

UNIVERSIDAD DE GRANADA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA



**MÉTODOS RÁPIDOS DE ANÁLISIS PARA LA DETERMINACIÓN
DE ANIONES**

TESIS DOCTORAL

EDUARDO ARROYO GUERRERO
GRANADA, 2006

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Eduardo Arroyo Guerrero
D.L.: Gr. 1871 - 2006
ISBN: 978-84-338-4108-7

**MÉTODOS RÁPIDOS DE ANÁLISIS PARA LA DETERMINACIÓN
DE ANIONES**

por

EDUARDO ARROYO GUERRERO

**Departamento de Química Analítica
Universidad de Granada**

VISADO en Granada, a 30 de Junio de
2006

MEMORIA presentada para aspirar
al Grado de Doctor en Ciencias
Químicas.
Granada, a 30 de Junio de 2006

Fdo.-
Prof. Dr. D. **Luis Fermín Capitán
Vallvey**, Catedrático del Departamento
de Química Analítica de la Universidad
de Granada.

Fdo.- **Eduardo Arroyo Guerrero**,
Licenciado en Ciencias. Sección
Químicas.

Prof. Dr. Dña. **Mª Dolores Fernández
Ramos**, Profesora Titular del
Departamento de Química Analítica

A MIS PADRES

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis doctoral no se podría haber llevado a cabo sin la ayuda y colaboración de muchas personas. Desde aquí me gustaría expresar mi más sincero agradecimiento a todas ellas.

En primer lugar, quiero expresar mi agradecimiento a los directores de esta tesis Dr. D. Luis Fermín Capitán Vallvey y Dra. Dña. M^a Dolores Fernández Ramos, por el esfuerzo y dedicación que les ha supuesto la supervisión de este trabajo, y por sus sabios consejos y sugerencias sin las cuales no hubiera sido posible la elaboración de esta Tesis Doctoral.

Al Departamento de Química Analítica de la Universidad de Granada, por su soporte técnico, por su magnífica disponibilidad y hospitalidad. A cada uno de los docentes e investigadores del Departamento de Química Analítica que de alguna u otra forma han puesto su granito de arena contribuyendo a la realización de este trabajo.

A mis compañeros de laboratorio, Pedro, López, Alex, Clara, Julio, Juanfra, Emilio, Joaquín, Miguel, Younes, Oscar, Alberto, Tito, Roberto, y al resto de compañeros del departamento, que siempre han estado ahí cuando los he necesitado y con los que he compartido tan buenos momentos durante todo este tiempo.

Al Departamento de Química Orgánica de la Universidad de Granada, por el buen trato que me han dado siempre que les he visitado y en particular al Dr. D. Francisco Santoyo y al Dr. D. Joaquín Isaac por su colaboración, y por la ayuda prestada durante el desarrollo de mi Tesis Doctoral.

A mis padres y hermanos y a mi familia en general, por estar siempre preocupados por mi felicidad, por la alegría y cariño que me han proporcionado y por sus palabras alentadoras y reconfortantes en los momentos difíciles.

De forma especial quiero expresar mi agradecimiento al Dr. D. Luis Fermín Capitán Vallvey, a quien considero gran maestro y ejemplo de dedicación, y a la Dra. Dña. M^a Dolores Fernández Ramos que siempre creyó en el buen fin de este trabajo.

La presente Tesis Doctoral se ha realizado en el grupo de investigación "Espectrometría en Fase Sólida" (FQM-118) del Departamento de Química Analítica de la Universidad de Granada, bajo la dirección de los Drs. D. Luis Fermín Capitán Vallvey y Dña. María Dolores Fernández Ramos.

La financiación necesaria ha corrido a cargo de los siguientes proyectos de investigación: 1) Desarrollo de sistemas rápidos de análisis mediante sensores monouso. Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología. Proyecto PB98-1302. 1999-2002; 2) Desarrollo de sensores de un solo uso en el campo medioambiental y agroalimentario. Dirección General de Investigación Científica y Desarrollo Tecnológico. Programa Nacional de Promoción General del Conocimiento. Proyecto: BQU2002-00353. 2002-2005; 3) Desarrollo de sensores de un solo uso en el campo medioambiental y agroalimentario. Programa de proyectos (Modalidad B). Universidad de Granada. Resolución 28/10/02. 2002-2003; 4) Estudios espectroscópicos de moléculas y desarrollo de sensores ópticos. Convocatoria de Ayudas de Acciones Coordinadas (Orden de 20/julio/2002; BOJA 103 de 3/septiembre/2002 y Orden de 13/mayo/2003; BOJA 110 de 11/junio/2003).

Queremos agradecer la ayuda prestada al Ministerio de Educación y Ciencia, a la Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa de la Junta de Andalucía y al Vicerrectorado de Investigación de la Universidad de Granada.

ÍNDICE

OBJETIVOS DE LA TESIS	1
------------------------------------	----------

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN.....	5
--------------------------------------	----------

1. Clasificación de los ensayos	11
---------------------------------------	----

2. El reconocimiento de aniones	12
---------------------------------------	----

3. Esquemas de sensado.....	13
-----------------------------	----

3.1. Sensores desechables basados en reactivos cromogénicos convencionales	15
--	----

3.2. Sensores desechables basados en reactivos ionóforos.....	23
---	----

4. Uso de ionóforos para aniones en sensores ópticos.....	27
---	----

4.1. Sensores basados en un segundo componente	28
--	----

4.2. Sensores basados en un segundo componente para aniones.....	31
--	----

5. Bibliografía.....	40
----------------------	----

CAPÍTULO 2: SENSOR DESECHABLE PARA LA DETERMINACIÓN DE NITRITO EN AGUAS	47
--	-----------

1. Introducción.....	49
----------------------	----

2. Experimental.....	53
----------------------	----

2.1. Instrumentación y software.....	53
--------------------------------------	----

2.2. Reactivos y materiales.....	54
----------------------------------	----

2.3. Preparación de las membranas sensoras	54
--	----

2.4. Medida de la absorbancia.....	56
------------------------------------	----

2.5. Procedimiento para muestras y patrones.....	56
3. Resultados y discusión.....	57
3.1. Composición de la membrana.....	57
3.2. Condiciones de reacción.....	61
3.3. Parámetros analíticos.....	65
3.4. Selectividad.....	67
3.5. Aplicaciones analíticas.....	67
4. Conclusiones.....	69
5. Bibliografía.....	70

CAPÍTULO 3: SENSOR DESECHABLE PARA LA DETERMINACIÓN DE CLORURO EN AGUAS..... 73

1. Introducción.....	75
2. Experimental.....	77
2.1. Reactivos y materiales.....	77
2.2. Instrumentación y software.....	77
2.3. Preparación de la membrana.....	78
2.4. Procedimiento experimental.....	79
2.5. Cálculos.....	80
3. Resultados y discusión.....	80
3.1. Optimización de la respuesta del sensor desechable.....	82
3.2. Parámetros analíticos.....	91
3.3. Aplicaciones del método.....	95

4. Conclusiones.....	95
5. Bibliografía.....	96

CAPÍTULO 4: SENSOR OPTICO DESECHABLE PARA LA DETERMINACIÓN DE NITRATO BASADO EN UN RECEPTOR TIPO AMIDA.....99

1. Introducción.....	101
2. Experimental.....	105
2.1. Reactivos.....	105
2.2. Preparación de los sensores desechables y procedimiento de medida.....	105
3. Resultados y discusión.....	107
4. Caracterización analítica y aplicaciones.....	121
5. Conclusiones.....	126
6. Bibliografía.....	127

CAPÍTULO 5: DESARROLLO DE UN SENSOR ÓPTICO DESECHABLE PARA CITRATO BASADO EN UN RECEPTOR SINTÉTICO TIPO GUANIDINIO..... 131

1. Introducción.....	133
----------------------	-----

2. Experimental	135
2.1. Reactivos.....	135
2.2. Preparación de membranas desechables.....	136
2.3. Sistema de medida.....	137
2.4. Procedimiento para la curva de calibrado y muestras	138
3. Resultados y discusión	138
4. Caracterización analítica y aplicaciones	146
5. Conclusiones	150
6. Bibliografía	150

CAPÍTULO 6: LINEALIZACIÓN DE CURVAS DE RESPUESTA EN SENSORES ÓPTICOS DESECHABLES BASADOS EN COEXTRACCION PARA ANIONES MONOVALENTES..... 153

1. Introducción	155
2. Teoría	158
2.1. Modelo general.....	158
2.2. Modelo para el sensor de nitrato.....	163
2.3. Modelo para el sensor de cloruro.....	165
2.4. Estimación de la constante de coextracción global.....	166
3. Experimental	167
3.1. Reactivos.....	167
3.2. Preparación de las membranas de un solo uso y procedimiento de medida.....	168
4. Resultados y discusión	169
4.1. Verificación del modelo teórico: establecimiento de la curva de calibrado lineal.....	169

4.2. Aplicaciones analíticas.....	173
5. Conclusión.....	175
6. Bibliografía.....	175
CAPÍTULO 7: DISCUSION DE RESULTADOS.....	179
1. Estrategias de sensado usadas.....	183
1.1. Sensor basado en el uso de reacciones específicas. Sensor desechable para la determinación de nitrito	184
1.2. Sensores basados en receptores	185
2. Composición de los sensores	186
3. Resultados analíticos	189
3.1. Verificación y calibración de instrumentación y equipos.....	189
3.2. Optimización de la respuesta del sensor	190
3.3. Parámetros de calidad.....	194
3.4. Validación del método analítico	196
3.5. Aplicaciones.....	196
4. Linealización de curvas de respuesta analítica en sensores ópticos.....	198
5. Bibliografía.....	202
CONCLUSIONES	205

ANEXO 1: SÍNTESIS DE REACTIVOS	211
1. Reactivos empleados para síntesis	213
2. Síntesis de reactivos	214
2.1. Síntesis del cromoióforo 4,5, dibromofluorescein octadecil ester	214
2.2. Síntesis del 1,2-benzo-7-(dietilamino)-3-(octadecanoilimino)fenoxacina	216
2.3. Síntesis del ionóforo para nitrato (HNOPH)	221
2.4. Síntesis del ionóforo para citrato (RCT)	227
APÉNDICE DE ACRÓNIMOS Y SÍMBOLOS	233
PUBLICACIONES	239

OBJETIVOS

OBJETIVOS DE LA TESIS

El objetivo general que se pretende en esta Tesis Doctoral es el desarrollo de métodos rápidos de análisis químico empleando sensores ópticos desechables, también llamados tiras reactivas, para la determinación de aniones en diversas matrices, que presenten las características de basarse en la medida de propiedades ópticas y de permitir la determinación cuantitativa de aniones. Como aniones objetivo se han seleccionado cuatro de diferentes propiedades y características toxicológicas: nitrito, nitrato, cloruro y citrato. Con esta Tesis Doctoral se pretende poner a punto procedimientos de análisis rápidos para estos aniones que sean fáciles de usar, de bajo costo y que no contaminen el medio.

