indirect detection *via* ^1H or ^{31}P appears to be now the most attractive alternative, which, however, requires a sizable scalar coupling between the two nuclei.^{26,27} Another alternative exploited in the last few years by Wrackmeyer *et al.* is based on polarization transfer (PT) techniques such as INEPT which leads to signal/noise improvements with respect to single pulse detection.²⁸

With respect to the chemical shift, known to date the range spans *ca.* 12 000 ppm,²⁵ what makes iron NMR an extremely powerful and direct probe of the asymmetry of the electron distribution around the metal. From the data currently available, the ^{57}Fe chemical shift range, in the case of heme axial ligand combining phosphines and amines, from 7652 to 9275 ppm.²⁹ As far as we are aware there are no phthalocyanine iron chemical shifts reported in the literature, so the ones reported herein represent the first example of their class.

In terms of structural information of FePc, apart from optical absorption and Mossbauer data,³⁰ spectroscopic data reported with respect to the coordination chemistry is scarce.^{15,31} Only a few old reports shed light on ^1H NMR¹⁷ and none of them are concerned about multinuclear NMR methodologies.

Our iron-57 chemical shift determination approach was based on HMQC inverse shift correlation between the active iron isotope and the phosphorus with additional ^1H decoupling during the whole experiment (Fig. 3).^{26,27}

A direct triple probe head was employed using spectral references of 85% H_3PO_4 and $\text{Fe}(\text{CO})_5$ for ^{31}P and ^{57}Fe , respectively. Fig. 3 shows $^{31}\text{P},^{57}\text{Fe}$ correlation spectra acquired in less than 3 h for **6** and **7**. These 2D maps gave $\delta(^{57}\text{Fe})$ of $+6764$ and $+6794$ ppm for **6** and **7**, respectively. As usual, a second experiment changing the Fe carrier frequency was performed confirming the same chemical shift and therefore proving to be not folded. The detected ^{31}P chemical shifts of δ 131.8 and 131.6 ppm fit perfectly with those observed in the corresponding 1D NMR spectra.

The iron-57 chemical shift difference of $\Delta\delta = 30$ ppm between **6** and **7**, suggest only minor variation in the bonding interactions. From these data one can assume decylamine to be a more electron donating ligand since the higher σ donor at the phthalocyanine the larger the repulsion of the d_{z^2} orbital, which gives rise to an increase in ΔE and a decrease in the chemical shift, as arises from the Ramsey formula.^{25,32} This σ donor strength trend has been previously observed in model heme complexes, such as tetraphenylporphyrin (TPP), tetramesitylporphyrin (TMP) and octaethylporphyrin (OEP) derivatives.^{29,33}

The ^{57}Fe - ^{31}P coupling constants, rapidly deduced from the F2 dimension (Fig. 3), are of *ca.* 80 Hz (Table 1) which are considerably larger than those found for iron coupled to nitrogen or carbon and much larger than for iron coupled to phosphorus in porphyrin derivatives.³⁴ In smaller molecules such as $\text{Cp}(\text{dppe})\text{FeH}$, $(\eta^4\text{-butadiene})_2\text{FePMe}_3$, or $(\eta^4\text{-butadiene})_2\text{FePEt}_3$, $^1J(^{57}\text{Fe},^{31}\text{P})$ magnitudes are of *ca.* 60 Hz.^{26a}

Crystals of complexes **2** and **4** obtained by slow evaporation of THF solutions at room temperature clearly proved the structure ascertained by NMR methods consisting of an iron

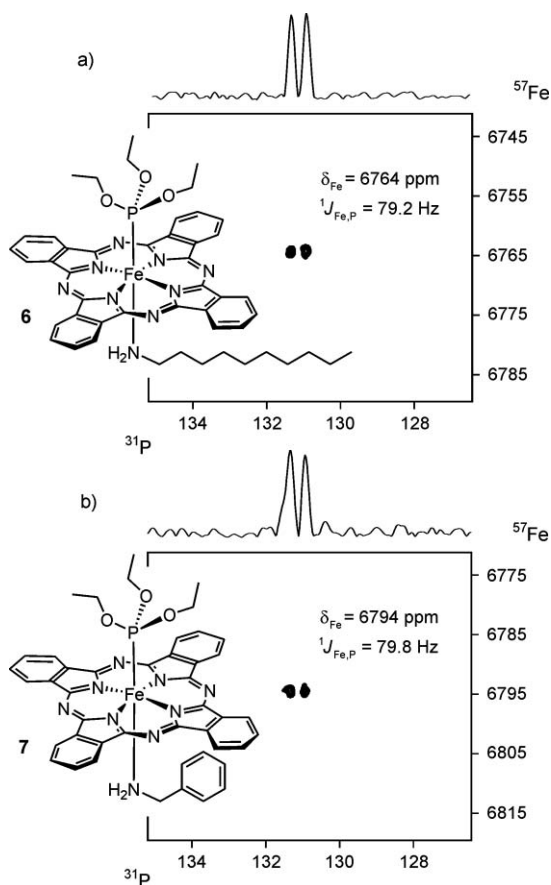


Fig. 3 Section of the $^{31}\text{P}, ^{57}\text{Fe}\{^1\text{H}\}$ HMQC NMR spectra (500.13 MHz, ambient temperature in $\text{THF}-d_8$ solution) of mixed amine-phosphite complexes **6–7**.

phthalocyanine ring, two *trans*-complexed amine ligands, and in overall suggesting a fairly flat arrangement of the Pc system.³⁵ There are only a few more X-ray examples of six-fold coordinated FePc complexes containing nitrogen donors.³⁶

Sensing performance

The sensing mechanism for NO_2 recognition on nanostructured films incorporating phthalocyanine iron(II) systems is based on the exchange of the amine by a π -electron acceptor (NO_2), which results in a decrease in the absorbance of the Q-band between 655 and 670 nm.¹⁴ The spectral changes indicate that the 18-electron coordinatively saturated $\text{FePc}(\text{NH}_2\text{R})_2$ **2–5** or $\text{FePc}(\text{NH}_2\text{R})(\text{P}(\text{OEt})_3)$ **6–7** complexes can lose an amine ligand, presumably *via* a dissociative mechanism in which the NO_2 molecule occupies the vacant coordination site.

To prepare the sensing films, FePc (**1**) was dissolved in the specific THF mixture (molar ratios of 1 : 30 (**1** : NH_2R) for **2–5**, and 1 : 30 : 15 (**1** : NH_2R : $\text{P}(\text{OEt})_3$) for **6–7**), and an aliquot (0.2 mL) of this solution was then taken and deposited onto a positively charged nanostructured AlOOH layer (AP200/19) by spin-coating (at 450 rpm). AP200/19 is best described by a total pore volume (TPV) of 20 mL m^{-2} and a pore diameter (PD) of 19.2 nm.^{37,38} Absorption and ^1H NMR spectra of these solutions (see ESI†) before deposition clearly evidenced the exclusive formation of the bis-amine complexes **2–5** or the mixed ligand amine-phosphite

Table 2 Sensing film results when membranes doped with **2–7** are exposed to NO_2 , and their correlation with $\delta(^{15}\text{N})$ and $\delta(^{57}\text{Fe})$ values

Complex	$\lambda_{\text{max}}/\text{nm}$	$(A_0 - A_x)/A_0$ (%) ^a	$\delta(^{15}\text{N})^b$	$\delta(^{57}\text{Fe})^b$
5	656	7.2	-50.9	—
2	659	9.4	-34.8	—
3	662	10.0	-30.5	—
4	658	13.1	-27.6	—
6	656	13.9	-1.34	+6764
7	657	14.0	+3.45	+6794

^a The sensing films were exposed to 1 ppm of NO_2 for 300 s at 50% RH at a flow-rate of 200 mL min^{-1} . ^b All in $\text{THF}-d_8$ with nitrogen relative to NH_3 and iron relative to $\text{Fe}(\text{CO})_5$.

6–7, respectively. Optical spectra of the films once incorporated were recorded and provide clear evidence that the iron phthalocyanine complexes still intact after coated into the solid support (see ESI†). Table 2 lists the experimental results for the NO_2 sensing films and the corresponding $\delta(^{15}\text{N})$ and $\delta(^{57}\text{Fe})$ values for each complex.

Previous studies³⁹ had demonstrated that the best sensor response is obtained with a 1 : 30 (**1** : NR_3) molar ratio, since the equilibrium system is influenced not only by the strength of the bond between the amine and the metal center, but also by the concentration of the N-donor ligand, which needs not necessarily to be equimolecular proportional compared to **1**.³⁹ Different molar ratios were even though monitored and erosion on the sensor response was in all cases experienced.

The films are characterized by measuring the relative change in absorbance $(A_0 - A_x)/A_0$ at λ_{max} , where A_x is the absorbance upon exposure to 1 ppm NO_2 for 300 s at 50% of relative humidity (RH) at a flow rate of 200 mL min^{-1} , and A_0 is the absorbance of the film in contact with synthetic air (50% RH and flow rate of 200 mL min^{-1}). 300 s of NO_2 was used as exposure time to be able to compare the analytical features of the proposed sensing layers with the previously published in the literature.^{13,14}

Experimental results show that the behavior of the sensing films containing complexes **2–7** can be predicted by just correlating the nitrogen chemical shift *versus* $(A_0 - A_x)/A_0$ (Table 2). The larger chemical shift value is in accord with the higher selectivity towards NO_2 . It is known that in metallo-phthalocyanines there is π back-donation from the metal d orbitals to the macrocycle ligand π^* orbitals.^{5,40} The π - π^* transition, and therefore the Q-band, is strongly influenced. The introduction of axial ligands modifies the π back-donation on the macrocycle, and therefore the π - π^* transition. Together with these features, if one of the axial ligands is σ -donor and π -acceptor as $\text{P}(\text{OEt})_3$, there will be metal-to-ligand charge transfer (MLCT) transitions reinforcing the strength of the bond in much extent than when pure σ -donors operate. Therefore, in mixed-ligand complexes such as $[\text{FePc}(\text{NH}_2\text{R})(\text{P}(\text{OEt})_3)]$ **6–7**, an increase of the Fe–P bond strength makes weaker the Fe–N bond and consequently allowed the nitrogenated ligand to be more easily removed by the NO_2 gas. Based on the results highlighted in Table 2, we choose complex **7** as the preferred sensing film constitute.

AP200/19^{37,38} doped with $[\text{FePc}(\text{benzylamine})(\text{P}(\text{OEt})_3)]$ (**7**) were mounted in a flow cell and fixed in a spectrophotometer. The optical films were calibrated between 0.1 and 1 ppm NO_2 (50% RH) and the regression equation $y = -1.2335 + 23.444x$

was obtained when varying partial pressures of NO_2 (see ESI†). The limit of detection (LOD) and quantification (LOQ) were determined under IUPAC methods ($\text{LOD} = 3s_b/m$; $\text{LOQ} = 10s_b/m$, where s_b is the standard deviation for ten blank samples and m is the slope of the calibration curve). The NO_2 LOD and LOQ were 1.2 ppb and 4.0 ppb, respectively. Compared to sensing layers reported in the literature, the one described herein offers excellent sensitivity and would be located on top of all the optochemical sensors assembled with an iron core as the indispensable component. Fig. 4 shows the response-recovery-curve for sensing film-containing 7, when after each NO_2 injection; flushes of fresh air are introduced. The NO_2 concentration chosen for these tests were 1.0, 0.5, and 0.2 ppm with a gas flow rate of 200 mL min^{-1} .

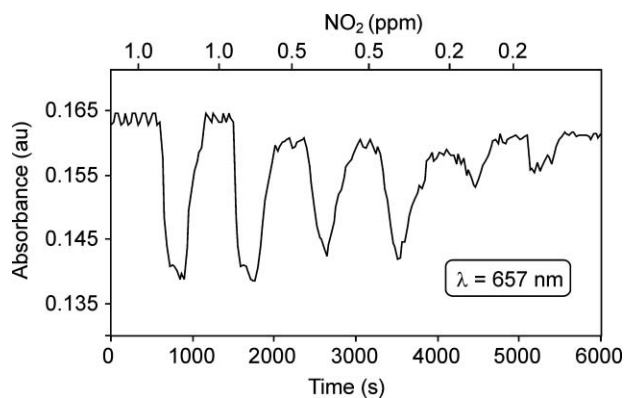


Fig. 4 Room temperature response-recovery curve for $[\text{FePc}(\text{benzylamine})(\text{P}(\text{OEt})_3)]$ (7) incorporated into AP200/19 matrix, when exposed to decreasing concentration of NO_2 gas in the presence of air.

One important requirement to be addressed is the stability of the sensing films against temperature. Films containing complexes 2–7 were evaluated with 1 ppm of NO_2 for 300 s at 50% RH in air during 3 months. The stability screening was performed at 4, 25, and 60°C . Fig. 5(a) shows the stability of layers doped with 7 at these temperatures, proving 60°C to considerably affect the layer life time. At 25°C (Fig. 5(b)) the sensing layer keeps its selectivity intact for 40 days, when starting from then is reduced down to 50% after the second month. These results significantly improve previously reported data in which $[\text{FePc}(\text{decylamine})_2]$ (2) films were stable for less than one month at 25°C .¹⁴

Conclusions

New octahedral iron(II) phthalocyanines complexes 2–7 have been synthesized, structurally characterized, and tested as potential optical sensors for NO_2 determinations. $\delta(^{15}\text{N})$ values have been obtained by 2D NMR methods and remarkably correlated with NO_2 sensing results. 2D $^{31}\text{P}, ^{57}\text{Fe}$ HMQC experiments have been applied in phthalocyanine systems providing for the first time phthalocyanine iron-57 chemical shifts and coupling constants. Among the sensing films assayed, the novel mixed phosphite-amine complex 7 immobilized into AP200/19 showed the best NO_2 sensitivity, reversibility (LOD and LOQ of 1.2 ppb and 4.0 ppb, respectively), and thermo-stability in the range of 4– 25°C . It constitutes a promising optical sensor providing better results than

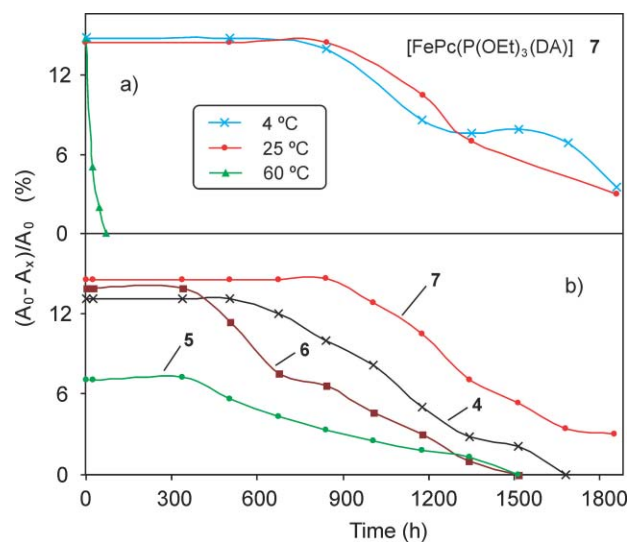


Fig. 5 (a) Stability study of complex 7 immobilized into AP200/19 at (\times) 4°C , (\bullet) 25°C and (\blacktriangle) 60°C ; (b) thermo-stability comparison for layers containing complexes 4, 5, 6 and 7 at 25°C .

previous work and for related optical sensors. A study to unravel the electronic structure of the NO_2 adducts, together with the implementation of these new PcFe sensing films on miniaturized gadgets are currently undergoing in our laboratories.

Experimental

Glassware was dried overnight in a 110°C oven to remove moisture. All procedures were carried out under nitrogen and solvents were freshly distilled from potassium or sodium/benzophenone (THF, hexane). Iron phthalocyanine 1 was purchased from Fluka, and the rest of reagents were used as obtained from commercial sources without further purification. Compounds 2 and 3 have been prepared as described previously.¹⁶

1D and 2D NMR spectra were measured on a Bruker Avance 500 spectrometer (^1H , 500 MHz; ^{13}C , 125.7 MHz; ^{15}N , 50.7 MHz, ^{29}Si , 99.4 MHz, ^{31}P , 202.4 MHz and ^{57}Fe , 16.3 MHz) equipped with a third radiofrequency channel. A 5 mm indirect triple probe head was used for $^1\text{H}, ^{15}\text{N}$ gHMQC and $^1\text{H}, ^{29}\text{Si}$ gHMQC and a 5 mm direct triple probe head was used for $^{31}\text{P}, ^{57}\text{Fe}$ HMQC. The spectral references used were TMS for ^1H , ^{13}C and ^{29}Si , NH_3 for ^{15}N , and to external 85% H_3PO_4 for ^{31}P and $\text{Fe}(\text{CO})_5$ for ^{57}Fe . Unless otherwise stated, standard Bruker software routines (TOPSPIN and XWINNMR) were used for the 1D and 2D NMR measurements. Melting points were recorder on a Büchi B-540 capillary melting point apparatus and mass spectra were determined by atmospheric pressure chemical ionization (APCI) on a Hewlett-Packard 1100.