Para el desarrollo de estos métodos rápidos de análisis se emplearán diferentes esquemas de sensado basados en complejación mediante reactivos cromogénicos convencionales y complejación en membrana mediante ionóforos y posterior transducción por absorción de radiación. Las etapas de reconocimiento y transducción se combinarán de diferentes formas para lograr una adecuada sensibilidad y selectividad.

Los objetivos específicos planteados son:

1. Desarrollar sensores ópticos de un solo uso para la determinación selectiva y rápida de aniones que se basen en diferentes estrategias.
2. Proponer los mecanismos de actuación de los diferentes sensores desarrollados.
3. Seleccionar y sintetizar ionóforos que mejoren la selectividad hacia los analitos de interés y acoplarlos a esquemas de reconocimiento en sensores ópticos.
4. Establecer la mejor composición de la membrana, buscar los componentes más apropiados y optimizar las condiciones de reacción para los diferentes procedimientos estudiados.
5. Desarrollar sensores desechables basados en medidas de absorción de radiación recurriendo tanto al empleo de reactivos convencional como al de sistemas ionóforo-cromoionóforo.
6. Caracterizar analíticamente los diferentes sensores desarrollados y demostrar su utilidad para el análisis de muestras reales.
7. Estudiar las posibilidades de linealización de las funciones respuesta sigmoideal que presentan los sensores basados en segundo componente que operan por coextracción.

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

Se pueden considerar los ensayos rápidos como una combinación de herramientas analíticas simples, portátiles y baratas con procedimientos de análisis sencillos para la identificación o determinación de sustancias. Estos ensayos rápidos son de diverso tipo y entre ellos encontramos desde reacciones en disolución con observación visual o medida instrumental, a volumetrías con cuentagotas, medida de la longitud o radio de zonas coloreadas u otros.

Todos estos sistemas tienen de común el que se pueden llevar a cabo fuera de un laboratorio. No usan las condiciones controladas del mismo. Sus resultados no pueden tener la misma calidad, aunque los objetivos que persiguen no son los mismos. Aquí las razones de inmediatez, privacidad u oportunidad priman sobre los habituales de un análisis químico, especialmente en términos de exactitud o precisión.

Uno de estos sistemas rápidos son las llamadas tiras reactivas, también conocidos como sensores desechables, sensores de un solo uso o sensores de gota plana. Se podrían definir como dispositivos analíticos autocontenidos que pueden ser utilizados, o no, en conjunción con instrumentación portátil. De forma más precisa, podríamos decir que son formulaciones analíticas en las que todos los reactivos necesarios para hacer un análisis se encuentran presentes en estado sólido sobre o dentro de adsorbentes o películas dispuestas sobre láminas de material plástico y que en contacto con el problema desencadenan una serie de reacciones o procesos que permiten la estimación del analito presente^{1:2}.

Los sensores desechables, nombre con que los denominaremos a lo largo de esta Memoria, tratan de satisfacer las necesidades de información química, o, más precisamente, de información que se pueda obtener mediante el análisis químico, a niveles próximos al gran público. Por tanto, deben de cumplir una serie de condiciones como son: ausencia de manipulación de reactivos y disolventes, sencillez de uso, robustez, facilidad de lectura de resultados, inmediatez, bajo costo y que no sea necesario personal entrenado para su uso.

De alguna manera supone una democratización – si fuera posible aplicar ese concepto- de la Química Analítica. No es necesario saber, no es necesario esperar, no es necesario recurrir a un especialista. En la intimidad de su casa una mujer puede saber si está embarazada, si el contenido en cloro o amonio cuaternario de su piscina está al nivel adecuado o si su nivel de glucosa en sangre es normal. Incluso se usan para otras cuestiones más polémicas como podría ser el control paterno del consumo de drogas de abuso en jóvenes o del patrón sobre sus empleados.

Pero además de estas necesidades de información en casa o a pie de cama por parte de usuarios no cualificados, hay muchas otras que pueden ser cubiertas por este tipo de dispositivos. Este es el caso de laboratorios de rutina de análisis clínicos o investigaciones de campo por parte de geólogos, policía científica o servicios de vigilancia ambiental con diversos objetivos. Así, determinar de forma rápida valores de parámetros clínicos en orina y sangre, la denominada en este ámbito Química Seca – la cual produjo un cambio en el concepto tradicional de laboratorio clínico al permitir utilizar el análisis rutinario de orina como discriminante del estado de salud de poblaciones mayoritariamente sanas. También se pueden usar en procedimientos de muestreo para seleccionar

que muestras tomar, para monitorizar valores límite en control de procesos, para determinar componentes lábiles, por ejemplo en aguas naturales, mediante análisis *in situ*, o para estimación de niveles de analitos que permitan establecer una estrategia de análisis. Incluso para cuestiones tan aparentemente nimias como la verificación de muestras, así cuando se sospecha una confusión de las mismas.

El concepto de sensor desechable encaja en la cultura del usar y tirar tan extendida hoy en día y que aparece en EE.UU. a partir de la II Guerra Mundial por el desarrollo tecnológico que caracteriza la reconstrucción bélica. Hay una acelerada producción de bienes de consumo y se generaliza la propaganda y venta de productos de usar y tirar, mercancías de un solo empleo, que van desde manteles a maquinillas de afeitar, envases no retornables o compresas higiénicas. La brevedad –valor de lo efímero- se convierte en el motor que retroalimenta el sistema. Todo producto lleva en sí o potencia su propia desaparición.

En este contexto, el desarrollo de dispositivos analíticos que no exigen el uso de un laboratorio, que no emplean en absoluto, o casi, reactivos en disolución, que no necesitan personal con conocimientos, que se pueden usar en cualquier sitio, que responden de forma prácticamente inmediata y que casi no generan residuos, es, evidentemente, bien acogido y aparece como un producto –¡jojo, antes el análisis era un servicio!- que encaja en los hábitos culturales.

Estos sensores desechables se pueden clasificar en dos formatos diferentes, los basados en observación visual y los que realizan una medida instrumental.

Los primeras son herederas de la tradición en Química Analítica de los papeles reactivos, el más conocido de los cuales es el papel de pH en sus diversas variantes (tornasol/universal/décimas). Estos sistemas pretenden clasificar la muestra atendiendo a un parámetro de interés en algún subgrupo de concentraciones. De esta manera se obtiene una información que se suele denominar semicuantitativa, basada en la capacidad de discriminación entre colores del ojo humano. Así dureza o nitratos en agua. Alternativamente, pueden ser de tipo disyuntivo (si/no) según se supere un determinado valor de concentración, a veces un límite legal. Están diseñados para que sea perceptible por encima de ese nivel, así un test de embarazo.

Los basados en una medida instrumental utilizan una medida cuantitativa que suministra una información más fiable y precisa que la simple distribución en categorías. Las medidas más utilizadas, aunque no las únicas, son las eléctricas y las ópticas. Dentro de las eléctricas, los sensores desechables amperométricos son los de mayor uso, aunque otros, como los potenciométricos, son de interés. En sensores desechables ópticos, los más usados son los que se basan en medidas de reflectancia difusa, aunque también en espectrofotometría, fluorescencia, tanto directa como usando campo evanescente y, más raramente, otros como en quimioluminiscencia.

En este tipo de sistemas analíticos, a diferencia de los procedimientos analíticos convencionales, no se trata de poner a punto un procedimiento, sino de preparar el sistema en su conjunto para su uso por el cliente. La dimensión comercial y económica de este tipo de procedimientos rápidos es mayor que en otras técnicas y procedimientos. Y buena prueba de ello, es el habitual empleo aquí de patentes y modelos de utilidad como forma de publicación y protección de resultados.

Es muy frecuente que sean desarrollados directamente por empresas, ya que las propiedades y características que deben mostrar, no solo analíticas sino de estabilidad, robustez mecánica, precio, etc., hacen que sea necesaria una tecnología media/alta para compatibilizar prestaciones y precio. A pesar de todo ello, supone una oportunidad de negocio para muchas empresas por el volumen de potenciales clientes que existen y de hecho en la actualidad es un próspero campo de actividad y negocio para muchas empresas como Merck, Macherey-Nagel, Kyoritsu, Hach, LaMotte Company, Industrial Test Systems, etc.

Las ventajas de este tipo de sistemas analíticos ya han sido señaladas. Los inconvenientes se refieren al carácter semicuantitativo de muchos de ellos, su baja exactitud, su escasa capacidad para el análisis de trazas, su carácter dedicado para un tipo de analito en una matriz dada, lo que hace que tengan escasa versatilidad, salvo que se demuestre su utilidad.

1. Clasificación de los ensayos

Estos ensayos de fase sólida deben estar basados en reacciones de suficiente selectividad en conjunción con diversas operaciones analíticas para lograr obtener resultados sobre problemas reales, sin necesidad de tratamiento previo de muestra ni adición de reactivos. Por otra parte, deben estar diseñados de forma que sea fácil su manipulación, sean robustos en su uso, sean estables durante el almacenamiento y se pueda realizar la medida con seguridad, generalmente mediante el uso de instrumentos dedicados. Las reacciones que se usan van desde reacciones de complejación, a reacciones enzimáticas, reacciones antígeno-anticuerpo ó reacciones con ADN.

Se pueden clasificar los ensayos de fase sólida en dos grupos: sistemas verticales y sistemas horizontales, atendiendo a como se relaciona el problema conteniendo el analito con la tira reactiva o sensor desechable. En los sistemas verticales el fluido atraviesa perpendicularmente la capa o capas que constituyen la zona reactiva sufriendo un conjunto de reacciones y procesos que permitirán desarrollar una propiedad analítica^{3,4}. En los sistemas horizontales la muestra se deposita sobre una zona de recepción y se mueve por flujo fluido a través de la tira de ensayo produciéndose como consecuencia de esa migración separaciones cromatográficas, reacciones y/o retenciones de analito o interferentes, que originaran la propiedad analítica^{5,6}. En esta Memoria de Doctorado solo trataremos de ensayos de tipo vertical, por lo que a ellos nos atenderemos en lo que continúa.

En los sistemas verticales se pretende integrar todas las operaciones analíticas necesarias en un único conjunto sobre el que vamos a aplicar la muestra, lo que provocará, tras la disolución de los reactivos, caso de que tenga que ocurrir, diferentes reacciones y procesos que concluirán con la realización de la medida. Los tipos de operaciones a realizar dependerán del tipo de problema y de las reacciones químicas usadas para su determinación.

Los reactivos en los sistemas verticales se encuentran en fase sólida y se pueden distribuir o bien a través de toda la matriz del la zona activa del sensor o bien pueden estar compartimentalizados en dominios específicos dentro de la infraestructura de la matriz. Esta distribución de reactivos y componentes necesarios se puede lograr de dos maneras: 1) mediante una única capa, los llamados sistemas monocapa⁷⁻⁹ ó 2) mediante un conjunto de capas diferenciadas que se encuentran apiladas,

los llamados sistemas multicapa¹⁰⁻¹³. La mayor o menor complejidad del sistema dependerá del propio analito, de la complejidad de la matriz que lo contiene y de la selectividad de la reacción de reconocimiento.

2. El reconocimiento de aniones

La determinación y cuantificación de aniones, frecuentemente en medio acuoso, tiene un gran interés debido a la gran importancia que tienen los aniones en gran cantidad de procesos químicos y biológicos. Podríamos decir que el análisis de aniones es esencial para la conservación y comprensión del medioambiente. Muchos procesos industriales y agrícolas pueden originar la liberación de aniones al medio los cuales pueden tener efectos devastadores. Un campo de gran interés es la determinación de aniones en aguas, con el fin de controlar la presencia o el nivel de algún contaminante o si la cantidad presente de un determinado anión en agua supera un determinado valor (MCL) y decidir si se puede usar para consumo, riego, uso agrícola u otro.

Existen en la actualidad muchos métodos para la determinación de aniones, muchos de ellos son métodos cromatográficos, como la cromatografía iónica o métodos basados en electroforesis capilar. El empleo de métodos separativos de alta capacidad como son los métodos cromatográficos o electroforéticos es una alternativa muy usada y de mucho interés, pues no se precisa de un reconocimiento de cada anión, y por tanto de su discriminación de otros presentes, sino solo de su separación basada en diferencias en carga, tamaño, polaridad, forma, presencia de grupos quirales u otras, y posterior medida en línea de una propiedad no selectiva como puede ser conductividad, absorción UV u otras.

El uso de ensayos rápidos de análisis en general, cuyas ventajas antes hemos comentado, presenta *a priori* el problema de que es necesario emplear una reacción de reconocimiento del analito con suficiente selectividad para la aplicación concreta a que se destine. Esto supone un problema para cualquier tipo de analito, aunque este es mayor para el caso de aniones, especialmente cuando lo comparamos con cationes.

Entre las características que presentan los aniones que dificultan su reconocimiento en comparación con cationes podemos destacar:

- 1 El tamaño iónico de un anión suele ser mayor que el de cationes isoelectrónicos, así el cloruro tiene un radio iónico de 0,167 nm, mientras que el de potasio (K⁺) es de 0,133 nm, el mismo que el del anión más pequeño, el fluoruro. Esto implica que la relación carga/radio es menor y que, en consecuencia, las interacciones electrostáticas son más débiles, pues disminuyen con el cuadrado de la distancia, originando constantes de estabilidad menores.
- 2 Las geometrías que presenta la forma de los aniones pueden ser muy diferentes; así el cloruro es esférica, el cianuro lineal, el sulfato tetraédrica y el nitrato plana trigonal. En consecuencia, habrá que tener en cuenta los requerimientos geométricos de cada anión para diseñar sistemas de reconocimiento que tengan una disposición geométrica adecuada para poder interactuar complementariamente con los grupos funcionales del anión.
- 3 Es frecuente que procedan de ácidos débiles, lo que hace que sean dependientes del pH de medio, pues pierden su carga negativa (CN⁻), o la disminuyen ($\text{CO}_3^{2-} \rightarrow \text{HCO}_3^-$), al disminuir el pH. Esto implica que los sistemas de reconocimiento deberán trabajar entre unos márgenes de pH dados de existencia del anión.
- 4 Los aniones presentan unas energías de hidratación grandes en comparación con cationes de tamaño similar, lo que supone que van a interactuar mucho con disolventes polares. Esto dificulta la reacción de reconocimiento del anión, si tenemos en cuenta lo antes dicho y que la determinación de aniones tiene interés en medio acuoso

3. Esquemas de sensado

Para lograr el reconocimiento de las diversas especies de interés mediante sensores desechables de tipo óptico o visual, se han utilizado diferentes esquemas dependiendo del tipo de analito y de la muestra en la que aquel se encuentre.

De una manera general un ligando –portador de iones, ionóforo, indicador o agente complejante- o un reactivo o reactivos se enlazan químicamente o bien se entrapan físicamente cerca de la interfase o bien en el seno de la capa sensora o bien se inmovilizan directamente en la superficie de la zona sensora. La señal óptica se genera mediante la interacción del reactivo, que cambia sus propiedades ópticas por reacción con el analito, bien solo o con la ayuda de compuestos adicionales –cromoionóforo, fluoroionóforo, colorante indicador, reactivos auxiliares-.

Entre ellos podemos citar: a) reacciones redox, este es el caso de la determinación de yoduro basada en su oxidación a yodo y retención en una membrana de poliestireno como complejo con polivinilpirrolidona¹⁴; b) reacciones orgánicas, así la formación de azoderivados para nitrito^{15;16;16-18} o para nitrato previa reducción^{15;19;20}. También se puede citar dentro de este grupo la reacción con aminas aromáticas en presencia de cobre para cianuro²¹ c) reacciones de precipitación o de disolución de precipitados, así para cloruro se han propuesto sistemas basados en cromato de plata²², en barberina²³ o en el complejo de Ag(I) de 2,4,6- tri(2-piridil)-1,3,5-triazina²⁴; para sulfato se ha propuesto un sistema basado en el complejo Arsenazo III-bario²⁵ y otro basado en el complejo ácido rodizónico-bario^{26;27}; c) reacciones enzimáticas; muy habituales en análisis clínico, así para cloruro usando la catálisis por dipeptidilpeptidasa I (catepsina C) de la hidrólisis de oligopéptidos derivados²⁸ o para hidrógenocarbonato basándose en su carácter básico débil mediante una reacción indirecta en la que interviene una β -galactosidasa y un criptandano²⁸; d) reacciones de complejación convencionales, así para vanadato²⁹ o para fosfato mediante la clásica reacción con molibdato y posterior reducción³⁰ o para borato con cúrcuma³⁰; e) reacciones de sustitución de ligandos en complejos cromogénicos como la usada para fluoruros³⁰; e) reacciones basadas en ionóforos, así se ha utilizado para cloruro basado en cloruro de triciclohexilestaño³¹.

Vamos a tratar a continuación los dos esquemas de reconocimiento usados para iones alcalinotérreos en la presente Memoria de Doctorado, a saber: complejación convencional y uso de ionóforos

3.1. Sensores desechables basados en reactivos cromogénicos convencionales

Este es un esquema frecuentemente usado para sensores desechables y se basa en una reacción entre el analito que se encuentra presente en el problema y un reactivo que se encuentra inmovilizado en la membrana sensora. Como consecuencia de la reacción se origina una nueva especie que implica una reorganización del reactivo, en ocasiones con la incorporación del analito en ella, como es el caso de la complejación o reacciones orgánicas, lo que lleva aparejado una modificación de sus características electrónicas y, por tanto, de sus propiedades ópticas, lo que aprovecharemos para la medida.

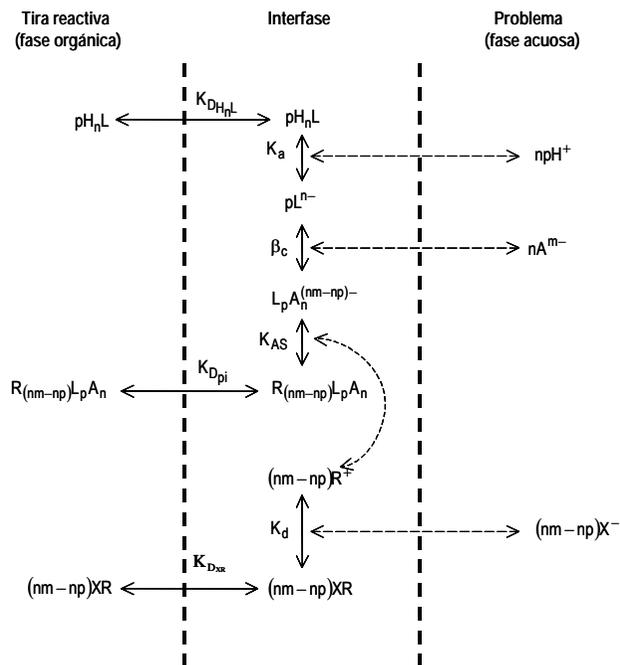
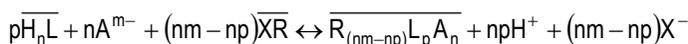


Figura 1.1. Modelo de sensor desechable basado en un reactivo convencional

Como caso general consideraremos que el analito es un ión A^{m-} que reacciona con un reactivo convencional H_nL de carácter lipofílico para originar una especie cargada $L_pA_n^{(nm-np)\pm}$ negativamente ($nm > np$) o positivamente ($nm < np$) que se retendrá en la fase orgánica como par iónico $X_{nm-np}L_pA_n$ con un catión lipofílico X^+ o anión lipofílico X^- según sea la carga de la especie formada. Los diferentes equilibrios se rigen por las siguientes constantes: constantes de distribución entre ambas fases del reactivo $K_{D_{H_nL}}$; de la sal lipofílica $K_{D_{XR}}$ y de la especie formada como par iónico $K_{D_{pi}}$; constante global de formación de la especie β_c ; constante de disociación de la sal lipofílica K_d ; constante de asociación del par iónico especie formada-catión lipofílico K_{AS} y constante de acidez del ligando K_a .