The absorbance measurements were performed on a Spekol 1100 spectrophotometer using a specially designed flow-through cell.¹⁴ The gases partial pressures were varied by using Bronkhorst mass flow controllers. Relative humidity was monitored with a Rotronic hygrometer located right after the measurement cell. A self written LabVIEW 5.1 program which fully controls the Spekol 1100 and Bronkhorst mass flow controllers *via* serial interface was employed.

General procedure for the synthesis of complexes 4–5

The corresponding amine (*para*-methoxybenzylamine or trimethylsilylmethyleneamine, 0.299 mmol) was added dropwise to a solution of **1** (85 mg, 0.150 mmol) in THF (5 mL). The reaction mixture was stirred at ambient temperature for 15 min after which time the dark green solution was filtered with Millipore Millex (Nylon 0.2 μ M), and then slowly concentrated under vacuum. The resulting greenish oil was washed with cold hexane, filtered, and dried under vacuum. This sequence was repeated one more time. Isolated yields were 86% (108 mg) and 90% (104 mg) for **4** and **5**, respectively. Alternatively, complexes **4** and **5** can be prepared *in situ* in an oven-dried 5 mm NMR tube, by just mixing 0.0299 mmol (17 mg) of **1** with 0.0598 mmol of the corresponding amine in deuterated THF (0.5 mL). After a few minutes the solution turns deep green indicative of the desired transformation.

[FePc(NH₂CH₂C₆H₄OMe)₂] (**4**)

Mp 135–140 °C, dec. ¹H NMR (500.13 MHz, THF-*d*₈): δ –6.13 (t, 4H, ³J_{HH} 7.6 Hz, 2NH₂), –1.92 (t, 4H, ³J_{HH} 7.6 Hz, 2CH₂), 3.24 (s, 6H, 2OCH₃), 4.88 (d, 4H, ³J_{HH} 8.9 Hz, ArH), 5.81 (d, 4H, ³J_{HH} 8.9 Hz, ArH), 7.91 (m, 8H, ArH), 9.28 (m, 8H, ArH). ¹³C NMR δ : 40.89 (2CH₂), 53.81 (2OCH₃), 112.18 (4CAr), 120.38 (8CAr), 126.67 (8CAr), 126.76 (4CCAr), 129.07 (2C_{ipso}), 142.56, (8C_{ipso}), 148.26 (8C_{ipso}), 158.02 (2C_{ipso}). ¹⁵N NMR δ : –23.75. MS (API-ES), *m/z*: 843 (M+1). Analysis: Calcd. (%) for C₄₈H₃₈FeN₁₀O₂: C, 68.41; H, 4.54; N, 16.62. Found: C, 68.53; H, 4.59; N, 16.52.

[FePc(NH₂CH₂SiMe₃)₂] (**5**)

Mp 128–130 °C, dec. ¹H NMR (500.13 MHz, THF-*d*₈): δ –6.80 (t, 4H, ³J_{HH} 7.5 Hz, 2NH₂), –3.44 (t, 4H, ³J_{HH} 7.5 Hz, 2CH₂), –1.59 (s, 18H, 6CH₃), 7.89 (m, 8H, ArH), 9.25 (m, 8H, ArH). ¹³C NMR δ : –5.93 (6CH₃), 26.13 (2CH₂), 120.35 (8CAr), 126.75 (8CAr), 142.54 (8C_{ipso}), 148.04 (8C_{ipso}). ¹⁵N NMR δ : –50.79. ²⁹Si NMR δ : –2.54. MS (API-ES), *m/z*: 775 (M+1). Analysis: Calcd. (%) for C₄₆H₃₄FeN₁₀O₂: C, 62.00; H, 5.46; N, 18.08. Found: C, 61.90; H, 5.53; N, 18.23.

General procedure for the synthesis of complexes 6–7

Triethylphosphite (0.150–0.200 mmol) was added dropwise to a solution of **2** or **3** (0.150 mmol) in THF (5 mL). The reaction mixture was stirred at ambient temperature for 30 min after which time the dark green solution turned into deep blue. The resulting solution was filtered with Millipore Millex (Nylon 0.2 μ M), and then slowly concentrated under vacuum. The blue residue was washed with cold hexane, filtered, and dried under vacuum. This sequence was repeated one more time. Isolated yields were 71% (95 mg) and 68% (86 mg) for **6** and **7**, respectively. Alternatively, complexes **6** and **7** can be prepared *in situ* in an oven-dried 5 mm NMR tube, by just mixing equimolecular amounts of **2** or **3** (0.0170 or 0.0191 mmol) with triethylphosphite in deuterated THF (0.5 mL). After a few minutes the solution turns deep blue indicative of the desired transformation.

[FePc(NH₂(CH₂)₉CH₃)(P(OEt)₃)] (**6**)

Mp. 206–210 °C, dec. ¹H NMR (500.13 MHz, THF-*d*₈): δ –5.22 (sa, 2H, NH₂), –2.61 (sa, 2H, CH₂), –1.18 (sa, 2H, CH₂), –0.55 (sa, 2H, CH₂), –0.19 (t, 9H, ³J_{HH} 7.0 Hz, CH₃), 0.06 (sa, 2H, CH₂), 0.47 (sa, 2H, CH₂), 0.76 (sa, 2H, CH₂), 0.86 (sa, 3H, CH₃), 0.95 (sa, 2H, CH₂), 1.10 (sa, 2H, CH₂), 1.22 (sa, 2H, CH₂), 1.25 (m, 6H, OCH₂), 7.93 (m, 8H, ArH), 9.27 (m, 8H, ArH). ¹³C NMR δ : 13.49 (CH₃), 14.26 (d, ³J_{PC} 4.3 Hz, 3CH₃), 22.50 (CH₂), 24.95 (CH₂), 28.05 (CH₂), 28.78 (CH₂), 29.04 (CH₂), 29.39 (CH₂), 31.69 (CH₂), 31.96 (CH₂), 36.0 (NCH₂), 58.15 (d, ²J_{PC} 8.5 Hz, OCH₂), 120.40 (8CAr), 126.92 (8CAr), 141.84 (8C_{ipso}), 146.95 (8C_{ipso}). ¹⁵N NMR δ : –1.34 (*J*_{NH} 64 Hz), (*J*_{PN} 65.8 Hz). ³¹P NMR δ : 131.8. ⁵⁷Fe NMR δ : +6764 (*J*_{FeP} 79.2 Hz).

[FePc(NH₂CH₂Ph)(P(OEt)₃)] (**7**)

Mp. 188–190 °C, dec. ¹H NMR (500.13 MHz, THF-*d*₈): δ –4.82 (sa, 2H, NH₂), –1.70 (sa, 2H, CH₂), –0.32 (t, 9H, ³J_{HH} 6.8 Hz, CH₃), 1.12 (m, 6H, OCH₂), 4.92 (sa, 2H, ArH), 6.15 (sa, 2H, ArH), 6.29 (sa, 1H, ArH), 7.80 (m, 8H, ArH), 9.15 (m, 8H, ArH). ¹³C NMR δ : 12.30 (d, ³J_{PC} 4.4 Hz, 3CH₃), 38.30 (NCH₂), 56.29 (d, ²J_{PC} 9.1 Hz, OCH₂), 118.51 (8CAr), 124.21 (CAr), 124.90 (2CAr), 125.05 (8CAr), 125.96 (2CAr), 139.99 (8C_{ipso}), 140.66 (C_{ipso}), 145.14 (8C_{ipso}). ¹⁵N NMR δ : 3.45 (*J*_{NH} 67.6 Hz), (*J*_{PN} 62.2 Hz). ³¹P NMR δ : 131.6. ⁵⁷Fe NMR δ : +6794 (*J*_{FeP} 79.8 Hz).

Preparation of AP200/19 AlOOH-matrix

The preparation of the AP200/19 nanostructured matrix has been previously described^{14,38,41} as follows: 50 g of the aluminium oxide/hydroxide (AlOOH) DISPERSAL 100/2 (from Sasol GmbH, Hamburg, Germany) were dispersed for 15 min with vigorous mechanical stirring at a temperature of 20 °C in 948 g of doubly distilled water. The temperature was increased to 90 °C and stirring was continued for 15 min at this temperature to enable extensive dispersion in the form of AlOOH nanocrystals. The solid was filtered, washed three times with doubly distilled water and dried at 110 °C. The resulting solid (8 g) was added to a mixture of 63 g of doubly distilled water and 0.96 g of concentrated acetic acid 80% (from Aldrich Chemie, Buchs, Switzerland). The generated dispersion was exposed to ultrasounds for 3 min at 40 °C. Afterwards, 8 g of a solution of polyvinyl alcohol (PVA), 10% by weight and with a molecular weight of 85 000 to 146 000 (from Aldrich Chemie, Buchs, Switzerland), were added and the resulting coating solution was again exposed to ultrasounds for 3 min. Then, curtain coating was used to coat a transparent polyester (PET) support 175 μ m thick (from Dupont de Nemours) called P72 with 28.5 g m^{–2} of this solution at a temperature of 40 °C. The coated support was then dried for 60 min at a temperature of 30 °C.

Preparation and characterization of sensing films

To prepare the sensing films, 0.2 mL of a solution which contains a molar ratio 1 : 30 (I : NH₂R) or 1 : 30 : 15 (I : NH₂R : P(OEt)₃) was dropped by spin-coating technique on AP200/19 nanostructure at 450 rpm.

Owing to the fact that the membrane material is made from a suspension of nanodispersed particles (diameter smaller than

half of the wavelength of the visible light), the light beam is not scattered by the particles but passes the film. Such materials are recognized as “transparent”.

The sensing films were characterized measuring the $(A_0 - A_x)/A_0$ signal at λ_{\max} ; where A_0 is the absorbance of the film in synthetic air (50% RH and flow-rate of 200 mL min⁻¹) and A_x is the absorbance on exposure to NO₂ (1 ppm) during 300 s at 50% RH and flow-rate of 200 mL min⁻¹.

Acknowledgements

Financial support by the Ministerio de Educación y Ciencia (project CTQ2008-117BQU), Junta de Andalucía (projects P07-FQM-2625 and P07-FQM-2738), and the Ramón y Cajal program (IF) are gratefully acknowledged. AVN thanks the Ministerio de Educación for the financial support of his grant (reference AP2006-01147).

References

- (a) X. Han and P. L. Naeher, *Environ. Int.*, 2006, **32**, 106; (b) See also [www.ec.gc.ca/cleanair-airpur\(NOx-WS489FEE7D-1_En.htm\)](http://www.ec.gc.ca/cleanair-airpur(NOx-WS489FEE7D-1_En.htm).
- M. Ammann, M. Kalberer, D. T. Jost, L. Tobler, E. Rossler, D. Piguet, H. W. Gaggeler and U. Baltensperger, *Nature*, 1998, **395**, 157.
- S. J. Mechery and J. P. Singh, *Anal. Chim. Acta*, 2006, **557**, 123.
- O. S. Wolfbeis, *Fiber Optic Chemical Sensors and Biosensors*, 1991, CRC Press.
- (a) N. B. Mckeowon, *Phthalocyanine Materials-Synthesis, Structure and Functions*, Cambridge University Press, Cambridge, 1998; (b) D. V. Stynes, *Pure Appl. Chem.*, 1988, **60**, 561; (c) M. Hanack and M. Lang, *Adv. Mater.*, 1994, **6**, 819; (d) G. Torre, C. G. Claessens and T. Torres, *Chem. Commun.*, 2007, 2000.
- (a) R. Taube, *Pure Appl. Chem.*, 1974, **38**, 427; (b) A. B. P. Lever, *J. Porphyrins Phthalocyanines*, 2004, **8**, 1327.
- (a) A. Rugemer, S. Reiss, A. Geyer, M. Schickfus, S. Hunklinger and Sens, *Sens. Actuators, B*, 1999, **56**, 45; (b) S. Dogo, J. P. Germain, C. Maleysson and A. Pauly, *Thin Solid Films*, 1992, **219**, 251; (c) R. Rella, A. Serra, P. Siciliano, A. Tepore, L. Valli and A. Zocco, *Supramol. Sci.*, 1997, **4**, 461; (d) A. K. Hassan, A. K. Ray, J. R. Travis, Z. Ghassemloooy, M. J. Cook, A. Abass, R. A. Collins and Sens, *Sens. Actuators, B*, 1998, **49**, 235; (e) Q. Zhou and R. D. Gould, *Thin Solid Films*, 1998, **317**, 436; (f) S. Capone, S. Mongelli, R. Rella, P. Siciliano and L. Valli, *Langmuir*, 1999, **15**, 1748; (g) M. Rapp, D. Binz, I. Kabbe, M. Vonshickfus, S. Hunklinger, H. Fuchs, W. Schrepp and B. Fleischmann, *Sens. Actuators, B*, 1991, **4**, 103; (h) J. M. Rooney and E. A. H. Hall, *Anal. Chem.*, 2004, **76**, 6861.
- S. J. Mechery and J. P. Singh, *Anal. Chim. Acta*, 2006, **557**, 123.
- T. Tanaka, A. Gilleux, T. Ohyama, Y. Yamada and Y. Maruo, *Sens. Actuators, B*, 1999, **56**, 247.
- A. S. Andrawis, J. B. Santiago, *Conference on Optical Fiber Communications, National Fiber Optic Engineers Conference*, 2006, 1–6, 639.
- J. Cerón-Solis and E. de la Rosa, *Fiber Integr. Opt.*, 2007, **26**, 335.
- E. Comini, C. Baratto, G. Faglia, M. Ferroni and G. Sberveglieri, *J. Phys. D: Appl. Phys.*, 2007, **40**, 7255.
- M. Alexy, M. Hanko, S. Rentmeister and J. Heinze, *Sens. Actuators, B*, 2006, **114**, 916.
- J. F. Fernández-Sánchez, I. Fernández, R. Steiger, R. Beer, R. Cannas and U. E. Spichiger-Keller, *Adv. Funct. Mater.*, 2007, **17**, 1188.
- J. J. Watkins and A. L. Balch, *Inorg. Chem.*, 1975, **14**, 2720.
- I. Fernández, P. S. Pregosin, A. Albinati, S. Rizzato, U. E. Spichiger-Keller, T. Nezel and J. F. Fernández-Sánchez, *Helv. Chim. Acta*, 2006, **89**, 1485.
- (a) J. E. Maskasky, J. R. Mooney and M. E. Kenney, *J. Am. Chem. Soc.*, 1972, **94**, 2132; (b) J. E. Maskasky and M. E. Kenney, *J. Am. Chem. Soc.*, 1973, **95**, 1443; (c) C. K. Choy, J. R. Mooney and M. E. Kenney, *J. Magn. Reson.*, 1979, **35**, 1; (d) U. Keppeler, W. Kobel, H-U. Siehl and M. Hanack, *Chem. Ber.*, 1985, **118**, 2095.
- (a) A nitrogen-15 chemical shift range from 0 to -100 ppm can be established for amine complexes of transition metals. See for instance; (b) J. Mason, *Chem. Rev.*, 1981, **81**, 205; (c) J. Mason, (Ed.), *Nitrogen, Multinuclear NMR*, Plenum Press: New York, 1987, pp 354, Chapt.12.
- (a) N. Juranic and R. L. Lichter, *Inorg. Chim. Acta*, 1982, **62**, 131; (b) N. Juranic and R. L. Lichter, *J. Am. Chem. Soc.*, 1983, **105**, 406; (c) G. W. Buchanan, *Tetrahedron*, 1989, **45**, 581; (d) N. Juranic and S. Macura, *Inorg. Chim. Acta*, 1994, **217**, 213.
- (a) M. Witanowski, L. Stefaniak and G. A. Webb, *Ann. Rep. NMR Spectrosc.*, 1981, **11b**, 1; (b) W. Philipsborn and R. Müller, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 1986, **98**, 381; (c) L. Stefaniak, G. A. Webb and M. Witanowski, *Annu. Rep. NMR Spectrosc.*, 1986, **18**, 3; (d) L. Stefaniak, G. A. Webb and M. Witanowski, *Annu. Rep. NMR Spectrosc.*, 1993, **25**, 1; (e) B. Milani, A. Marson, E. Zangrando, G. Mestroni, J. M. Ernsting and C. J. Elsevier, *Inorg. Chim. Acta*, 2002, **327**, 188.
- S. A. Delp, C. Munro-Leighton, C. Khosla, J. L. Templeton, N. M. Alsop, T. B. Gunnoe and T. R. Cundari, *J. Organomet. Chem.*, 2009, **694**, 1549.
- S. Affolter and P. S. Pregosin, *J. Organomet. Chem.*, 1990, **398**, 197.
- (a) S. J. Berners-Price, M. J. DiMartino, D. T. Hill, R. Kuroda, M. A. Mazid and P. J. Sadler, *Inorg. Chem.*, 1985, **24**, 3425; (b) P. S. Pregosin, R. Rüedi and C. Anklin, *Magn. Reson. Chem.*, 1986, **24**, 255; (c) S. J. Berners-Price, K. Morden, S. J. Opella and P. J. Sadler, *Magn. Reson. Chem.*, 1986, **24**, 734; (d) L. Carlton and R. Weber, *Magn. Reson. Chem.*, 1997, **35**, 817.
- (a) R. L. Lichter and J. D. Roberts, *J. Am. Chem. Soc.*, 1972, **94**, 2495; (b) Y. A. Shahab and R. A. Khalil, *Spectrochim. Acta, Part A*, 2006, **65**, 265, and references cited therein.
- (a) R. Binn, in *Transition Metal Nuclear Magnetic Resonance*, P. S. Pregosin, Ed, Elsevier: New York: 1991; (b) W. Philipsborn, *Pure Appl. Chem.*, 1986, **58**, 513; (c) G. A. Webb, *Annu. Rep. NMR Spectrosc.*, 1991, 23; (d) W. Philipsborn, *Chem. Soc. Rev.*, 1999, **28**, 95.
- (a) R. Binn and C. Brevard, *J. Am. Chem. Soc.*, 1986, **108**, 5622; (b) R. Binn, H. Brenneke, A. Frings, H. Lehmkuhl, G. Mehler, A. Rufinska and T. Wildt, *J. Am. Chem. Soc.*, 1988, **110**, 5661; (c) R. Binn and A. Rufinska, *Magn. Reson. Chem.*, 1988, **26**, 895.
- (a) E. J. M. Meier, W. Kozminski and W. Philipsborn, *Magn. Reson. Chem.*, 1996, **34**, 89; (b) E. J. M. Meier, W. Kozminski, A. Linden, P. Lustenberger and W. Philipsborn, *Organometallics*, 1996, **15**, 2469.
- (a) B. Wrackmeyer, O. L. Tok and M. Herberhold, *Organometallics*, 2001, **20**, 5774; (b) B. Wrackmeyer, O. L. Tok, A. Ayazi, F. Hertel and M. Z. Herberhold, *Naturforsch. B: Chem. Sci.*, 2002, **57b**, 305; (c) B. Wrackmeyer, O. L. Tok, A. Ayazi, H. E. Maisel and M. Herberhold, *Magn. Reson. Chem.*, 2004, **42**, 827; (d) B. Wrackmeyer, E. V. Klimkina, W. Milius, M. Siebenburger, O. L. Tok and M. Herberhold, *Eur. J. Inorg. Chem.*, 2007, 103; (e) B. Wrackmeyer, E. V. Klimkina, H. E. Maisel, O. L. Tok and M. Herberhold, *Magn. Reson. Chem.*, 2008, **46**, 30.
- (a) L. M. Mink, J. R. Polam, K. A. Christensen, M. A. Bruck and F. A. Walker, *J. Am. Chem. Soc.*, 1995, **117**, 9329, and references cited therein.
- (a) L. M. Epstein, D. K. Straub and C. Maricondi, *Inorg. Chem.*, 1967, **6**, 1720; (b) B. W. Dale, R. J. R. Williams, P. R. Edwards and C. E. Johnson, *Trans. Faraday Soc.*, 1968, **64**, 620; (c) D. C. Grenoble and H. G. Drickamer, *J. Chem. Phys.*, 1971, **55**, 1624; (d) R. Taube, *Pure Appl. Chem.*, 1974, **38**, 427; (e) B. R. James, J. R. Sams, T. B. Tsin and K. J. Reimer, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1978, 746; (f) G. V. Ouedraogo, C. More, Y. Richard and D. Benlian, *Inorg. Chem.*, 1981, **20**, 4387; (g) F. Calderazzo, S. Frediani, B. R. James, G. Pampaloni, K. J. Reimer, J. R. Sams, A. M. Serra and D. Vitali, *Inorg. Chem.*, 1982, **21**, 2302; (h) P. Coppens and L. Li, *J. Chem. Phys.*, 1984, **81**, 1983; (i) V. Valenti, P. Fantucci, F. Cariati, G. Micera, M. Pettrera and N. Burriesci, *Inorg. Chim. Acta*, 1988, **148**, 191; (j) V. N. Nemykin, A. E. Polshina, V. Y. Chernii, E. V. Polshin and N. Kobayashi, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 2000, 1019.
- (a) D. A. Sweigart, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 1976, 1476.
- P. Laszlo, in *NMR of Newly Accessible Nuclei*, P. Laszlo, Ed.; Academic Press: New York 1983; Vol 2, pp 259.
- (a) Heme proteins: L. Baltzer, E. D. Becker, R. G. Tschudin and O. A. Gansow, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1985, 1040; (b) H. C. Lee, J. K. Gard, T. L. Brown and E. Oldfield, *J. Am. Chem. Soc.*, 1985, **107**, 4087; (c) J. Chung, H. C. Lee and E. J. Oldfield, *Magn. Reson.*, 1990, **90**, 148; (d) Heme models: T. Nozawa, M. Sato, M. Hatano, N. Kobayashi and T. Osa, *Chem. Lett.*, 1983, 1289; (e) L. Baltzer, E. D. Becker, B. A. Averill, J. M. Hutchinson and O. A. Gansow, *J. Am. Chem. Soc.*, 1984, **106**, 2444; (f) L. Baltzer and M. J. Landergren, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1987, 32; (g) L. Baltzer and M. Landergren, *J. Am. Chem. Soc.*, 1990, **112**, 2804; (h) M. Landergren and L. Baltzer, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, 1992, 355; (i) L. M. Mink, K. A. Christensen and F. A.