En la Figura 1.1 se muestra un modelo general de sensor desechable en el que la zona sensora del mismo es de naturaleza hidrofóbica y que la especie resultante tuviera carga negativa ($nm > np$) siendo retenida en membrana como par iónico por una catión lipofílico. En el caso de que estuviera constituida por un polímero hidrofílico –celulosa, por ejemplo- se podrían sustituir las anteriores constantes de distribución por isothermas de adsorción.

El equilibrio general que se cumple es:



donde se supone que $np < nm$ y cuya constante de equilibrio vendrá dada por.

$$K_e = \frac{\overline{R_{(nm-np)}L_pA_n} [H^+]^{pn} [X^-]^{nm-np}}{\overline{H_nL}^p [A^{m-}]^n \overline{XR}^{(nm-np)}} \quad (1.1)$$

En la anterior reacción, y en la correspondiente constante, las concentraciones barradas se refieren a las de las especies inmovilizadas en la fase orgánica y las que se encuentran entre corchetes a disolución.

Sustituyendo las diferentes concentraciones por las constantes de los equilibrios involucrados se puede demostrar que la constante global del proceso K_e se relaciona con las constantes de los diferentes equilibrios involucrados, según:

$$K_e = \frac{\beta_c \cdot K_{AS} \cdot K_{Dpi} \cdot K_a^p \cdot K_d^{(nm-np)}}{K_{DHnL}^p \cdot K_{DXR}^{(nm-np)}} \quad (1.2)$$

Vamos a simplificar este caso general suponiendo que: a) los coeficientes de actividad en fase membrana son equivalentes para el reactivo y la combinación reactivo-analito; b) que la estequiometría de la reacción es 1:1; c) que la especie originada es neutra y no necesita, por tanto, de un catión lipofílico para su extracción como par iónico a fase inmovilizada y d) no hay influencia del pH.

En consecuencia el equilibrio quedará resumido de la forma:



y caracterizado por:

$$K_e = \frac{\overline{AL}}{\bar{L}[A]} \quad (1.3)$$

donde $[A]$ es la concentración de analito y \bar{A} y \overline{AL} es el número de moléculas de reactivo libres y combinadas en la fase inmovilizada del sensor desechable, respectivamente^{32,33}.

Si hacemos un balance de masas respecto al reactivo ($C_L = \bar{L} + \overline{AL}$), se puede demostrar que \bar{L} y \overline{AL} varían con la concentración analítica de reactivo C_L según:

$$\bar{L} = \frac{1}{1 + K_e[A]} C_L \quad (1.4)$$

$$\overline{AL} = \frac{K_e[A]}{1 + K_e[A]} C_L \quad (1.5)$$

Tanto la concentración de reactivo libre como combinado dependen de la concentración de analito, aunque en un caso depende de forma directa y en el otro de forma inversa.

Nos podemos encontrar con dos situaciones, dependiendo de que midamos una propiedad óptica, por ejemplo absorción de radiación UV-Vis o fluorescencia, que dependa de la concentración de reactivo L (Figura 1.2) o bien que midamos una propiedad que dependa de la concentración de la combinación AL (Figura 1.3).

En el caso de que la propiedad analítica medida dependa de la combinación AL, que es lo frecuente en un reactivo cromogénico, la ecuación 1.5 se puede simplificar como se indica a continuación.

Si la concentración de analito es baja, $[A] \ll \frac{1}{K_e}$, la respuesta será proporcional a $[A]$ pues $K_e[A] \approx 1$ y se cumplirá que $\overline{AL} = K_e[A]C_L$.

Si la concentración de analito va aumentando, se tiende a un valor límite, $[A] \gg \frac{1}{K_e}$, luego $1 \ll K_e[A]$ y se cumplirá que $\overline{AL} = C_L$. Esto es, el reactivo se satura con el analito y la señal depende de C_L , el cual es constante.

En el caso en que la propiedad analítica medida dependa de la concentración de reactivo L que no ha reaccionado, la ecuación 1.4 se puede simplificar según sigue:

Si la concentración de analito es muy baja $[A] \ll K_e$ y la combinación formada es suficientemente estable, se cumple que $1 \gg [A]K_e$ y, en consecuencia, que $\bar{L} = C_L$; esto es, la señal depende de la concentración analítica C_L que es constante.

Si $[A] \approx K_e$ se cumple que $1 \ll [A]K_e$ y por tanto que $\bar{L} = \frac{C_L}{K_e[A]}$; esto es, la señal medida decrece al aumentar la concentración de analito.

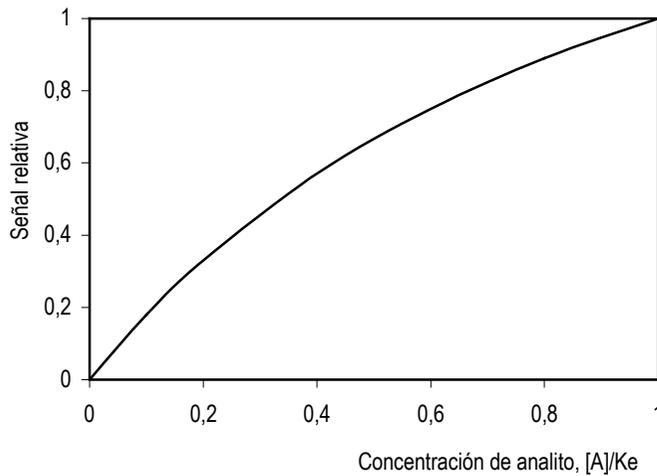


Figura 1.2. Relación entre señal óptica que es proporcional a especie formada y la concentración de analito

Si $[A] \gg K_e$ se cumple que $1 \ll [A]K_e$ y $C_L \ll [A]$, luego \bar{L} debería tender a un valor límite cero si K_e fuera suficientemente elevada, pues se consume todo el reactivo.

En el caso en que se pueda medir tanto \bar{AL} como \bar{L} , se puede usar como parámetro analítico el cociente entre ambos. A partir de las ecuaciones 1.4 y 1.5 se puede escribir:

$$\frac{\bar{AL}}{\bar{L}} = K_e [A] \quad (1.6)$$

Este cociente es directamente proporcional a la concentración de analito y es independiente de C_L . Esta forma de medida presenta la ventaja de ser menos sensible a fluctuaciones instrumentales y el inconveniente de que ambas especies L y AL deben estar presentes en cantidad suficiente como para que se puedan medir ambas con precisión, lo cual limita el rango dinámico.

Como vemos, la constante de equilibrio tiene una gran importancia en la respuesta que origina el sistema, sea cual sea el parámetro que midamos ($\bar{L}, \bar{AL}, \bar{AL}/\bar{L}$). En cualquier caso, la constante de equilibrio define el rango de concentraciones de analito que se puede medir con una fase reactiva dada.

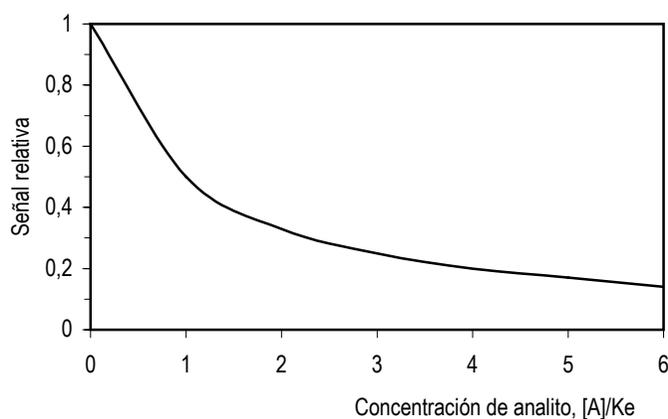


Figura 1.3. Relación entre señal óptica proporcional a reactivo restante y concentración de analito

Si la medida que se hace es de absorción de radiación por transmisión, las expresiones anteriores resultan al aplicar la ley de Beer:

$$A_{\bar{L}} = \frac{\varepsilon_{\lambda_{\bar{L}}} I \Phi}{1 + K_e [A]} C_L \quad (1.7)$$

$$A_{\overline{\lambda}} = \frac{\varepsilon_{\overline{\lambda}} \Phi K_e [A]}{1 + K_e [A]} C_L \quad (1.8)$$

En ellas $A_{\overline{\lambda}}$ y $A_{\overline{\lambda}}$ son los valores de absorbancia medidos a las longitudes de onda $\lambda_{\overline{\lambda}}$ y $\lambda_{\overline{\lambda}}$ características del reactivo y de la combinación, $\varepsilon_{\overline{\lambda}}$ y $\varepsilon_{\overline{\lambda}}$ son las absorptividades molares respectivas del reactivo y de la especie formada, l es el paso de radiación efectivo de la zona sensora del sensor desechable que suele ser de unos pocos a decenas de μm y Φ es la eficiencia en la recogida de radiación en el detector.

En el caso de que se mida la reflectancia difusa se puede utilizar la expresión de Kubelka-Munk, donde el parámetro experimental R definido como el cociente de la intensidad de radiación leída por el detector con respecto a la intensidad reflejada por un patrón:

$$R = \frac{I_x}{I_{\text{std}}} \quad (1.9)$$

Reflectancia que se relaciona con la concentración a través de una expresión del tipo:

$$\frac{(1-R)^2}{2R} = \frac{K}{S} = \frac{\varepsilon C}{S} \quad (1.10)$$

en la que K es el coeficiente de absorción, S es el coeficiente de reflexión, ε es la absorptividad molar y C es la concentración. Las medidas de reflectancia son comparables a las de transmitancia y al igual que ella no se relaciona linealmente con la concentración. Se han usado diversos algoritmos, que dependen de la naturaleza de la iluminación, de las características reflectantes de la tira reactiva seca y de la geometría del instrumento, para convertir las medidas de reflectancia en función lineal de la concentración³⁴.

Gran número de las reacciones usadas en sensores de un solo uso para la determinación de especies basadas en reactivos cromogénicos convencionales son irreversibles. Esto se debe a

diversas razones, la primera de las cuales es que la constante estabilidad K_e es muy grande, esto es, producen una gran variación negativa de energía libre. Como el rango de respuesta aproximadamente abarca $\log K_e \pm 1$, si se cumple que $pA < (\log K_e - 1)$, el reactivo se encontrará saturado por el analito A^m presente y un ulterior aumento en la concentración de ese analito aniónico no originará un aumento de señal.

La forma más habitual de usar esos sensores irreversibles es ponerlos en contacto con un volumen fijo de analito, de forma que se establezca un aparente equilibrio que estará gobernado por la cantidad total de analito en la muestra, de forma que el analito será extraído de la muestra a la tira reactiva tal como se observa en la Figura 1.4, donde se cumple que $C_1 > C_2 > C_3$. Se alcanzará la saturación una vez que la cantidad de analito excede la capacidad enlazante de la membrana.

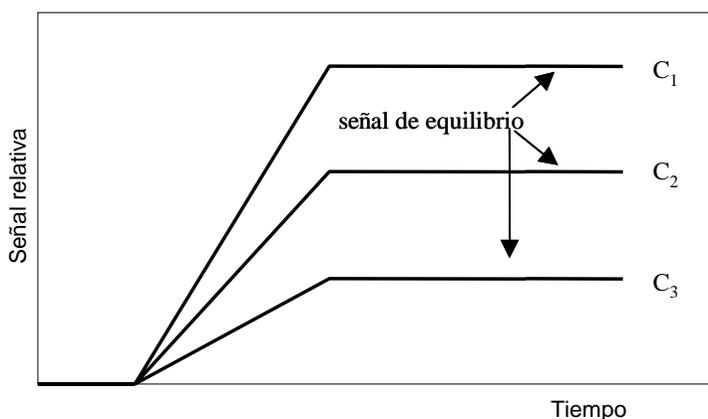


Figura 1.4. Respuesta de los sensores desechables a un volumen fijo de problema

Una segunda razón que justifica la irreversibilidad es la lenta velocidad de reversión de las reacciones. Esto es, que la velocidad de reacción entre el agente reactivo y el analito es alta, pero la reacción inversa es muy lenta. A veces, la regeneración de la membrana se logra con ácidos diluidos, entre pH 1 y 2 o bien añadiendo algún otro reactivo. Sin embargo, los sensores desechables se suelen considerar de un solo uso debido a su bajo precio.

Como vemos, las condiciones para la determinación de especies mediante sensores desechables difieren de las empleadas habitualmente en disolución usando los mismos reactivos, pues en disolución se usa exceso de reactivo o reactivos, en ocasiones grandes, para, junto con los altos valores de constante de equilibrio, conseguir desplazar la reacción completamente hacia la formación de productos. En sensores desechables, al igual que para sensores en formato fibra óptica o de flujo, la cantidad de reactivo es constante y normalmente no muy elevada. En el caso de que la constante de equilibrio fuera muy alta, lo cual suele ser habitual con el uso de reactivos cromogénico o fluorogénicos convencionales, se podría extraer todo el analito de la disolución hasta el punto en que se agote todo el reactivo.

En este caso, el sensor desechable no funciona como un sensor reversible, pues el sensor perturba la muestra, sino como un dispositivo de preconcentración permitiendo la determinación de pequeñas concentraciones de analito. Esta opción utiliza una transformación irreversible del analito aniónico que genera un producto fácilmente cuantificable. La selectividad proviene en este caso de la propia transformación/reacción del analito, aunque puede ser mejorada mediante posteriores tratamientos que eliminen los interferentes concomitantes, ya que el producto formado no se perderá. Este es lo que a veces se conoce como metodología tipo dosímetro que es adecuada para la concentración de analito, aunque menos útil si se producen cambios rápidos y/o de gran intensidad en la concentración de analito³⁵.

De este tipo es la determinación de nitrito con un sensor desechable, que se discute en el capítulo siguiente, basado en la diazotación de sulfanilamida con nitrito en medio ácido y posterior reacción de copulación con N-(1-naftil)etilendiamina y retención del azoderivado catiónico formado sobre el polímero sulfónico Nafion mediante intercambio iónico.

3.2. Sensores desechables basados en reactivos ionóforos

El término ionóforo o portador de iones fue utilizado para describir la capacidad transportadora de iones a través de membranas de la valinomicina y nigericina y señalar el aspecto dinámico del

mecanismo de transporte³⁶, aunque también se usa el término general ligando para señalar la asociación y coordinación entre la molécula portadora y el ión.

Así Moore y Pressman observaron una liberación de protones a partir de mitocondrias en disoluciones de potasio y evidenciaron las propiedades únicas de la valinomicina para inducir el transporte activo de potasio a través de membranas y su intercambio por protones³⁷. Este proceso de cambio iónico se da también a través de bicapas artificiales³⁸, así como en la interfase de membranas poliméricas plastificadas de electrodos selectivos de iones³⁹.

La limitación principal que presentan los reactivos convencionales para el desarrollo de sensores de tipo sonda, flujo y, en menor extensión, de gota plana, se debe a las altas constantes de estabilidad que originan con iones metálicos. Ello hizo que aumentará el interés por el uso de ionóforos, que se pueden considerar como moléculas orgánicas lipofílicas, no coloreadas y con capacidad para complejar iones de forma reversible y transportarlos a través de membranas orgánicas³². Este tipo de moléculas ha encontrado una amplia utilización en electrodos selectivos de iones especialmente para iones alcalinos y alcalinotérreos y aniones como cloruro⁴⁰.

En este caso el sensado se logra mediante interacciones supramoleculares, esto es interacciones no covalentes, que tienen la característica general de que son suficientemente débiles como para dar lugar a un proceso de tipo reversible³⁵.

Aunque la química basada en receptores para cationes comenzó en 1967 con las investigaciones de Pedersen acerca de la complejación de metales alcalinos con éteres corona, los receptores para aniones no comenzaron a estudiarse hasta 1976 cuando Graf and Lehn⁴¹ describen el encapsulamiento de fluoruro, cloruro y bromuro por un criptato protonado.

El reconocimiento y solubilización de un determinado analito –huésped- por parte del receptor o molécula anfitrión es el resultado de una combinación de aspectos complementarios: número y tipo de átomos/grupos enlazantes, tamaño y forma de la cavidad que originan en la molécula, organización estereoquímica y posicional exacta de los grupos enlazantes y grupos funcionales no enlazantes de la molécula, adecuada preorganización –conformación- de la molécula y

reparto favorable de la combinación formada entre las fases acuosa –muestra- y orgánica –zona sensora-. Los tipos de interacciones puestas en juego no son de tipo covalente sino de baja energía, lo que justifica la reversibilidad.

El reconocimiento de aniones se puede lograr mediante receptores abióticos que emplean diferentes tipos de interacción⁴². La que origina interacciones más fuertes son las interacciones electrostáticas de tipo culombiano, esto es, la que tiene lugar entre cargas enteras. Se puede diseñar un receptor para aniones basándose exclusivamente en atracciones culombianas si se elimina la fluctuación estocástica de cargas positivas alrededor del analito aniónico en disolución y se sustituye por un campo permanente. La idea básica de sustituir la nube de cargas fluctuantes por cargas positivas unidas covalentemente en una molécula llevó a diseñar receptores tipo amonio cuaternario³⁵.

La eficiencia de los receptores tipo amonio cuaternario se puede incrementar de forma considerable mediante enlaces de hidrogeno complementarios. Para evitar la competencia de contraiones presentes, se pueden utilizar receptores eléctricamente neutros mediante la disposición adecuada de grupos aniónicos unidos covalentemente que originen estructuras zwitterionicas. Otra alternativa es disponer de dipolos eléctricos incorporados en la estructura del receptor de forma que su extremo positivo se oriente hacia donde debe unirse el anión. Además de los receptores basados en amonio cuaternario se han propuesto sales de guanidinio en los que la interacción ocurre por enlace de hidrógeno y apareamiento de cargas^{43;44}

Sin embargo, los receptores más eficientes y más fácilmente practicables son los receptores aniónicos neutros basados en enlace de hidrógeno como principal interacción. Su gran ventaja es que estos enlaces son direccionales, lo que permite diseñar receptores con formas específicas capaces de diferenciar entre huéspedes aniónicos con diferente geometría y, por tanto, con diferentes requerimientos para interactuar por enlace de hidrógeno. Se han propuesto un gran número de receptores de aniones⁴⁵, entre ellos se encuentran amidas^{46;47}, sulfonamidas, ureas⁴⁸, tioureas⁴⁹, aunque también compuestos con simples grupos hidroxilos o heterociclos como pirrol o imidazolio.

Aunque no es necesaria la presencia de pares electrónicos libres en el anión analito para que se originen enlaces de hidrógeno, cuando existen tienen gran importancia para su reconocimiento supramolecular. Así, en el caso de que el anión posea pares electrónicos libres, lo cual es muy

frecuente, estos pueden servir para originar interacciones tipo Lewis con receptores que posean grupos aceptores de electrones. Con este objetivo se han utilizado moléculas orgánicas con zonas altamente deficientes de electrones como heterociclos tipo tetrazina o complejos π de metales con grupos aromáticos orientados o compuestos con centros metálicos como puntos de interacción directa³⁵. En este último caso hay diferentes formas de unir el metal a la estructura orgánica. Algunos metales como estaño, boro o mercurio forman enlaces covalentes fuertes y directos que permiten la construcción de receptores con funcionalidad ácido Lewis situada en posiciones predeterminadas con una orientación precisa dentro de la estructura⁴⁵. El uso conjunto de enlaces de hidrógeno e interacciones electrostáticas es capaz de originar receptores de aniones muy efectivos, como es el uso de cajas macrocíclicas protonadas para haluros⁴².