- Walker, *J. Am. Chem. Soc.*, 1992, **114**, 6930; (j) I. P. Gerotheranassis, C. G. Kalodimos, G. E. Hawkes and P. J. Haycock, *J. Magn. Reson.*, 1998, **131**, 163; (k) C. G. Kalodimos, I. P. E. Gerotheranassis, Rose, G. E. Hawkes and R. Pierattelli, *J. Am. Chem. Soc.*, 1999, **121**, 2903.
- 34 $J(^{57}\text{Fe},^{15}\text{N}) \sim 8$ Hz: see T. Nozawa, M. Sato, M. Hatano, N. Kobayashi and T. Osa, *Chem. Lett.*, 1983, 1289. $J(^{57}\text{Fe},^{13}\text{C}) \sim 27$ Hz: see; G. N. LaMar, C. M. Dellinger and S. S. Sankar, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1985, **128**, 628. $J(^{57}\text{Fe},^{31}\text{P}) \sim 45$ Hz: see ref. 29.
- 35 See ref. 16 for the X-ray structure of **2**. The solid state structure of **4** obeys almost identical features than **2**.
- 36 (a) 4-Methylpyridine: T. Kobayashi, F. Kurokoawa, T. Ashida, N. E. Uyeda and Suito, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1971, 1631; (b) F. Cariati, F. Morazzoni and M. Zocchi, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 1978, 10184-Methylpiperidine: V. N. Nemykin, N. Kobayashi, V. Y. Chernii and V. K. Belsky, *Eur. J. Inorg. Chem.*, 2001, 733Pyridine: J. Janczak and R. Kubiak, *Inorg. Chim. Acta*, 2003, **342**, 64.
- 37 Patents WO2006119986 - EP1722223 (A1).
- 38 R. Steiger, R. Beer, J. F. Fernandez-Sanchez and U. E. Spichiger-Keller, *Solid State Phenom.*, 2007, **121–123**, 1193.
- 39 J. F. Fernández-Sánchez, T. Nezel, R. Steiger and U. E. Spichiger-Keller, *Sens. Actuators, B*, 2006, **113**, 630.
- 40 M-S. Liao, T. Kar, S. M. Gorun and S. Scheiner, *Inorg. Chem.*, 2004, **43**, 7151.
- 41 Patent US6156419, 2000.

OCTAHEDRAL IRON (II) PHTHALOCYANINE COMPLEXES: MULTINUCLEAR NMR AND RELEVANCE AS NO₂ CHEMICAL SENSORS

Pascual Oña Burgos,[†] María Casimiro,[†] Ignacio Fernández^{†,*} Angel Valero Navarro,[‡] Jorge F. Fernández
Sánchez,^{‡,*} Antonio Segura Carretero,[‡] Alberto Fernández Gutiérrez[‡]

[†] *Área de Química Orgánica, Universidad de Almería, Carretera de Sacramento s/n, 04120, Almería, Spain.*

[‡] *Department of Analytical Chemistry, University of Granada. Av. Fuentenueva s/n, 18071, Granada, Spain.*

Contents:

- Figure 1. ¹H NMR (500.13 MHz) spectrum of **4** in THF-*d*₈.
- Figure 2. ¹³C NMR (125.7 MHz) spectrum of **4** in THF-*d*₈.
- Figure 3. ¹H NMR (500.13 MHz) spectrum of **5** in THF-*d*₈.
- Figure 4. ¹³C NMR (125.7 MHz) spectrum of **5** in THF-*d*₈.
- Figure 5. ¹H NMR (500.13 MHz) spectrum of **6** in THF-*d*₈.
- Figure 6. ³¹P NMR (202.4 MHz) spectrum of **6** in THF-*d*₈.
- Figure 7. ¹H, ¹⁵N gHMQC NMR spectrum of **6** in THF-*d*₈.
- Figure 8. ³¹P, ⁵⁷Fe HMQC NMR spectrum of **6** in THF-*d*₈.
- Figure 9. ¹H NMR (500.13 MHz) spectrum of **7** in THF-*d*₈.
- Figure 10. ³¹P NMR (202.4 MHz) spectrum of **7** in THF-*d*₈.
- Figure 11. ¹³C NMR (75.5 MHz) spectrum of **7** in THF-*d*₈.
- Figure 12. ¹H, ¹⁵N gHMQC NMR spectrum of **7** in THF-*d*₈.
- Figure 13. ³¹P, ⁵⁷Fe HMQC NMR spectrum of **7** in THF-*d*₈.
- Figure 14. Calibration curve for the NO₂sensing film.
- Figure 15. Stability graphs as a function of time & temperature for sensing layers containing **4-5**.
- Figure 16. Stability graphs as a function of time & temperature for sensing layers containing **6-7**.
- Figure 17. ¹H NMR of the THF cocktail based on **1**:benzylamine in the ratio 1:30.
- Figure 18. ¹H NMR of the THF cocktail based on **1**:benzylamine:P(OEt)₃ in the ratio 1:30:15.
- Figure 19. Molecular absorption spectra for the THF cocktails for **2-5**.
- Figure 20. Molecular absorption spectra for the cocktails for **6** and **7**.
- Figure 21. Molecular absorption spectra for complex **7** in THF solution and incorporated into the film

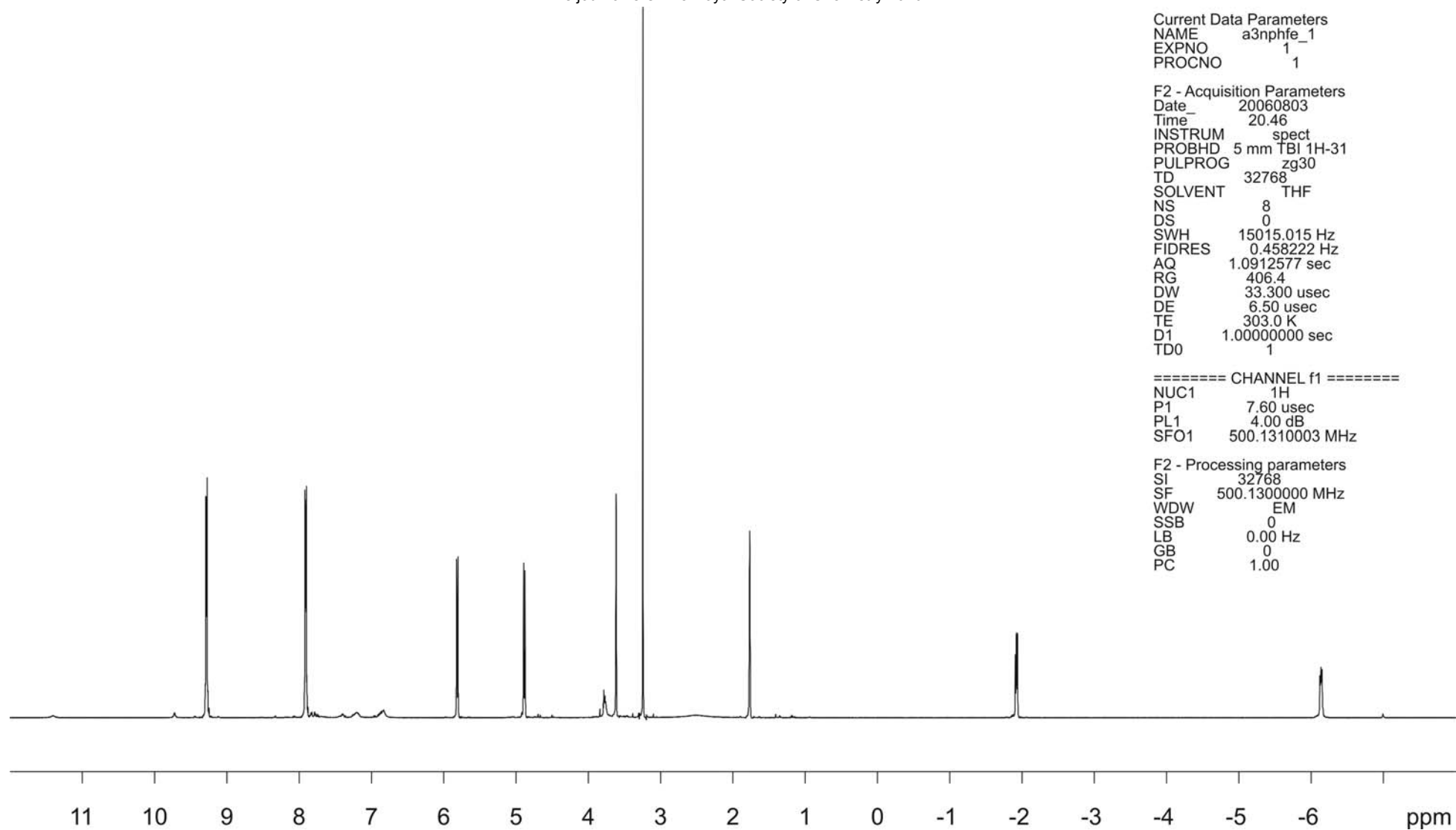


Figure 1. ^1H NMR (500.13 MHz) spectrum of **4** in $\text{THF-}d_8$.