Alternativamente, se pueden construir estructuras receptoras conteniendo un cierto número de posiciones de coordinación con heteroátomos que se usan para formar complejos tipo Werner coordinativamente insaturados con iones metálicos⁵⁰. Las dos estrategias usan el solapamiento de orbitales atómicos de huésped y anfitrión a través del metal para el reconocimiento. Entre los receptores basados en complejos con metales de transición tenemos los complejos tipo polipiridilo principalmente con iones de los metales de los grupos 8 y 9, los basados en tricarbonilo de renio (III), los complejos de lantánidos (III)⁵¹ y los metalodendrimeros⁵⁰.

No se pueden considerar estrictamente como interacciones supramoleculares estas interacciones, pero dado que no suelen ser los enlaces formados de alta energía lo que permite que sean reversibles, es por lo que se pueden considerar como ejemplos de sistemas huésped-receptor. Un ejemplo típico de la incorporación covalente de centros metálicos son los mercuracarborandanos⁵².

Un último tipo de interacción usada para el reconocimiento de aniones es el efecto hidrofóbico. Así se ha propuesto para el reconocimiento de naftalenosulfonatos por parte de β -ciclodextrinas y es debido al desplazamiento de moléculas de agua de la cavidad interna de la ciclodextrina por parte del anillo de naftaleno, mientras que el grupo sulfonato permanece fuera de la cavidad en contacto con el disolvente, lo que controla la orientación del grupo naftaleno dentro de la cavidad⁵³.

4. Uso de ionóforos para aniones en sensores ópticos

Se han utilizado diversos planteamientos para el desarrollo de sensores en los cuales se combina la selectividad que aportan los ionóforos con medidas de tipo óptico. De forma amplia podríamos decir que un sensor óptico para aniones consta de dos partes. Una de ellas es el lugar de unión del anión mediante el uso de un receptor de aniones. Como más arriba se ha comentado los principales grupos de receptores de aniones pertenecen a dos categorías: receptores neutros y receptores cargados positivamente. La segunda parte es el cromóforo que convierte el acto del reconocimiento del analito por el receptor en una señal óptica. Estas dos partes, que se ilustran en la Figura 1.5, pueden estar covalentemente enlazadas, intermolecularmente unidas una a otra o mecánicamente relacionadas.

Cada parte cumple una función precisa; en la primera reside la función de coordinación con un anión dado, mientras que en la segunda residen los cambios en algunas propiedades espectroscópicas (color, fluorescencia) debido a la coordinación. Este diseño general se basa en la coordinación del anión y en principio son reversibles, viniendo determinada la extensión del proceso por la concentración del anión presente⁵⁴.

Además de este tipo de sistema, existen otros en los que el proceso de interacción conduce a cambios irreversibles de color o fluorescencia. A este tipo de sistemas se les suele conocer como dosímetros o quimodosímetros (*chemodosimeters*). Se pueden definir como dispositivos de tamaño molecular o mayor que utilizan receptores abióticos para lograr el reconocimiento del analito con una transducción irreversible concomitante que es observable visualmente⁵⁵.

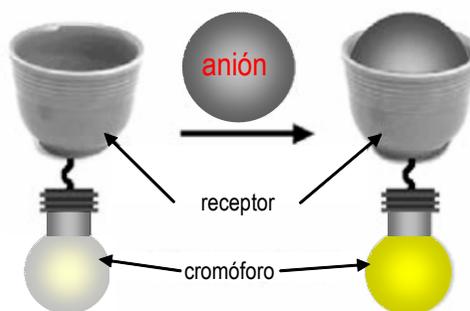


Figura 1.5. Esquema operativo de un sensor de aniones⁵⁶.

Se han utilizado diferentes tipos de sensores para aniones basados en moléculas que presentan covalentemente unidas la zona receptora y la zona señalizadora. No serán tratados en esta Introducción por no ser utilizados en esta Memoria de Doctorado, aunque se citan diversas revisiones que tratan el tema por extenso, como son las de Martínez-Mañez et al.^{54;57}, Davis et al.⁵⁸, Fabbrizzi et al.⁵⁹ y Pohl et al.⁶⁰.

Si consideramos los sensores en los que la zona receptora y la zona señalizadora no están covalentemente unidas, sino que corresponden a dos moléculas diferentes relacionadas mecánicamente entre sí, podemos citar dos tipos de esquemas principales.

a) Combinación de ionóforos con colorantes sensibles a potencial. La ubicación de un ionóforo selectivo para un anión dado a un lado de una membrana origina un cambio en el potencial de la membrana por complejación con el analito aniónico y, por tanto, en la distribución del colorante, originando así una respuesta óptica; por ejemplo una atenuación de fluorescencia por concentración; así se ha propuesto el cloruro de bencil bis(trifenilfosfina) paladio(II) como ionóforo para nitrito y cloruro de tridodecilmetil amonio como ionóforo para cloruro, usando en ambos casos rodamina B octadecilester como colorante sensible a potencial⁶¹.

b) Extracción de un ión junto con un contraión en una membrana; ese es el conocido como mecanismo de coextracción⁶². Este mecanismo pertenece a los que se denominan sistemas basados en un segundo componente ó sensores tipo Simon⁴⁰. Este mecanismo de sentido se utiliza en

algunos de los sensores desechables estudiados en esta Memoria, razón por la cual se discutirá a continuación.

4.1. Sensores basados en un segundo componente

En 1982 se describió un tipo de sistema de dos fases que hacía uso de una membrana en una tira reactiva óptica, del tipo antes llamado de química seca, para la determinación de iones alcalinos en fluidos biológicos⁶³. Este tipo de optodo de química seca pertenecía al tipo, mencionado anteriormente, de los basados en segundo componente, en el cual un indicador de pH se combina con un ionóforo para transducir la información producida por la interacción aceptor-huésped en una señal de tipo óptico. A este principio se denominó inicialmente de *heterogenous pH reaction*⁶⁴.

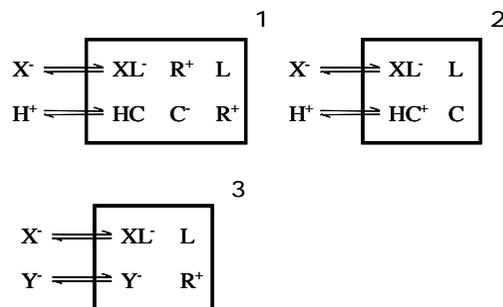
En este caso, se incorporaba en la fase orgánica el ionóforo éter 2,3-nafto-15-corona-5 y el indicador de pH 7-(n-decil)-2-metil-4-(3',5'-diclorofen-4'-ona). La extracción de K⁺ en fase orgánica originaba que el indicador sufriese una desprotonación, lo que originaba un cambio en el estado electrónico del indicador y el consecuente desplazamiento espectral.

Este sistema fue patentado por Miles Inc. y comercializado bajo el nombre de analizador de química seca Seralyzer^{65,66}. Entre 1983 y 1986 tanto el instrumento como las tiras reactivas fueron evaluadas y el mecanismo en que se basan fue estudiado y discutido por el grupo del Prof. Simon en la ETH de Zurich (Suiza)⁶⁷. Dicho principio fue adaptado para optodos selectivos de iones, tanto de tipo sonda como de flujo, y usado para el desarrollo de gran número de membranas principalmente para diferentes iones metálicos^{62,68}.

Estos sensores se basan en los cambios de concentración en el seno de una fase separada o tridimensional –las llamadas *bulk membranes*– que contiene todos los componentes necesarios, disueltos en una membrana polimérica plastificada, generalmente de cloruro de polivinilo (PVC) o un polímero similar, para la extracción y reconocimiento del analito y para la transducción de la entalpía libre del proceso en una señal de tipo óptico.

Los optodos basados en películas hidrófobas no pueden responder a un solo ión, debido a que se debe cumplir el principio de electroneutralidad en el seno de la membrana y no puede haber una transferencia neta de carga hacia la misma. Por ello, se utiliza un equilibrio de transferencia de fase que involucre dos iones diferentes, -uno de ellos el analito y el otro un ión de referencia- de manera que se permita la transferencia de iones en ambos sentidos y se mantenga en todo momento la electroneutralidad en la membrana. Generalmente, la reacción de complejación de uno de los dos iones –el analito- con el ionóforo es el que conduce o desencadena la respuesta de tipo óptico debida al segundo ión o ión de referencia: cambio de absorbancia, fluorescencia, fosforescencia o índice de refracción. Esto significa que la respuesta del sensor se ha descompuesto en dos procesos diferentes: el de reconocimiento del analito por parte del ionóforo y el de transducción de la energía libre del proceso anterior mediante el reconocimiento del ión de referencia mediante un ionóforo específico denominado cromoionóforo.

Membranas con ionóforo neutro



Membranas con ionóforo cargado

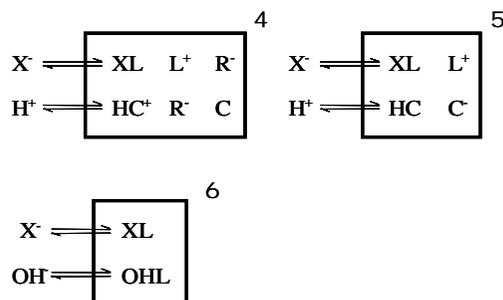


Figura 1.6. Membranas sensoras para aniones basadas en coextracción

El cromoióforo de transducción química debe mostrar una alta selectividad hacia el ión de referencia y debe reaccionar con él de forma reversible. Generalmente, el ión de referencia utilizado es el protón, pues se pueden usar como cromoióforos indicadores de pH que responden muy selectivamente a este ión. El emplear protones como ión de referencia tiene diversas ventajas, pues el pH de la muestra se puede variar y tamponar en un rango muy amplio de valores y se pueden usar gran número de indicadores con valores de pK_a diferentes, con la condición de que estén lipofilizados, al objeto de que puedan disolverse en la membrana lipofílica de PVC.

Se han usado una gran variedad de ionóforos y cromoióforos tanto neutros como cargados para la preparación de membranas sensoras. Por otra parte, dependiendo de la carga de los analitos se definen dos mecanismos mediante los cuales se origina la respuesta óptica: un mecanismo de cambio iónico para analitos catiónicos y un mecanismo de extracción para aniónicos.