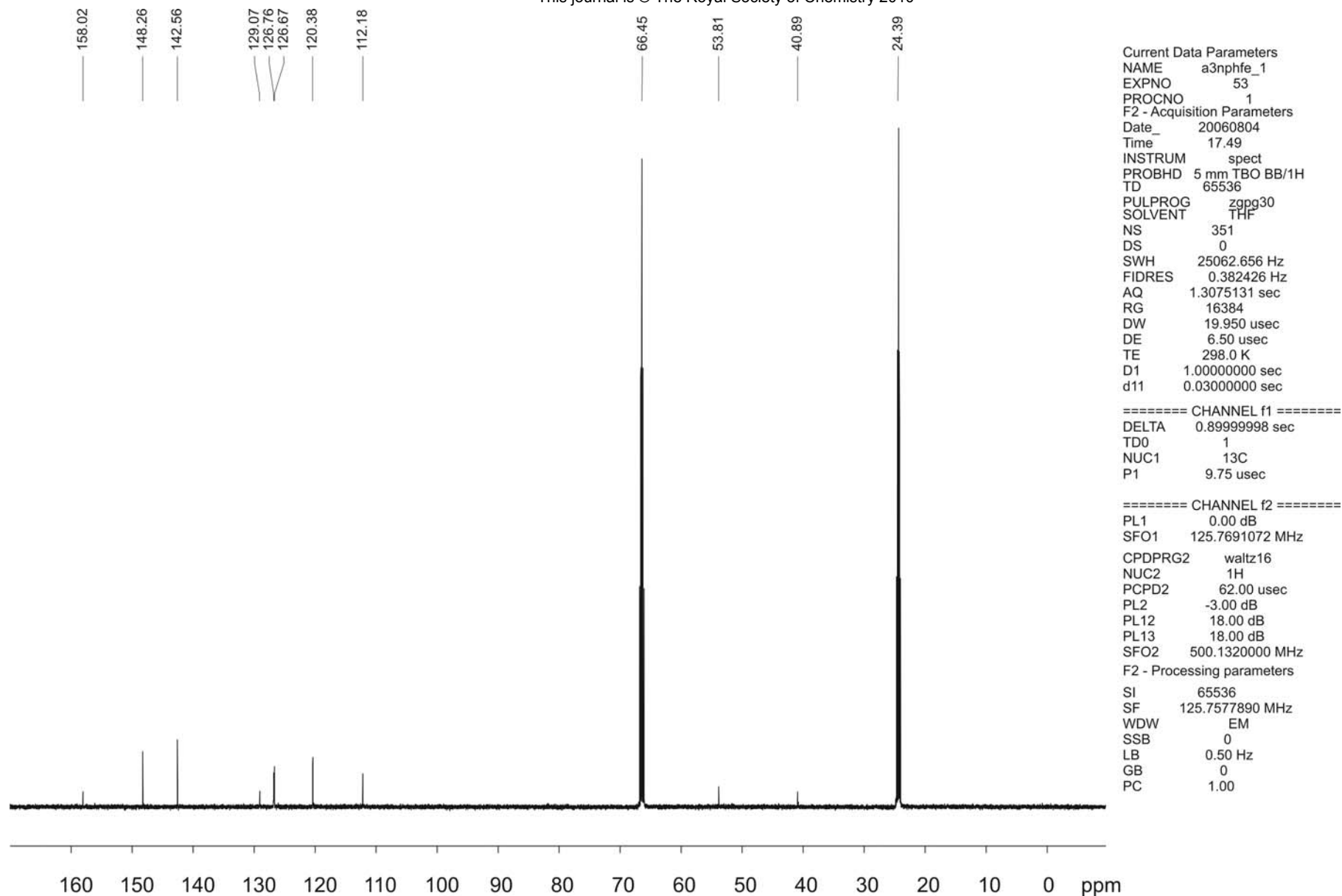


Figure 2. ^{13}C NMR (125.7 MHz) spectrum of **4** in $\text{THF-}d_8$.

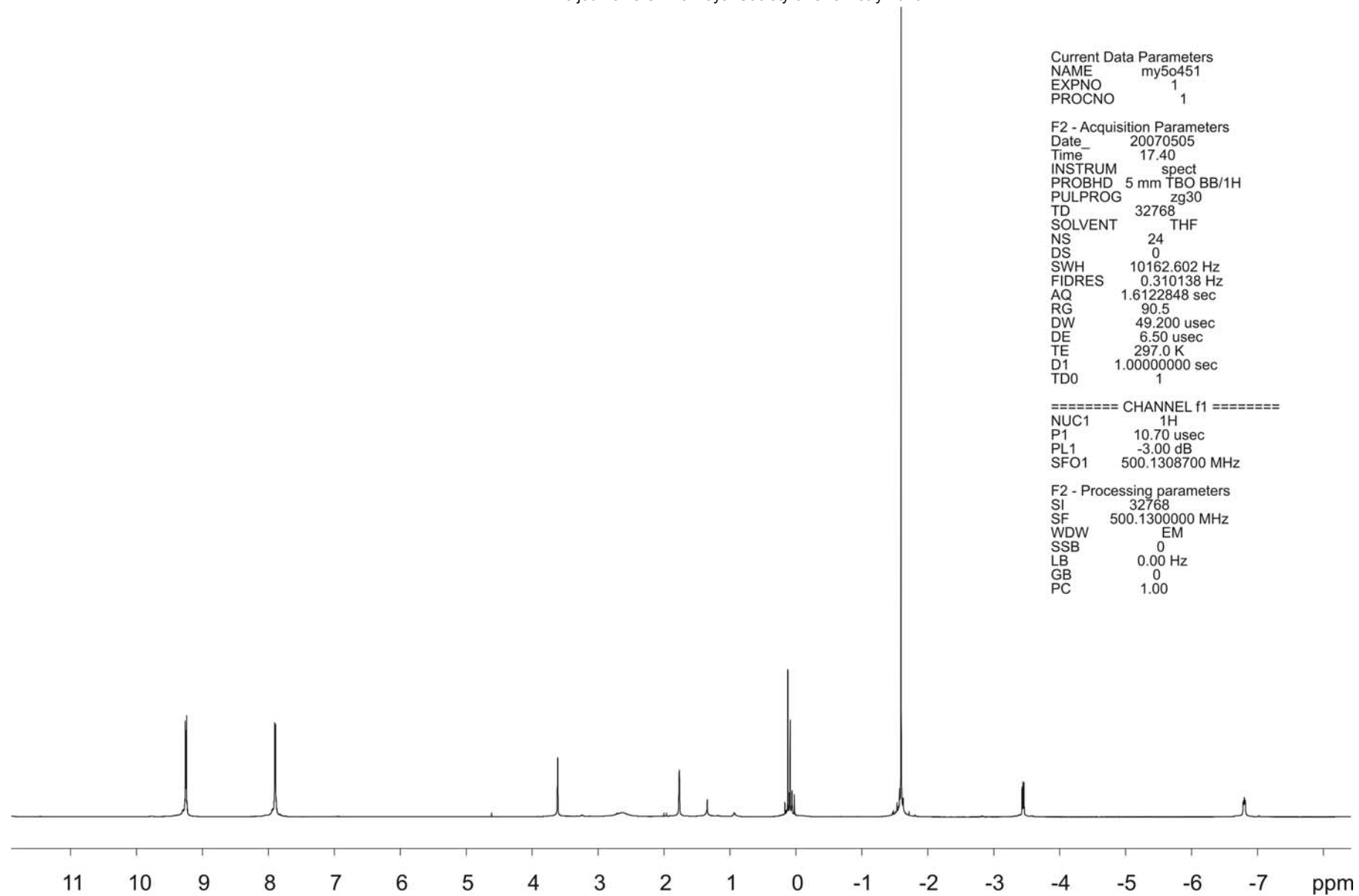


Figure 3. ^1H NMR (500.13 MHz) spectrum of **5** in $\text{THF-}d_8$.

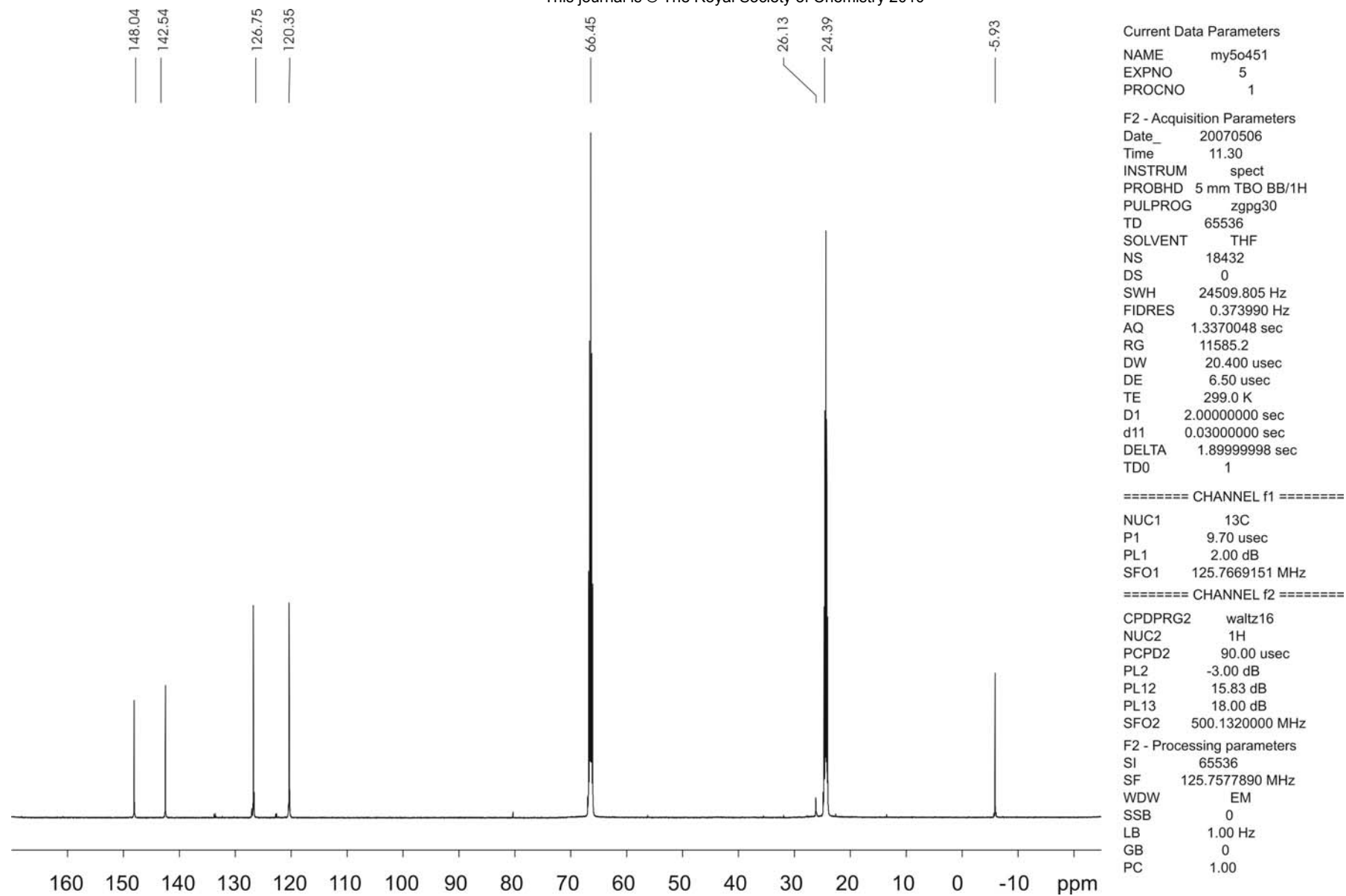


Figure 4. ^{13}C NMR (125.7 MHz) spectrum of **5** in $\text{THF-}d_8$.

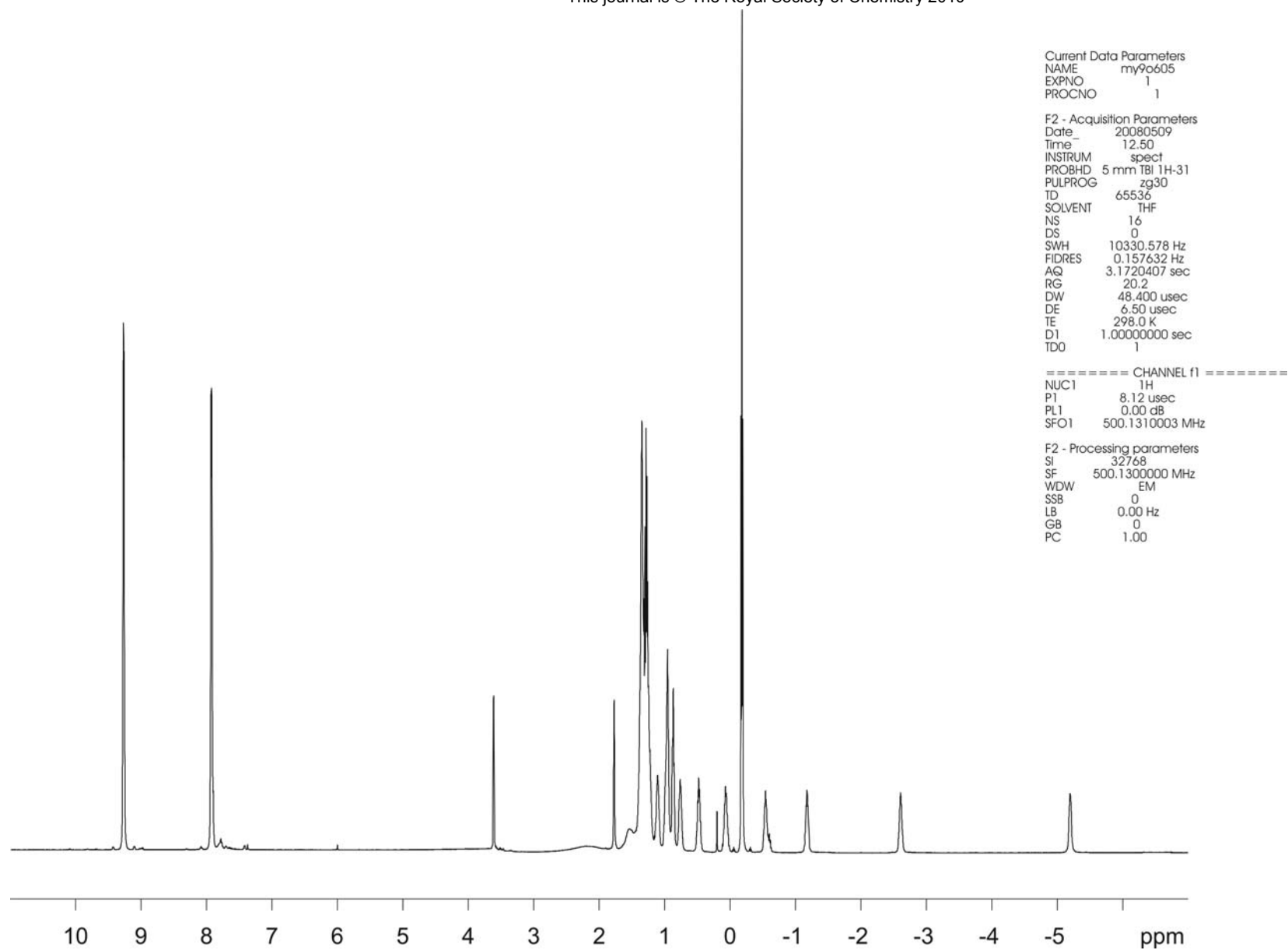


Figure 5. ^1H NMR (500.13 MHz) spectrum of **6** in $\text{THF-}d_8$.

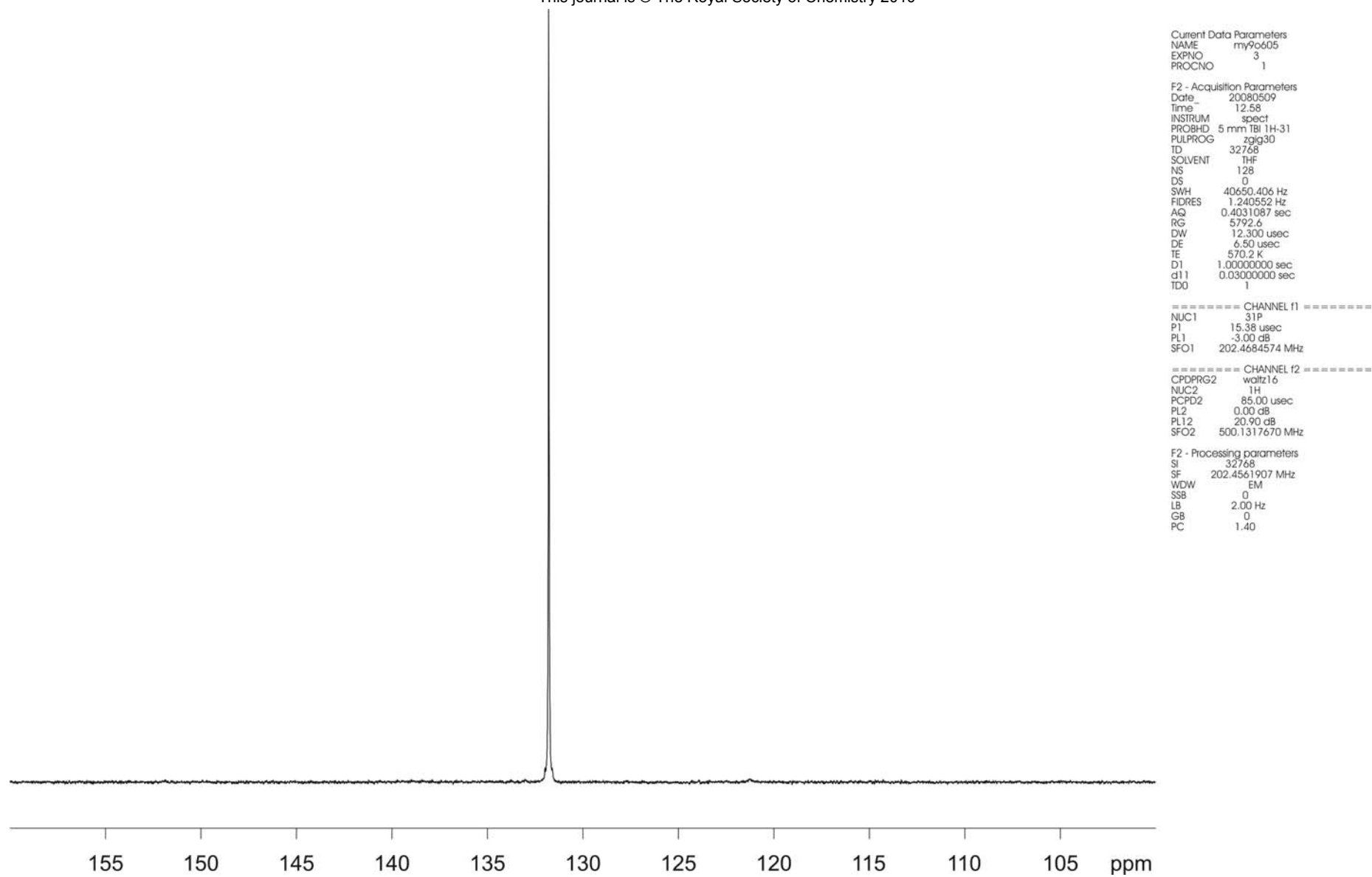


Figure 6. ^{31}P NMR (202.4 MHz) spectrum of **6** in THF- d_8 .