Dejando de un lado las membranas sensoras de cationes, las membranas sensoras de aniones, basadas en equilibrio de coextracción, se pueden usar ionóforos neutros L y cromoióforos cargados C⁻, lo que a su vez exige el empleo de cationes lipofílicos R⁺ (Figura 1.6.1) o bien, si el cromoióforo C es neutro, no serán necesarios tales cationes lipofílicos (Figura 1.6.2). En el caso de que el ionóforo este cargado L⁺ serán necesarias posiciones aniónicas R⁻ en la membrana, siempre que el cromoióforo no esta cargado C (Figura 1.6.3) y no lo serán en caso contrario (Figura 1.6.4). Por último, membranas que solo contengan un cromoióforo neutro pueden actuar como sensoras de aniones (Figura 1.6.6) aunque no coextraen aniones selectivamente, sino que muestran un esquema de selectividad tipo Hofmeister, esto es, la selectividad varía de acuerdo con la lipofilicidad del anión⁶⁹.

4.2. Sensores basados en un segundo componente para aniones

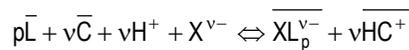
Vamos a discutir a continuación de forma breve la teoría del mecanismo de sensado basado en coextracción que emplea ionóforos neutros, pues este tipo es uno de los que se ha usado en esta Memoria de Doctorado, para la puesta a punto de sensores desechables para aniones. Este tipo de sensores ópticos tiene la característica de responder a la actividad del analito en contraste con otros métodos analíticos en los que se mide concentración total.

Como caso general, consideraremos que el analito es un anión X^{v-} que reacciona con un ionóforo neutro L de carácter lipofílico para originar el complejo XL_p^{v-} que se retendrá en la fase orgánica polimérica como par iónico con el cromoióforo protonado XL_pHC_v . Como se indica esquemáticamente en la Figura 1.6, en el caso de que el cromoióforo este cargado será necesaria la presencia de una sal de catión lipofílico necesaria para que se pueda dar el equilibrio de coextracción.

La extracción del analito desde la disolución problema al sensor desechable se puede describir mediante un esquema de tres etapas: a) difusión del analito a través de la interfase de la muestra; b) transferencia de fase y proceso de complejación/descomplejación; y c) difusión de las especies a través de la membrana⁷⁰.

Al introducir el sensor en una disolución que contiene el analito X^{v-} , y para mantener la electroneutralidad en la membrana, se produce una coextracción de cationes de forma que por cada carga negativa que entre en forma de analito para complejar con el ionóforo y originar XL_p^{v-} , debe entrar otra carga positiva, y la única disponible son los protones que se asocian al cromoióforo. Así como la entrada de analito no es perceptible, la entrada concomitante de cargas positivas si es susceptible de transducción óptica mediante la variación de la absorbancia del cromoióforo al protonarse.

El equilibrio global de coextracción que tiene lugar entre la muestra y el sensor desechable será:



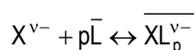
En este caso no es necesaria la presencia de cationes lipofílicos para permitir el equilibrio. Este equilibrio de coextracción viene gobernado por la constante $K_e^{XL_p}$

$$K_e^{XL_p} = \frac{[XL_p^{v-}] \cdot [HC^+]^v}{a_{X^{v-}} \cdot a_{H^+}^v \cdot [C]^v [L]^p} \quad (1.11)$$

En ella las concentraciones en fase orgánica vienen dadas en molalidades (moles kg⁻¹) y sus coeficientes de actividad se denotan por γ . En fase acuosa las actividades se denotan por a .

Esta constante $K_e^{XL_p}$ será función de la constante de estabilidad del complejo, de la constante de acidez del cromoióforo y de las lipofilidades relativas del analito $K_{X^{v-}}$ y del protón K_{H^+} .

La constante de complejación se refiere al equilibrio:



y viene dada por

$$\beta_{XL_p^{v-}} = \frac{a_{XL_p^{v-}}}{a_{X^{v-}} a_L^p} \quad (1.12)$$

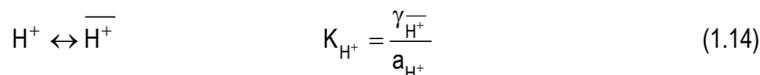
La constante de acidez del cromoióforo, por su parte, responde al equilibrio:

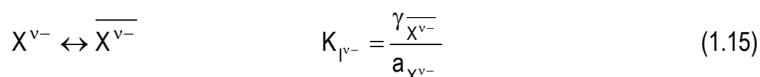


y viene dada por:

$$K_a = \frac{a_{H^+} a_C}{a_{HC^+}} \quad (1.13)$$

Las lipofilidades relativas del analito $K_{X^{v-}}$ y del protón K_{H^+} se pueden describir mediante a los equilibrios:





Si sustituimos actividades por las correspondientes concentraciones y coeficientes de actividad en las cuatro constantes que acabamos de definir y, a su vez, operamos en la $K_e^{XL_p}$ (ec. 1.11) resulta que la constante de coextracción se relaciona con las constantes de formación del complejo, de acidez del cromoióforo y las lipofilidades de los iones principal y de referencia, así como con los coeficientes de actividad en fase membrana, según:

$$K_e^{XL_p} = \frac{K_{X^{v-}} K_{H^+}^v \beta_{XL_p^{v-}}}{K_a^v} \left(\frac{Y_C}{Y_{HC^+}} \right)^v \frac{(Y_L)^p}{Y_{XL_p^{v-}}} \quad (1.16)$$

Como vemos las actividades de todas las especies involucradas controlan el equilibrio, pero solo la concentración del cromoióforo será accesible a través de medidas ópticas. En consecuencia, es esencial que los coeficientes de actividad permanezcan constantes en todo el rango de medida. Para una membrana dada del tipo que estamos considerando, la fuerza iónica dentro de ella puede variar, pues no contiene sal lipofílica. En caso de membranas que la contengan y de acuerdo con la teoría de Debye-Hückel, se debería originar un coeficiente de actividad medio constante en fase membrana. No obstante, y en una primera aproximación, vamos a suponer a lo largo de esta Memoria que los coeficientes de actividad de las especies cargadas son despreciables y que el cambio en los coeficientes de actividad de las especies neutras son relativamente pequeños dentro del rango de calibración, si su concentración total se mantiene baja. Cuando la cantidad de alguno de los componentes de la membrana se incrementa, así de ionóforo por razones de selectividad, se observa un cambio en el coeficiente de actividad y, por tanto, en la constante de equilibrio $K_e^{XL_p}$ 71.

La aproximación que aceptamos significa que las concentraciones en fase orgánica son proporcionales a las actividades. En resumen, la expresión anterior queda reducida a:

$$K_e^{XL_p} = \frac{K_{X^{v-}} K_{H^+}^v \beta_{XL_p^{v-}}}{K_a^v} \quad (1.17)$$

Para expresar la constante de equilibrio $K_e^{XL_p}$ en función de parámetros experimentales, realizaremos un balance de masas respecto a ionóforo (C_L concentración analítica de ionóforo) y con respecto a cromoionóforo (C_C concentración analítica de cromoionóforo):

$$C_L = [L] + p[XL_p^{v-}] \quad (1.18)$$

$$C_C = [C] + [HC^+] \quad (1.19)$$

Así mismo definiremos la fracción de cromoionóforo α como el cociente de forma no protonada a total:

$$[C] = \alpha C_C \quad (1.20)$$

Luego

$$[HC^+] = (1 - \alpha) C_C \quad (1.21)$$

Como el cromoionóforo es la única especie detectable en la membrana, si medimos a una longitud de onda característica de la especie desprotonada, podemos definir una absorbancia normalizada, que será la misma fracción α anterior, como parámetro analítico, de manera que si $\alpha = 1$ no habrá cromoionóforo protonado y le corresponderá una absorbancia A_1 y si $\alpha = 0$ todo el cromoionóforo estará protonado y su absorbancia correspondiente será A_0 . La forma habitual de establecer A_1 consiste en tratar la membrana con una disolución 0,01 M de NaOH lo que obliga a que todo el cromoionóforo esté en forma básica. En el caso de A_0 se trata con HCl 0,01 M, o con otro ácido fuerte, con lo que el cromoionóforo se encontrará en forma ácida.

Sustituyendo resulta:

$$\alpha = \frac{[C]}{[C_o]} = \frac{A - A_o}{A_1 - A_o} \quad (1.22)$$

Si combinamos las ecuaciones 1.17, 1.18, 1.19, 1.20 y 1.21 obtendremos la función respuesta de la membrana sensora para el ión X^{v-} :

$$K_e^{XL_p} = \frac{(1 - \alpha)^{v+1}}{\alpha^v \left(\frac{C_L}{C_C} - (1 - \alpha) \cdot \frac{p}{v} \right)^p \cdot v \cdot C_c^{p-1} \cdot a_{X^{v-}} \cdot a_{H^+}^v} \quad (1.23)$$

$$a_{X^{v-}} = \frac{(1 - \alpha)^{v+1}}{\alpha^v \left(\frac{C_L}{C_C} - (1 - \alpha) \cdot \frac{p}{v} \right)^p \cdot v \cdot C_c^{p-1} \cdot K_e^{XL_p} \cdot a_{H^+}^v} \quad (1.24)$$

Dado que la membrana sensora está en equilibrio químico con la muestra conteniendo analito, lo que mediremos no serán concentraciones, sino el producto de actividades entre el ión de referencia y el analito. Si se mantiene constante la actividad del ión de referencia podemos despejar la actividad del analito (ecuación 1.24).

Si representamos la actividad del analito frente al grado de desprotonación según la ecuación citada obtendremos la curva representada en la Figura 1.7, la cual no nos ofrece mucha información salvo que la usemos en forma logarítmica.