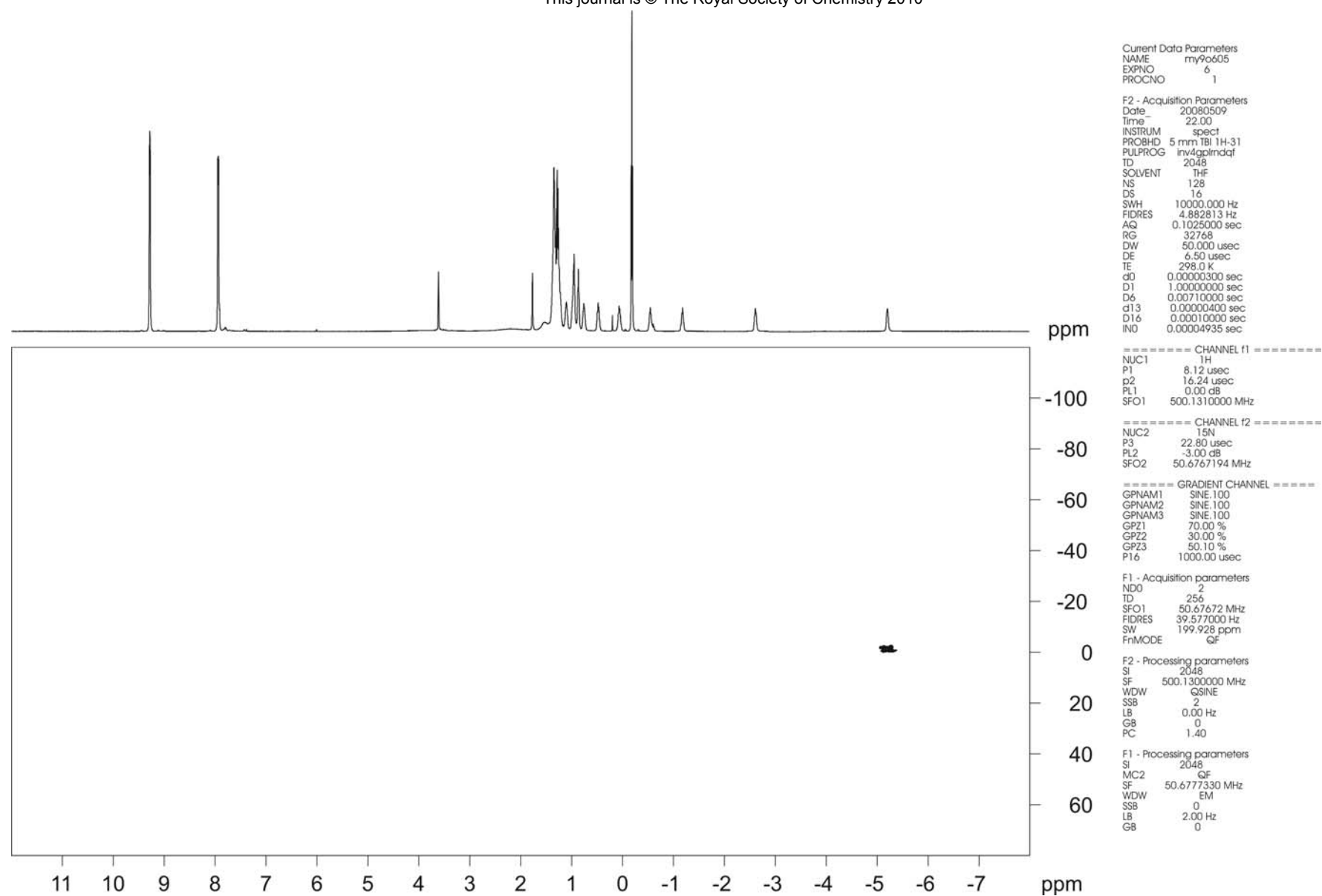


Figure 7. ^1H , ^{15}N gHMQC NMR spectrum of **6** in $\text{THF-}d_8$.

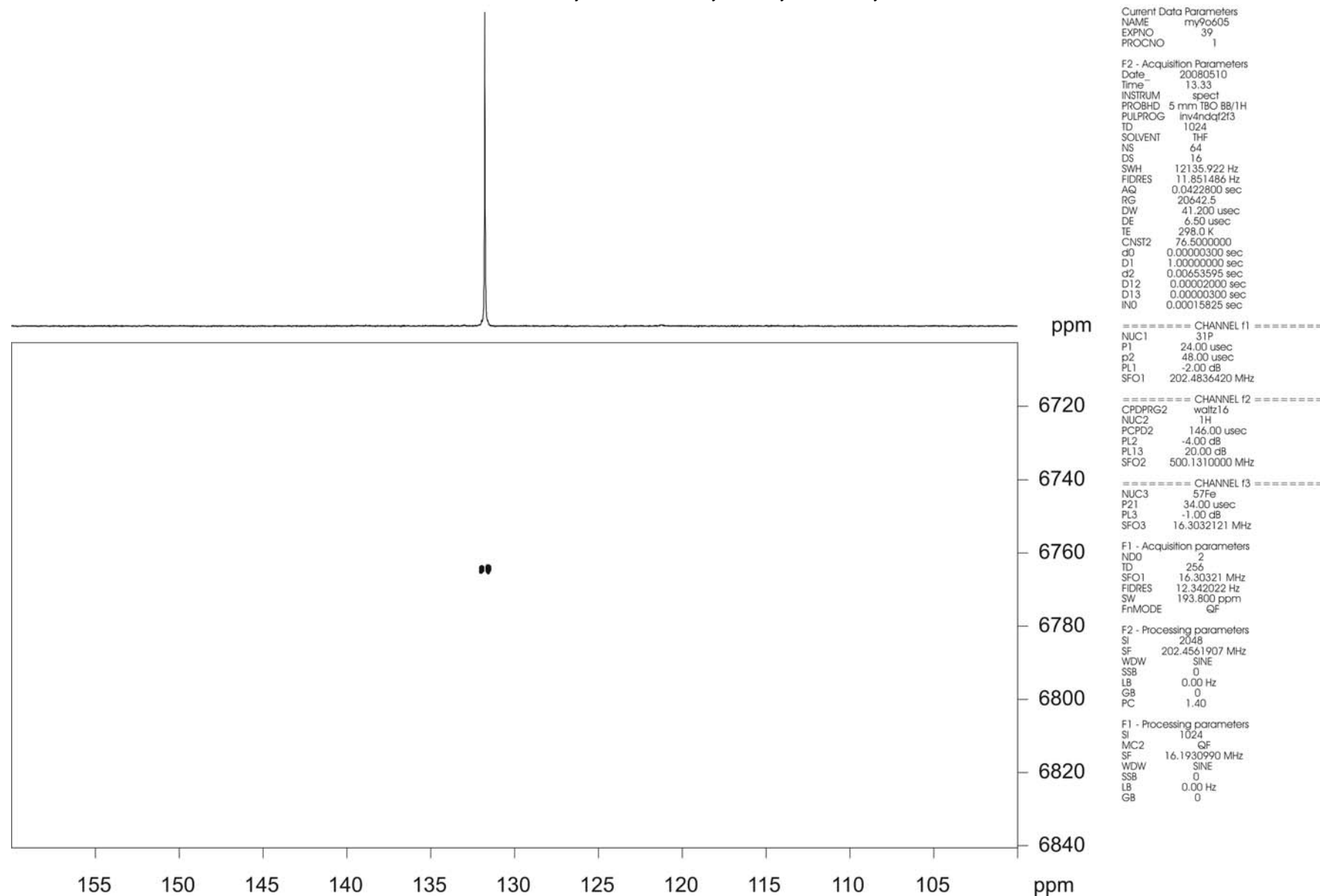


Figure 8. ^{31}P , ^{57}Fe HMQC NMR spectrum of **6** in $\text{THF-}d_8$.

Current Data Parameters
NAME my11o606
EXPNO 1
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20080511
Time 11.13
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm TBO BB/1H
PULPROG zg30
TD 65536
SOLVENT THF
NS 8
DS 0
SWH 10330.578 Hz
FIDRES 0.157632 Hz
AQ 3.1720407 sec
RG 6.3
DW 48.400 usec
DE 6.50 usec
TE 298.0 K
D1 1.00000000 sec
TDO 1

==== CHANNEL f1 =====
NUC1 1H
P1 10.70 usec
PL1 -3.00 dB
SFO1 500.1310000 MHz

F2 - Processing parameters
SI 32768
SF 500.1300000 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 0.00 Hz
GB 0
PC 1.00

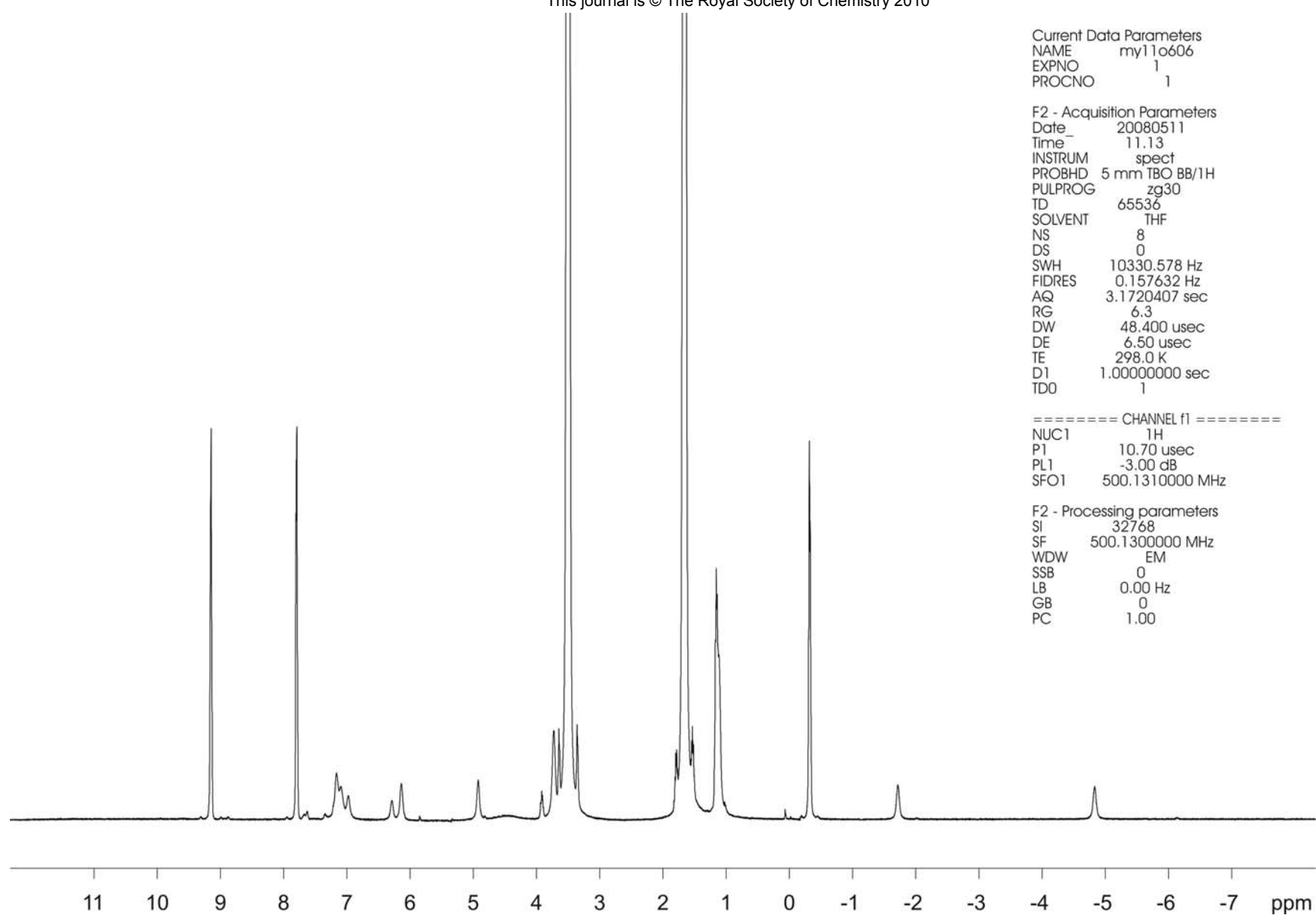


Figure 9. ^1H NMR (500.13 MHz) spectrum of **7** in THF.

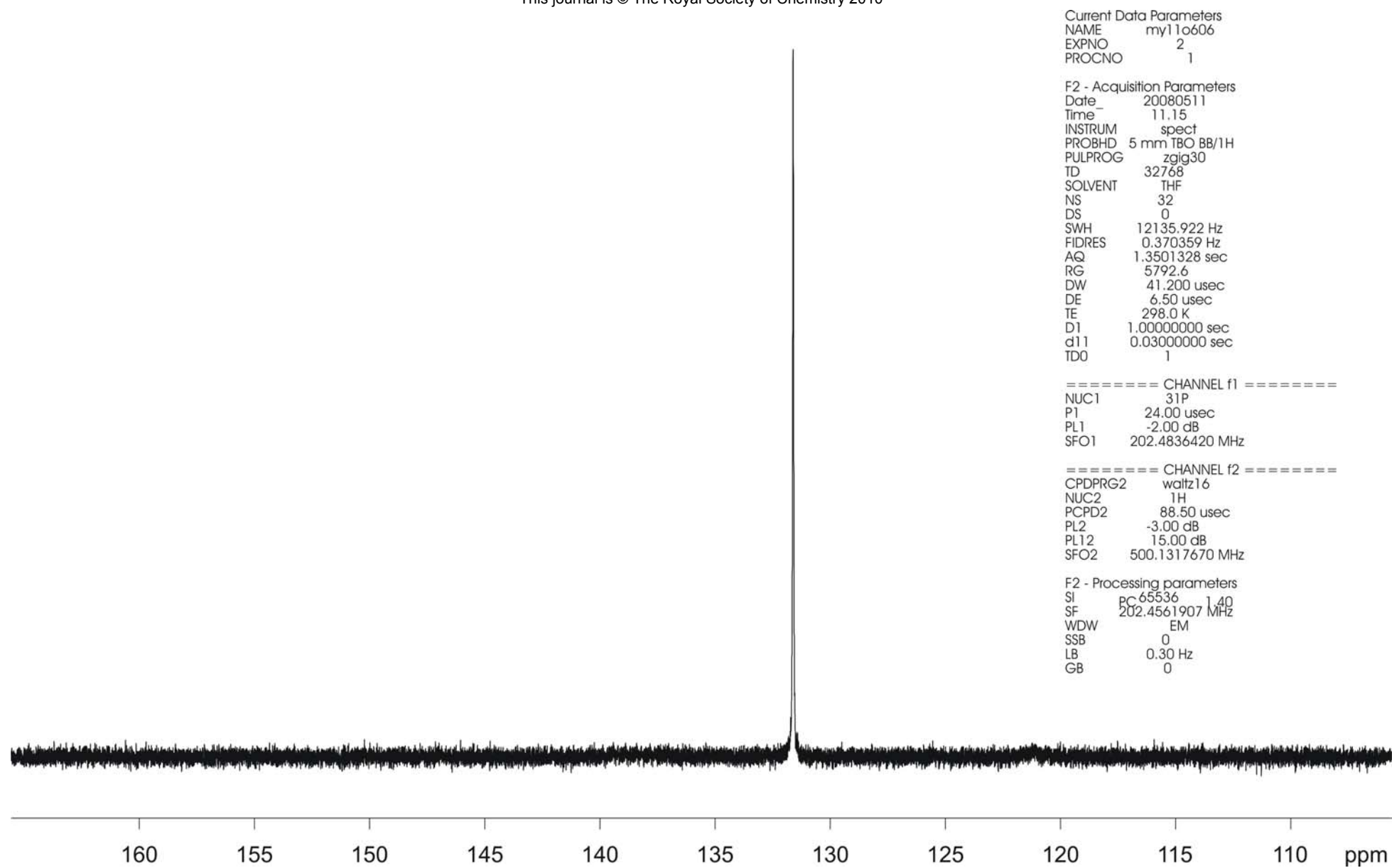


Figure 10. ^{31}P NMR (202.4 MHz) spectrum of **7** in THF.

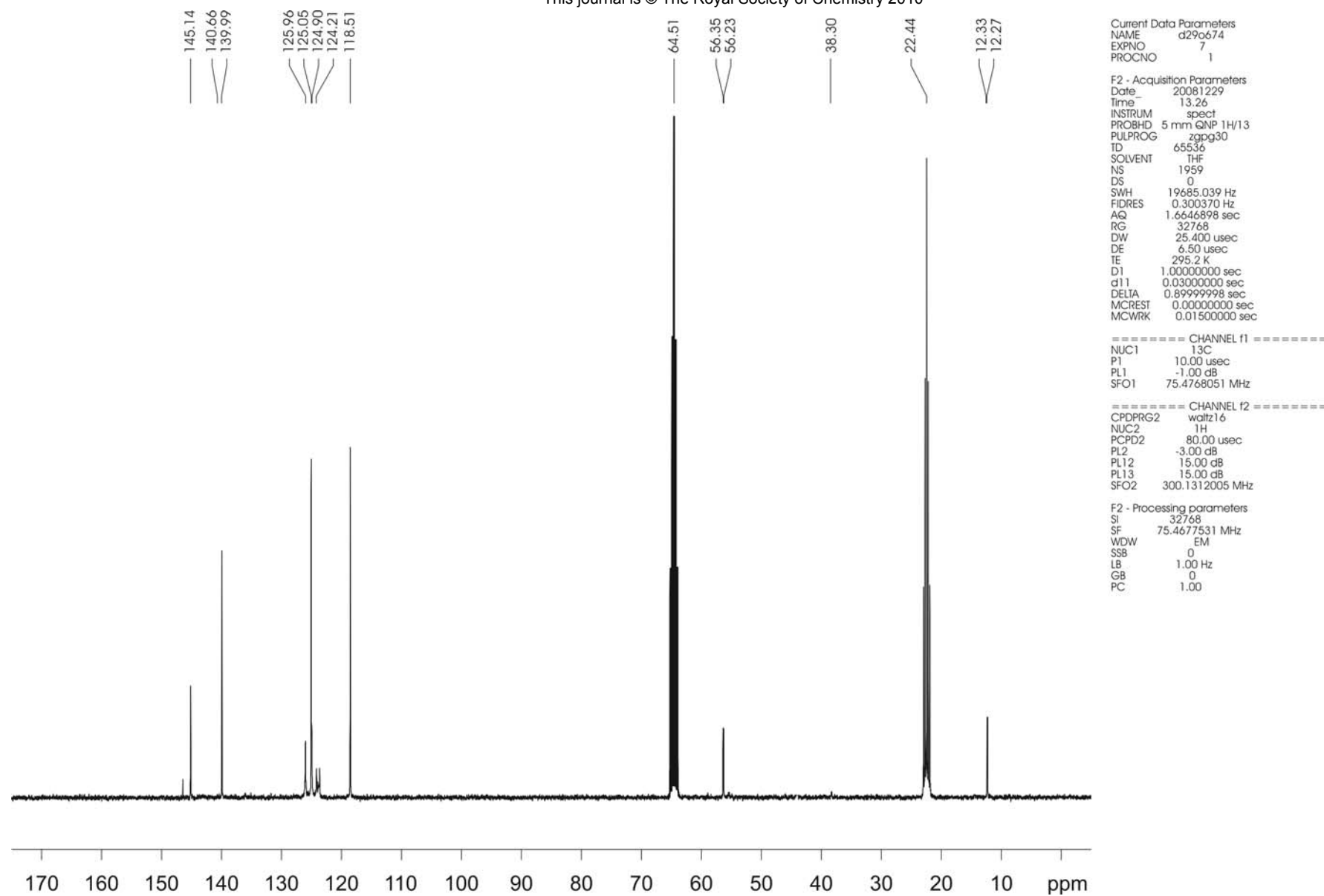


Figure 11. ^{13}C NMR (75.5 MHz) spectrum of **7** in $\text{THF-}d_8$.

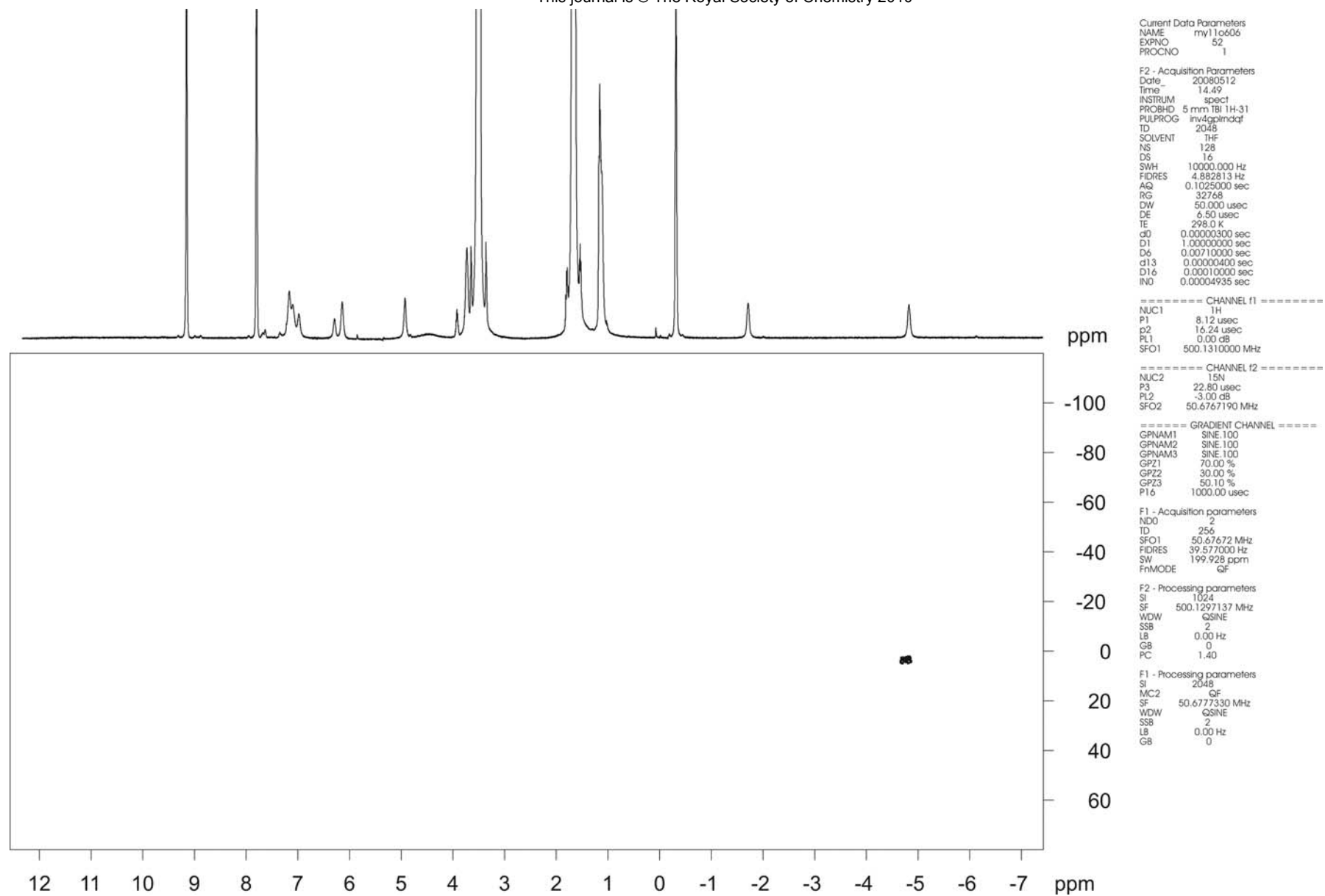


Figure 12. ^1H , ^{15}N gHMQC NMR spectrum of **7** in THF.

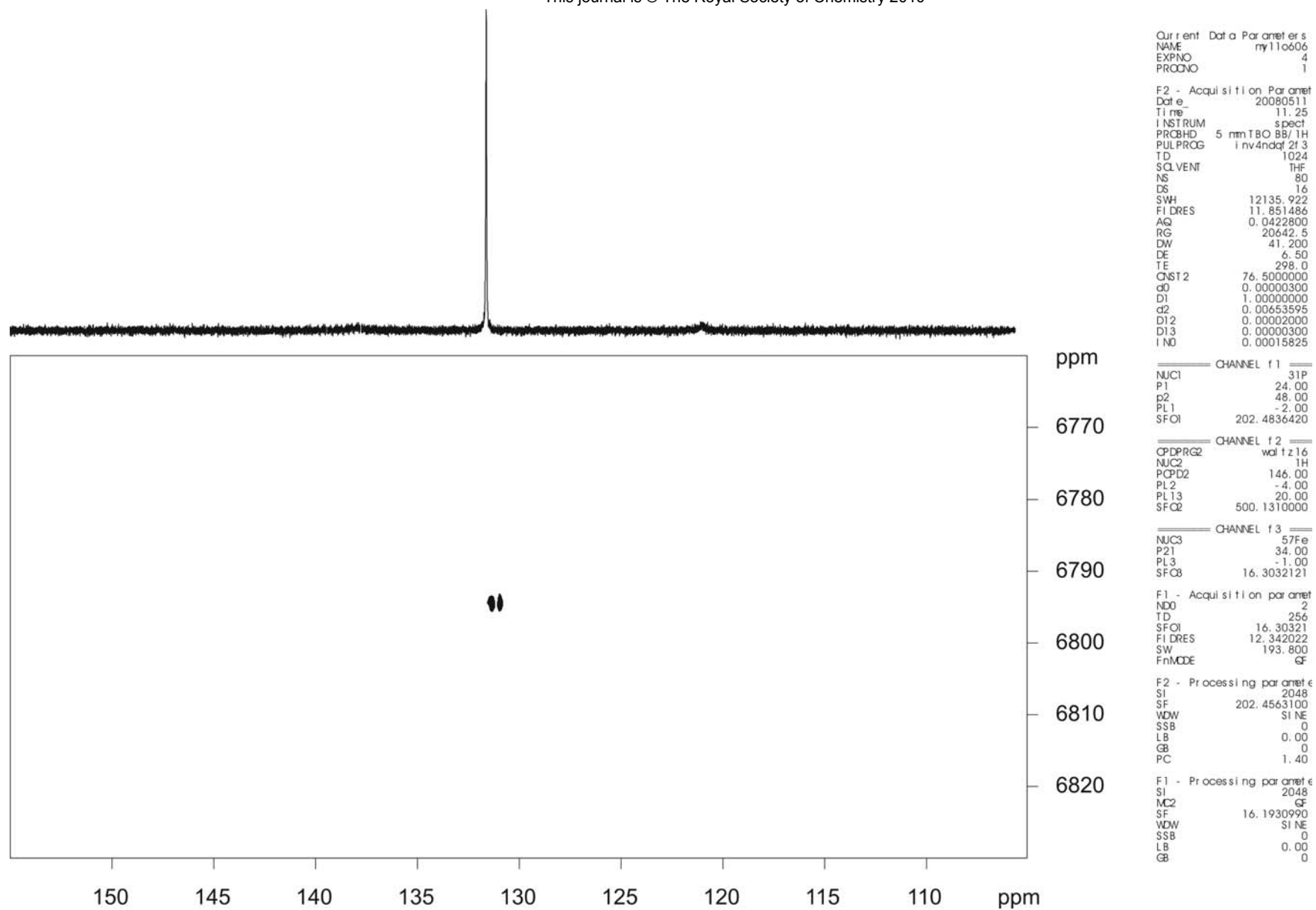


Figure 13. ^{31}P , ^{57}Fe HMQC NMR spectrum of **7** in THF.

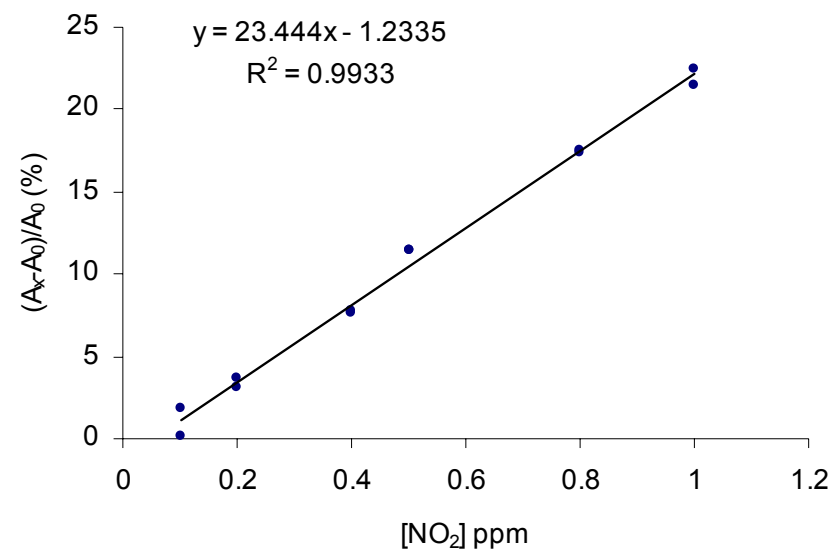


Figure 14. Calibration curve of complex 7 immobilized into AP200/19 for NO₂; the calculated LOD is 1.2 ppb. A₀ is the absorbance before exposure to NO₂ and A_x is the absorbance upon exposure to NO₂ for 300 s in air with 50% RH at a flow rate of 200 mL min⁻¹.

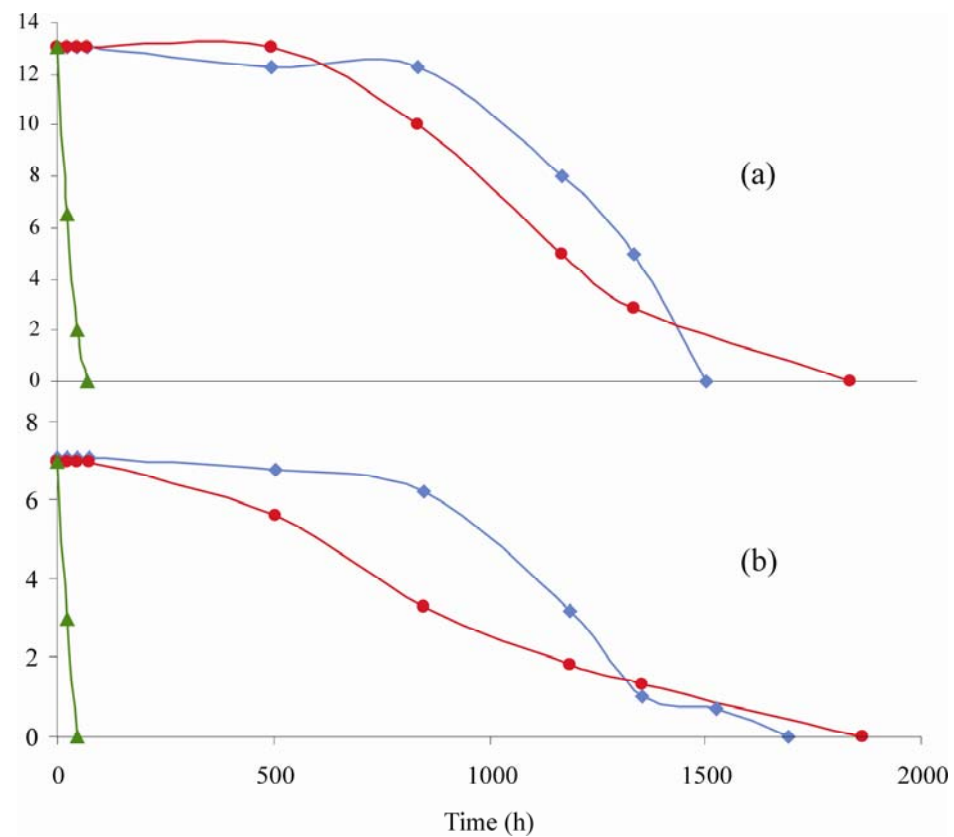


Figure 15. Stability studies at (♦) 4°C, (●) 25°C and (▲) 60°C for sensing layers containing a) complex 4, and b) complex 5, incorporated into AP200/19. A_0 is the absorbance before exposure to NO_2 and A_x is the absorbance upon exposure to NO_2 for 300 s in air with 50% RH.

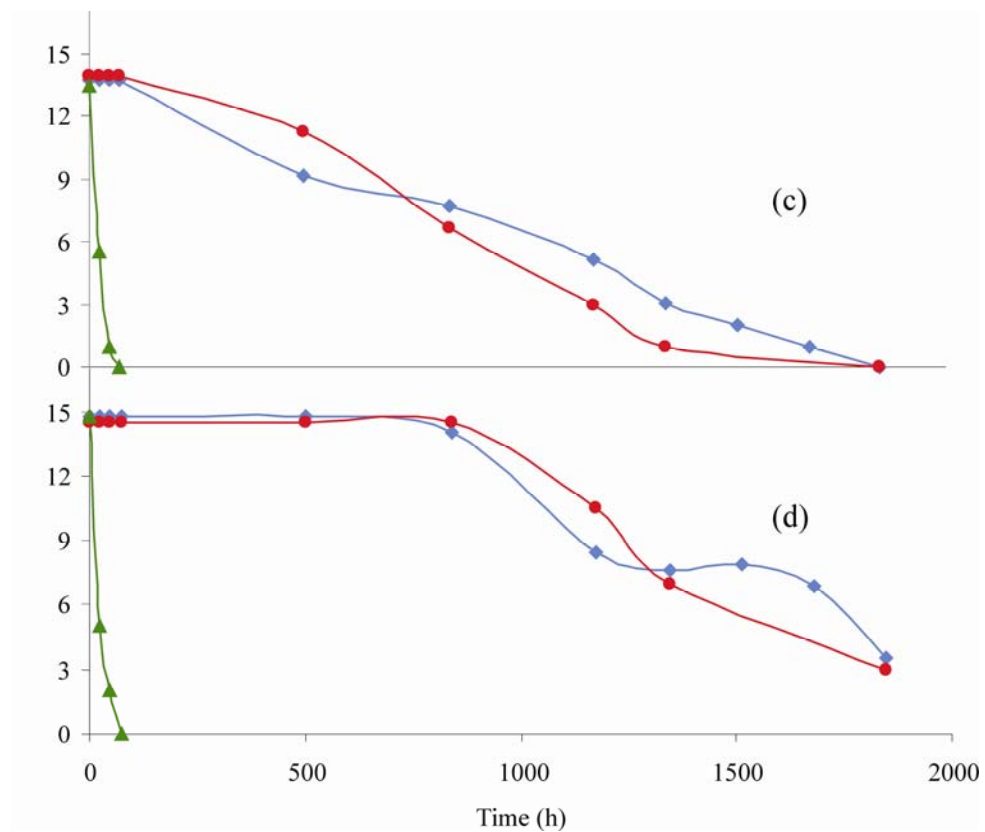


Figure 16. Stability studies at (♦) 4°C, (●) 25°C and (▲) 60°C for sensing layers containing a) complex 6, and b) complex 7, incorporated into AP200/19. A_0 is the absorbance before exposure to NO₂ and A_x is the absorbance upon exposure to NO₂ for 300 s in air with 50% RH.

¹H, j23mt+b, 1:30

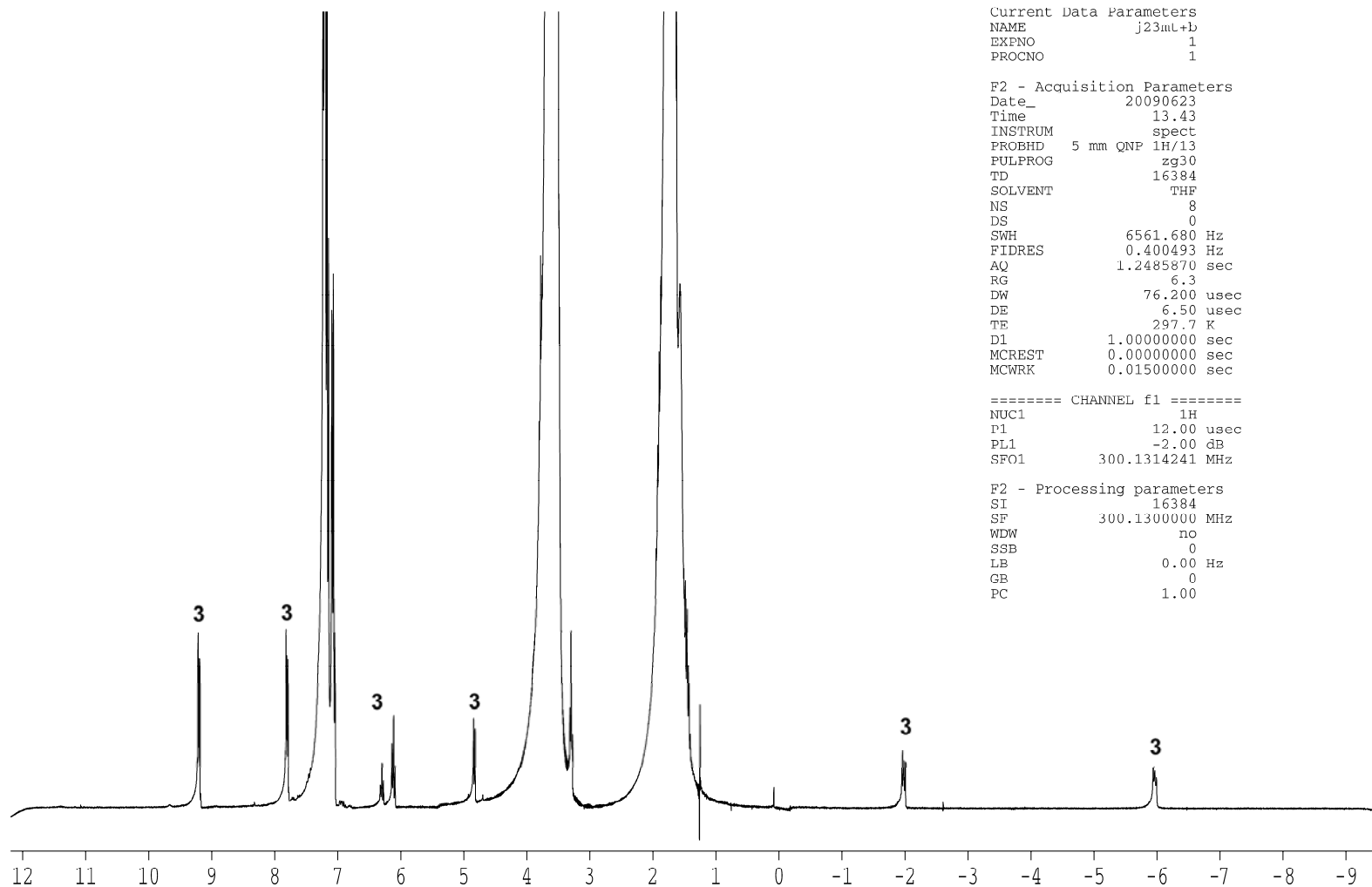


Figure 17. ¹H NMR of the THF cocktail based on **1**:benzylamine, in the ratio 1:30. Complex **3** can be clearly identified among THF and benzylamine signals.

¹H, j23mt+b+f, 1:30:15

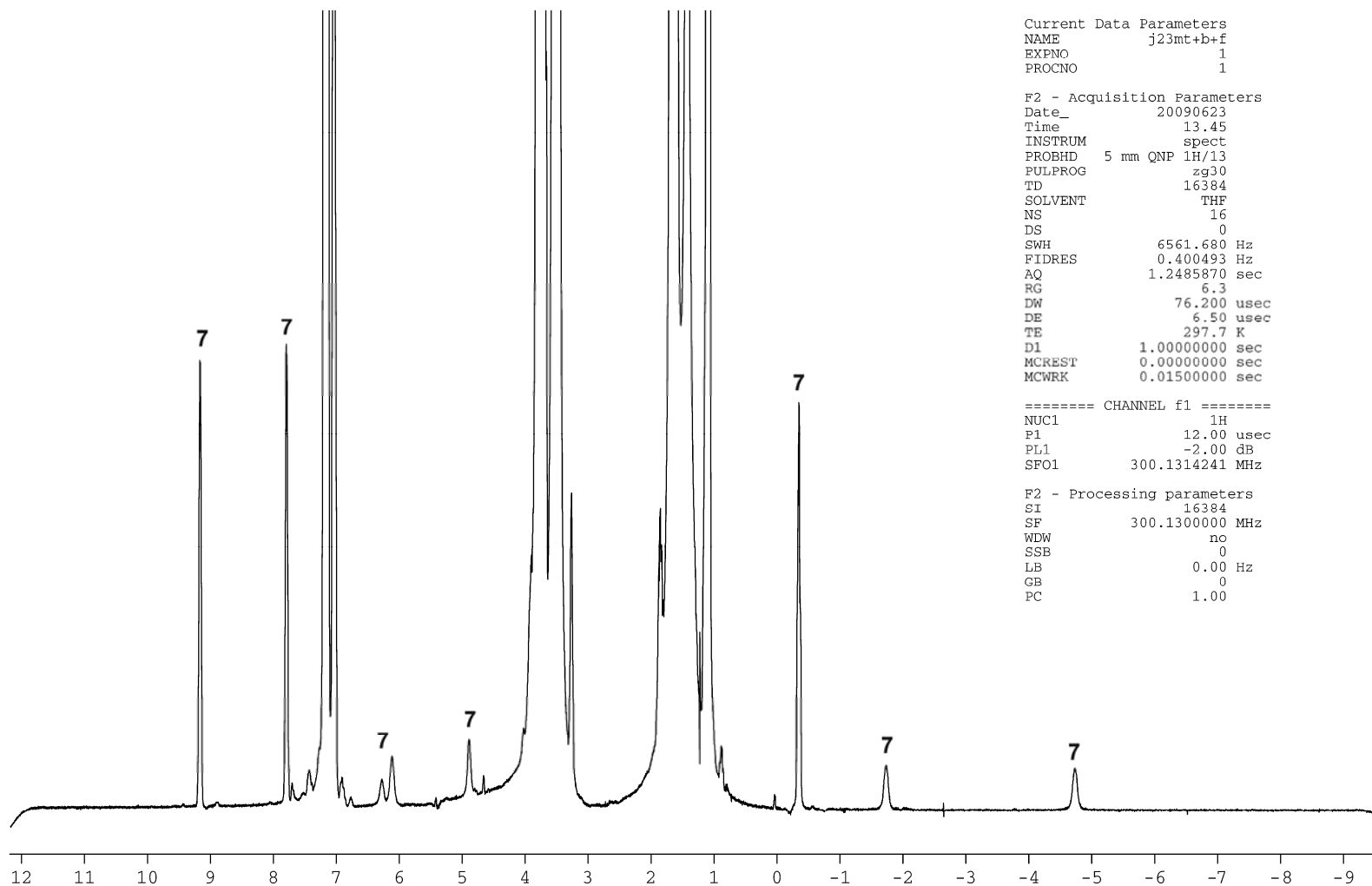


Figure 18. ¹H NMR of the THF cocktail based on **1**:benzylamine:P(EtO)₃, in the ratio 1:30:15. Complex **7** can be clearly identified among THF, benzylamine, and triethylphosphite signals.

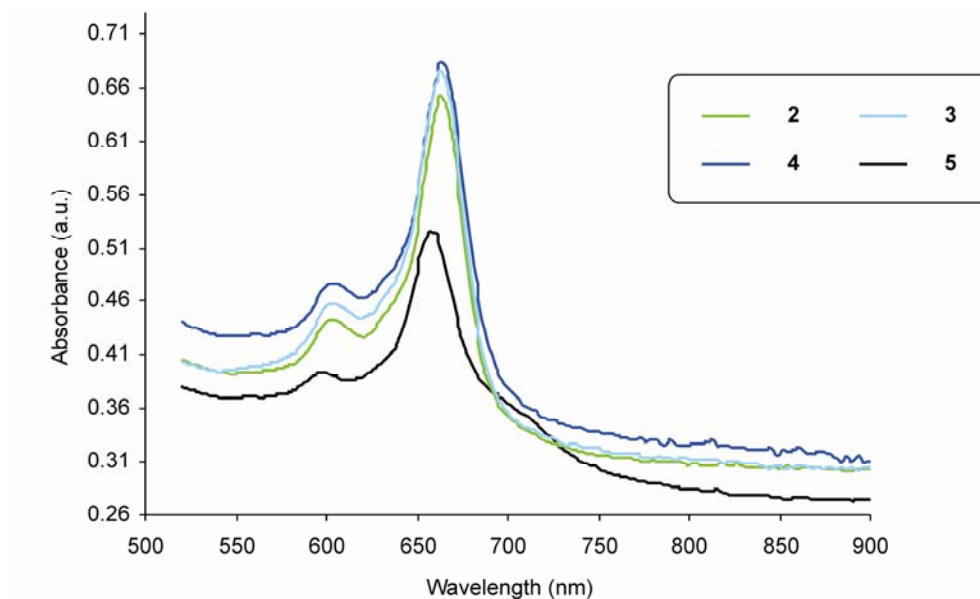


Figure 19. Absorption spectra of complexes **2-5** (FePc:amine molar ratio 1:30) immobilized into AP200/19 in air with 50% RH and at flow-rate of 200 mL min⁻¹.

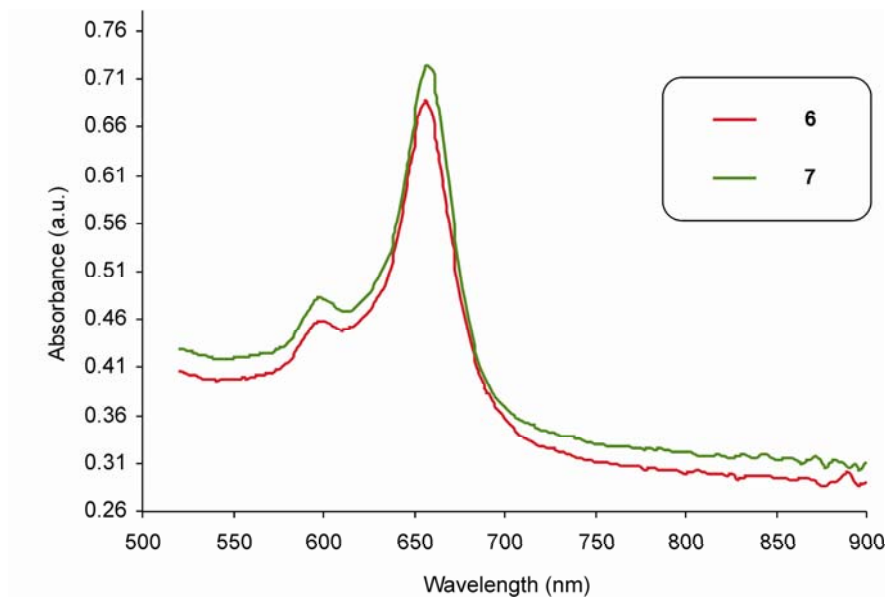


Figure 20. Absorption spectra of the cocktails for complexes **6** and **7** formation (FePc:amine:P(OEt)₃ molar ratio 1:30:15) immobilized into AP200/19 in air with 50% RH and at flow-rate of 200 mL min⁻¹.

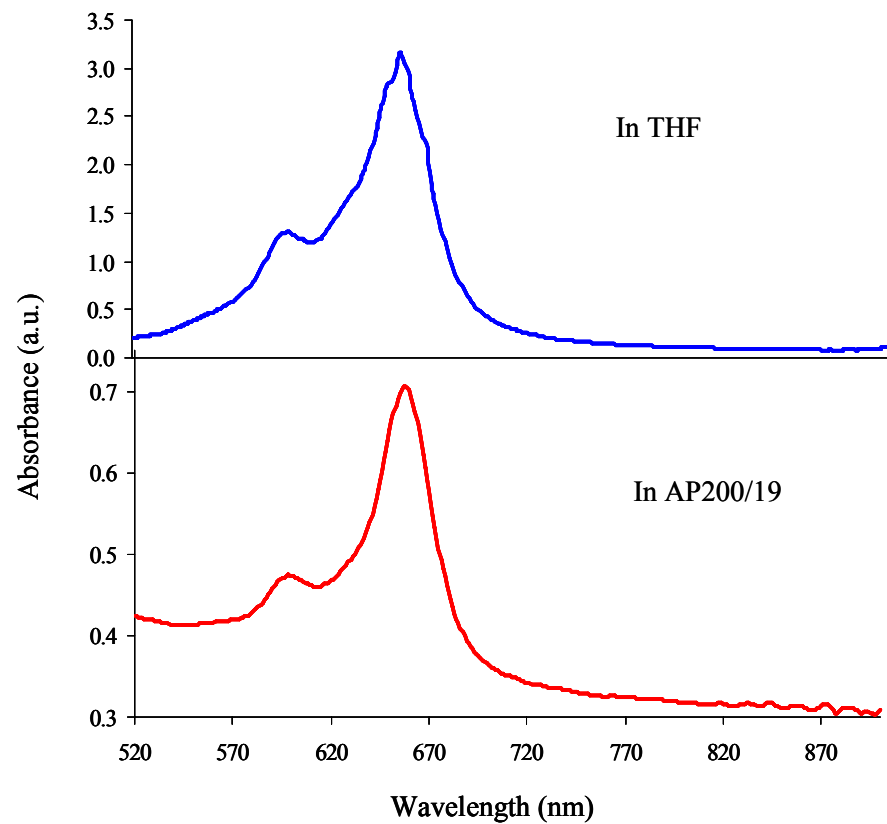


Figure 21. Absorption spectra of complex **7** in THF solution (top) and incorporated into AP200/19 (bottom).

BIV.9. Conclusiones del bloque IV

1. Se ha llevado a cabo una revisión, en forma de *Highlight*, de la investigación que ha sido desarrollada, durante los últimos años, por nuestro grupo de investigación en el desarrollo de fases sensoras basadas en la deposición de ftalocianinas de hierro (FePc) sobre soportes nanoestructurados de óxidos metálicos, para la detección óptica de NO₂. Se ha revisado tanto los efectos de las variables químicas que influyen en la generación estas membranas sensoras, como de las características analíticas que ofrecen en función del tipo de compuesto empleado y de soporte utilizado en su deposición. Además, se han descrito las futuras perspectivas enfocadas a la mejora de las características analíticas de estos elementos sensores.
2. Se han sintetizado nuevas FePc modificando la naturaleza de los ligandos que pueden unir para dar lugar a nuevos complejos octaédricos. Estos nuevos complejos han sido caracterizados estructuralmente mediante RMN multinuclear (¹H, ¹³C, ¹⁵N, ³¹P, ⁵⁷Fe), han sido depositados sobre membranas nanoestructuradas de óxidos metálicos (AP200/19) y evaluados como fases sensoras para la detección de NO₂. La membrana generada con el nuevo complejo mixto FePc(P(OEt)₃) DA mostró la mejor reversibilidad, sensibilidad (LD y LC = 1.2 y 4.0 ppb, respectivamente) y termoestabilidad en el rango de 4-25 °C, mejorando todos los resultados previos obtenidos por nuestro grupo de investigación en este campo.

BIV.10. Bibliografía del bloque IV

1. Marazuela, M. D.; Moreno-Bondi, M. C. Fiber-optic biosensors - an overview. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2002**, 372, 664-682.

2. Fernández Gutiérrez, A.; Schulman, S. G. *Fosforescencia molecular analítica: una aproximación práctica*; Ed. Universidad de Granada: Granada, 2001.
3. Mustafa, M. G.; Nrigau, J. O., Simmons, M. S., Eds.; Wiley & Sons: New York, 1994, pp 351–404.
4. Parmet, S.; Lynn, C.; Glass, R. M. JAMA patient page. Health effects of ozone. *Jama* **2003**, *290*, 1944.
5. Gent, J. F.; Triche, E. W.; Holford, T. R.; Belanger, K.; Bracken, M. B.; Beckett, W. S.; Leaderer, B. P. Association of low-level ozone and fine particles with respiratory symptoms in children with asthma. *Jama-Journal of the American Medical Association* **2003**, *290*, 1859-1867.
6. Bascom, R.; Bromberg, P. A.; Costa, D. A.; Devlin, R.; Dockery, D. W.; Frampton, M. W.; Lambert, W.; Samet, J. M.; Speizer, F. E.; Utell, M. Health effects of outdoor air pollution. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* **1996**, *153*, 3-50.
7. Chauhan, A. J.; Krishna, M. T.; Frew, A. J.; Holgate, S. T. Exposure to nitrogen dioxide (NO₂) and respiratory disease risk. *Reviews on Environmental Health* **1998**, *13*, 73-90.
8. Weiss, D. S.; Abkowitz, M. Advances in Organic Photoconductor Technology. *Chemical Reviews*, *110*, 479-526.
9. Burat, A. K.; Koca, A.; Lewtak, J. P.; Gryko, D. T. Synthesis, physicochemical properties and electrochemistry of morpholine-substituted phthalocyanines. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines*, *14*, 605-614.
10. Mamuru, S. A.; Ozoemena, K. I. Iron (II) tetrakis(diaquaplatinum) octacarboxyphthalocyanine supported on multi-walled carbon nanotubes as effective

- electrocatalyst for oxygen reduction reaction in alkaline medium. *Electrochemistry Communications*, *12*, 1539-1542.
11. Rodriguez-Mendez, M. L.; de Saja, J. A. Nanostructured thin films based on phthalocyanines: electrochromic displays and sensors. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines* **2009**, *13*, 606-615.
 12. Rodriguez-Mendez, M. L.; Gay, M.; de Saja, J. A. New insights into sensors based on radical bisphthalocyanines. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines* **2009**, *13*, 1159-1167.
 13. Basova, T.; Hassan, A.; Yuksel, F.; Gurek, A. G.; Ahsen, V. Optical detection of pentachlorophenol in water using thin films of octa-tosylamido substituted zinc phthalocyanine. *Sensors and Actuators B-Chemical*, *150*, 523-528.
 14. Valli, L. Phthalocyanine-based Langmuir-Blodgett films as chemical sensors. *Advances in Colloid and Interface Science* **2005**, *116*, 13-44.
 15. Valero-Navarro, A.; Fernandez-Sanchez, J. F.; Segura-Carretero, A.; Spichiger-Keller, U. E.; Fernandez-Gutierrez, A.; Oña, P.; Fernandez, I. Iron-phthalocyanine complexes immobilized in nanostructured metal oxide as optical sensors of NO_x and CO: NMR and photophysical studies. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines* **2009**, *13*, 616-623.
 16. Berkowitz, J. Photoelectron spectroscopy of phthalocyanine vapors. *The Journal of Chemical Physics* **1979**, *70*, 2819-2828.
 17. Cariati, F.; Morazzoni, F.; Zocchi, M. Coordination bond properties in phthalocyaninatometal(ii) complexes.1. Stereochemistry and bond properties in bis(4-methylpyridine)-phthalocyaninatometal(ii)-4-methylpyridine (1/2) (metal = cobalt or iron). *Journal of the Chemical Society-Dalton Transactions* **1978**, 1018-1024.

CONCLUSIONES GENERALES
MAIN CONCLUSIONS

CONCLUSIONES GENERALES DE LA TESIS

1. Se ha desarrollado un test de screening rápido y sencillo para detectar HAPs en aguas que evita el uso de metodologías costosas y que requieren un mayor tiempo de análisis. Para ello, se ha utilizado un optosensor para la detección de benzo(a)pireno (indicador de la presencia de otros HAPs), previamente diseñado por nuestro grupo de investigación. El test reconoce muestras contaminadas con HAPs muy rápidamente (150 s), de forma muy sencilla y con una concentración umbral de 10 ng l⁻¹. Para demostrar la aplicabilidad de método se llevó a cabo un análisis de muestras de agua obtenidas de diferentes puntos de la Antártida (campana del verano austral 2003-2004) y los resultados se compararon con los obtenidos mediante GC-MS obteniéndose un 100% de coincidencia entre ambas metodologías.
2. Se ha sintetizado un MIP poliuretánico por la técnica de polimerización en disolución para llevar a cabo la detección conjunta por fluorescencia de 1-NA y 2-NA (NCs) en agua. El MIP se caracterizó estructuralmente por FTIR y se obtuvieron los parámetros de afinidad mediante el uso de la isoterma de Langmuir-Freundlich. Este MIP fue implementado en un optosensor convencional, optimizándose todos los parámetros instrumentales y evaluándose su selectividad. Finalmente se llevó a cabo la determinación conjunta de NCs en muestras reales de agua de consumo con un límite de detección (LD) de 45 ng ml⁻¹ y un tiempo de respuesta de 120 s.
3. Se llevó a cabo una colaboración con el Departamento de Química Analítica de la Universidad de Rosario (Argentina), especialistas en quimiometría, para aplicar herramientas quimiométricas clásicas al optosensor previamente diseñado y así poder resolver mezclas que contengan las moléculas de interés

(NCs) en presencia de la principal molécula interferente, 1-naftalenmetilamina (1-NMA). Se concluye que el mejor protocolo es utilizar un *set de calibrado ternario* que contenga a 1-NA, 2-NA y 1-NMA, y aplicar la herramienta N-PLS, con lo que se obtienen muy buenos resultados en términos de exactitud, precisión, sensibilidad analítica y LD (1-NA) = 11 ng ml⁻¹ y LD (2-NA) = 20 ng ml⁻¹.

4. Se ha sintetizado el primer MIP magnético poliuretánico (mag-MIP) para la detección óptica selectiva de 1-NA en aguas de consumo. El mag-MIP ha sido sintetizado en un proceso en dos pasos, generando una estructura bien organizada con partículas híbridas super-paramagnéticas encapsuladas en su interior. Se ha demostrado el fenómeno de impronta molecular y una fuerte capacidad de adsorción de 1-NA mediante el uso de la isoterma de Freundlich. Finalmente, se ha diseñado un sensor óptico magnético mediante el uso de una fibra óptica acoplada a un separador magnético que permite determinar fluorescentemente la 1-NA retenida por el mag-MIP. El procedimiento mostró un excelente comportamiento analítico, demostrando una alta selectividad a 1-NA y permitiendo la determinación de dicha molécula en aguas de consumo con un LD = 18 ng ml⁻¹.
5. Se ha utilizado la técnica de polimerización por precipitación para producir, de forma exitosa, el primer MIP para ácido caféico en forma de micropartículas esféricas muy bien definidas. Se llevó a cabo una caracterización morfológica de MIP y NIP mediante microscopía SEM y porosimetría de adsorción de nitrógeno. Las propiedades de enlace de los polímeros fueron evaluadas mediante la isoterma de adsorción de Freundlich. Los polímeros fueron evaluados como fases estacionarias en columnas de HPLC, corroborando de nuevo el fenómeno de la impronta molecular y

demostrando un alto reconocimiento selectivo para ácido caféico al ser perfectamente aislado de una matriz que contenía 8 compuestos estructuralmente relacionados. Finalmente, la columna HPLC con el material impreso fue utilizada directamente con muestras de zumo de manzana, sin ningún tratamiento de muestra previo, permitiendo un excelente aislamiento y altas recuperaciones (>80%) de ácido caféico en esta matriz tan compleja.

6. Se ha llevado a cabo una revisión bibliográfica, en forma de Highlight, sobre la investigación que ha sido desarrollada, durante los últimos años, por nuestro grupo de investigación en el desarrollo de fases sensoras basadas en la deposición de complejos del tipo ftalocianinas de hierro (FePc) sobre soportes nanoestructurados de óxidos metálicos, para la detección óptica de NO₂ y CO. A partir de esta investigación se pretende demostrar, por un lado, que el uso de fases sensoras nanoestructuradas para este fin ofrece importantes ventajas, en cuanto a sensibilidad, selectividad y estabilidad, frente al empleo de las clásicas membranas poliméricas; y por otro lado, que el uso de complejos de FePc permite la detección selectiva, rápida y eficiente de NO₂.
7. Se han sintetizado nuevos complejos de FePc modificando la naturaleza de los ligandos que pueden unir (derivados de aminas primarias y fosfinas orgánicas) para dar lugar a nuevos complejos octaédricos. Estos nuevos complejos han sido caracterizados estructuralmente mediante RMN multinuclear (¹H, ¹³C, ¹⁵N, ³¹P, ⁵⁷Fe), han sido depositados sobre membranas nanoestructuradas de óxidos metálicos (AP200/19) y evaluados como fases sensoras para la detección de NO₂. La membrana generada con el nuevo complejo mixto FePc(P(OEt)₃) DA mostró la mejor reversibilidad, sensibilidad (LD y LC = 1.2 y 4.0 ppb, respectivamente) y termoestabilidad en el rango de

4-25 °C, mejorando todos los resultados previos obtenidos por nuestro grupo de investigación en este campo.

MAIN CONCLUSIONS

1. We have developed a rapid and sensitive screening test to detect PAHs in waters that avoids the use of expensive and time consuming methodologies. We have used an optosensors for detecting benzo(a)pyrene (indicator of the presence of other PAHs), previously designed by our research group. The test recognises contaminated samples very quickly (150 s) and inexpensively with a cut-off level of 10 ng l⁻¹. To demonstrate the applicability of the proposed test, Antarctic waters, sampled during the austral summer of 2003–2004, were analysed by using both the proposed screening test and GC-MS. The screening test coincides 100% with the results obtained with GC-MS.
2. A molecularly imprinted polymer (MIP) based on polyurethane has been synthesized by the solution polymerization technique to perform the simultaneous detection by fluorescence of 1-NA and 2-NA (NCs) in water. The MIP was structurally characterised by FTIR and affinity parameters were obtained by using the Langmuir-Freundlich isotherm. The MIP was implemented in a conventional optosensor and then, all the instrumental parameters were optimized and the selectivity was evaluated. Finally, we carried out the simultaneous determination of NCs in real samples of drinking water with a limit of detection (LOD) of 45 ng ml⁻¹ and a response time of 120 s.
3. We have applied classical chemometric tools to the previously designed optosensors-MIP in collaboration with the Department of Analytical Chemistry at the University of Rosario (Argentina), specialists in

chemometrics. These methodologies can resolve mixtures that contain the two NCs in the presence of the main interfering molecule, 1-naphthalenmethylamine (1-NMA). We concluded that the best protocol was based on a ternary set of calibration, which contains 1-NA, 2-NA and 1-NMA, and apply the tool N-PLS, obtaining very good results in terms of accuracy, precision, analytical sensitivity and LOD (1-NA) = 11 ng ml⁻¹ and LD (2-NA) = 20 ng ml⁻¹.

4. We have synthesised the first magnetic MIP based on polyurethane (mag-MIP) for the selective optical detection of 1-NA in drinking waters. The mag-MIP has been synthesised in a two-step process, generating a well organized structure with hybrid super-paramagnetic particles encapsulated inside. The imprinting phenomenon and a strong adsorption capacity of 1-NA have been revealed by using the Freundlich isotherm. Finally, we have designed a magnetic optical sensor coupling a magnetic separator to a fiber optic for the fluorescence determination of the 1-NA retained by the mag-MIP. The procedure showed excellent analytical performance, demonstrating a high selectivity to 1-NA and allowing the determination of this molecule in drinking water with a LOD = 18 ng ml⁻¹.
5. We have used the precipitation polymerisation technique to produce the first MIP for caffeic acid in the form of well-defined spherical microparticles. We carried out a morphological characterization of MIP and NIP by SEM and nitrogen adsorption porosimetry. The binding properties of the polymers were evaluated by Freundlich adsorption isotherm. The polymers were further evaluated as stationary phases in HPLC columns, confirming again the phenomenon of molecular imprinting and demonstrating a high selective recognition of caffeic acid. This antioxidant was perfectly isolated from a

matrix containing eight structurally related compounds. Finally, the HPLC column with the imprinted material was used directly with samples of apple juice, without any prior sample treatment, allowing the excellent isolation and high recoveries (> 80%) of caffeic acid in such complex matrix.

6. We have made a literature review, as Highlight, about the research that has been lately developed by our research group in the development of optical sensors based on the deposition of iron phthalocyanines (FePc) complexes into nanostructured metal oxide supports for the detection of NO₂ and CO. From this research it has been demonstrated, firstly, that the use of nanostructured sensing phases offers significant advantages in terms of sensitivity, selectivity and stability compared to the traditional use of polymeric membranes and secondly, that the use of FePc allows fast and efficient detection of NO₂.
7. We have synthesized new FePc complexes changing the nature of the ligands that can bind (primary amine derivatives and organic phosphine derivatives) to give rise to new octahedral complexes. These new complexes have been structurally characterized by multinuclear NMR (¹H, ¹³C, ¹⁵N, ³¹P, ⁵⁷Fe) and they have been deposited on metal oxide nanostructured membranes (AP200/19) and evaluated as sensing phase for the optical detection of NO₂. Membrane generated by the new mixed complex FePc(P(OEt)₃)DA showed the best reversibility, sensitivity (LOD and LOC = 1.2 and 4.0 ppb, respectively) and thermostability in the range of 4-25 ° C, improving all the previous results obtained by our research group in this field.