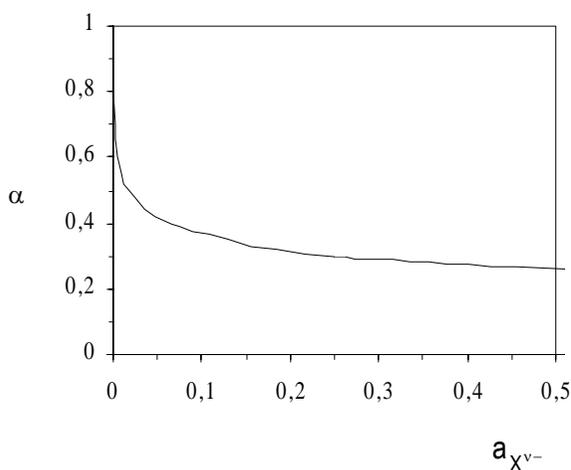


Figura 1.7. Actividad del analito vs. grado de protonación

Si tomamos logaritmos en la ecuación anterior y establecemos como variable independiente $\log a_{X^{v-}}$ y como variable dependiente α y las renombramos como X é Y, respectivamente, llegamos a la ecuación 1.24, cuya inversa $Y=f(X)$ podemos observar en la Figura 1.8.

$$X = \log \left(\frac{(1-Y)^{v+1}}{Y^v \left(\frac{C_L}{C_C} - (1-Y) \cdot \frac{p}{v} \right)^p \cdot v \cdot C_c^{p-1} \cdot K_e^{XL_p} \cdot a_{H^+}^v} \right) \quad 1.25$$

Si tenemos en cuenta en esta expresión que: 1) C_C y C_L son conocidos; 2) que v y p toman valores discretos y conocidos en tanto se ha estudiado el sistema y el comportamiento del cromoióforo y del ionóforo en uso; 3) que $K_e^{XL_p}$ la podemos calcular, bien teóricamente si conocemos las constantes de distribución y formación de las especies implicadas, o bien empíricamente mediante el establecimiento de un modelo sigmoideal, tal como se explicará más tarde; y 4) conociendo la actividad del catión de referencia en la disolución problema, nos queda entonces que $a_{X^{v-}} = f(\alpha) \equiv f(A)$.

Esto es, resulta una respuesta, y en consecuencia un modelo de tipo sigmoideal, ya que usualmente se suele representar en función de $\log a_{X^{v-}}$ tal como se muestra en la Figura 1.8, pues como hemos dicho la variación de α con la actividad del analito no ofrece información interesante por el gran número de décadas que implica. Por ello, se usa la representación frente al logaritmo decimal de la actividad. Este modelo no tiene la sencillez de un modelo lineal, pero permite, de una manera fácil, la determinación experimental de la actividad del analito.

De manera similar se han desarrollado expresiones, que resultan ser análogas, para el caso de sensores basados en un segundo componente que utilizan en vez de un cromoióforo, un fluoroionóforo, esto es un indicador ácido-base fluorescente de tipo lipofílico⁷².

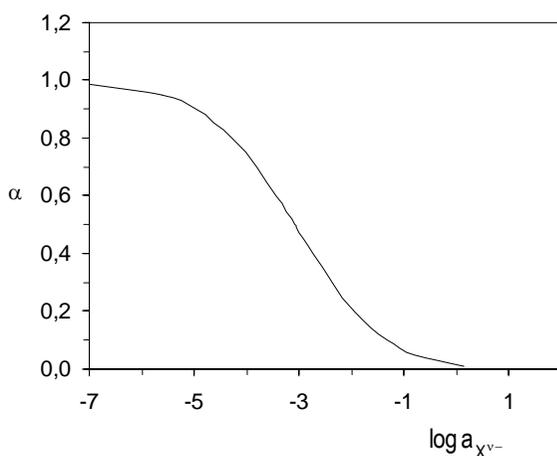


Figura 1.9. Modelo sigmoideal de respuesta en sensores para aniones basados en un segundo componente

En algunas ocasiones el cromoióforo presente no se puede protonar de forma completa, lo que se puede deber a diversas causas, así por ejemplo que la concentración de cromoióforo sea mayor que la de sal lipofílica por razones de selectividad o bien a que el pH de trabajo no lo permita. Esto hace que no se pueda determinar A_0 y, por tanto, tampoco α como indica la ecuación 1.22. Para resolver el problema se utiliza un valor de α efectivo, α_{ef} , que señalará el grado de desprotonación en

esas concretas condiciones de concentración de sal lipofílica o de pH⁶². En la presente Memoria de Doctorado se usa α_{ef} por esta segunda razón, lo que nos permite conocer el grado de protonación con respecto a disoluciones reguladoras dadas:

$$\alpha_{ef} = \frac{A - A_o}{A_{tampón} - A_o} \quad (1.26)$$

Se puede generalizar más aún el modelo anterior para el caso en que junto al anión X^{v-} se coextraiga un catión genérico M^{z+} , en lugar de un protón, como se puede ver en el esquema de la figura 1.10.

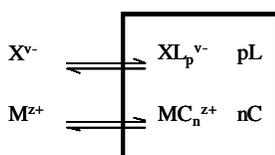
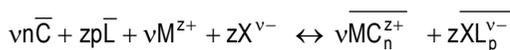


Figura 1.10. Esquema general de sensorado para un proceso de coextracción de un anión y un catión genérico.

En este caso el equilibrio global de coextracción que tiene lugar entre la muestra y el sensor desechable es:



Y la ecuación que gobierna este proceso general, que se deduce de un modo similar a como lo hemos hecho más arriba, es la siguiente:

$$K_e^{XL_p} \cdot (a_{M^{z+}})^v \cdot (a_{X^{v-}})^z = \frac{(1 - \alpha)^{z+v}}{[\alpha^n \cdot n \cdot C^{n-1}]^v \cdot \left[\left(\frac{C_L}{C_C} - (1 - \alpha) \cdot \frac{p \cdot z}{n \cdot v} \right)^p \cdot \frac{n \cdot v}{z} \cdot C^{p-1} \right]^z} \quad (1.27)$$

5. Bibliografía

1. Capitán-Vallvey, L. F. *Encyclopedia of Sensors*, Grimes, C. A.; Dickey, E. C. Pishko, M. V., Eds.; 1 ed.; The Pennsylvania State University: 2005.
2. Zolotov, Yu. *Ann.Chim.* 1997, 87, 285-95.
3. Lange, H., Rittersdorf, W., Rey, H. G. (2001) Patente US 3,897,214
4. Shi, G.-Q.; Jiang, G. *Anal.Sci.* 2002, 18, 1215-19.
5. Niedbala, R. S.; Feindt, H.; Kardos, K.; Vail, T.; Burton, J.; Bielska, B.; Li, S.; Milunic, D.; Bourdelle, P.; Vallejo, R. *Anal.Biochem.* 2001, 293, 22-30.
6. Ho, J. A. A.; Wauchope, R. D. *Anal.Chem.* 2002, 74, 1493-96.
7. Anand, K., Koon-Wah, L. (1985) Patente EP 0141647
8. Charlton, S. C., Hemmes, P., Lau, A. L. Y. (1987) Patente US 4,649,123
9. Mehta, D. V. (1976) Patente FR 2,303,290
10. Curme, H. G.; Columbus, R. L.; Dappen, G. M.; Eder, T. W.; Fellows, W. D.; Figueras, J.; Glover, C. P.; Goffe, C. A.; Hill, D. E.; Lawton, W. H.; Muka, E. J.; Pinney, J. E.; Rand, R. N.; Sanford, K. J.; Wu, T. W. *Clin.Chem.* 1978, 24, 1335-42.
11. Clement, P. L. (1977) Patente US 4,042,335
12. Przybylowicz, E. P., Millikan, A. G. (1976) Patente US 3,992,158

13. Kitajima, M., Arai, F., Kondo, A. (1982) Patente US 4,356,149
14. Arena, M. P.; Porter, M. D.; Fritz, J. S. *Anal.Chem.* 2002, 74, 185-90.
15. Amelin, V. G.; Kolodkin, I. S. *J.Anal.Chem.* 2001, 56, 182-87.
16. Guardiola Vicente, J. M. *La orina y su análisis*, Quimica Farmaceutica Bayer, Ed.; Madrid, 1995.
17. Kaminagayoshi, S. (1985) Patente EP 0160240
18. Small, P. A. and Huang, S. H. (8-6-1999) Patente US 5,910,421
19. Boehringer Mannheim GmbH (1977) Patente GB1463434
20. Guonan, Chen, Haixia, Lu, Zenghong, Xie (2003) Patente CN 1445531
21. Carhart, Homer W. (1950) Patente US 2534229
22. Tobarí, Shizen, Nakano, Mariko (1980) Patente US 4,211,532
23. Ogita, Zen-ichi (1988) Patente US 4,744,952
24. Ruparisi Lakshman, L. S., Liese, K. (2000) Patente FR 2800166
25. Ostrovskaya, V. M.; Zolotov, Yu.; Shpigun, L. K; Kamilova, P. M.; Shishkin, Yu. L. *Field Anal.Chem.Tech.* 2000, 4, 147-53.
26. Starp, H.; Buschmann, N.; Cammann, K. *Fresenius J.Anal.Chem.* 2000, 368, 203-07.
27. Tess, M. E.; Cox, J. A. *J.Pharm.Biomed.Anal.* 1999, 19, 55-68.

-
28. Berry, M. N., Town, M.-H., Kresse, G.-B., Herrmann, U. (1995) Patente US 5,409,814
 29. Jaunakais, I., Jaunakais, J. K. (1992) Patente US 5,106,581
 30. Macherey-Nagel. Catalog Test Papers. 2004.
 31. Hisamoto, H.; Miyashita, N.; Watanabe, K.; Nakagawa, E.; Yamamoto, N.; Suzuki, K. *Sens.Actuators B* **1995**, *29*, 378-85.
 32. Oehme, I.; Wolfbeis, O. S. *Mikrochim.Acta* **1997**, *126*, 177-92.
 33. Seitz, W. R. *Anal.Chem.* **1984**, *56*, 16A-34A.
 34. Walter, B. *Anal.Chem.* **1983**, *55*, 498A-514A.
 35. Schmidtchen, Franz P. *Topics in Current Chemistry* **2005**, *255*, 1-29.
 36. Painter, G. R.; Pressman, B. C. *Host Guest Complex Chemistry II*, Vogel, F., Ed.; Springer: New York, 1982.
 37. Moore, C.; Pressman, B. C. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **1964**, *15*, 562.
 38. Mueller, P.; Rudin, D. O. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **1967**, *26*, 398.
 39. Stefanac, Z.; Simon, W. *Chimia* **1966**, *20*, 436.
 40. Spichiger-Keller, U. E. *Chemical Sensors and Biosensors for Medical and Biological Applications*, 1 ed.; Wiley-VCH: Weinheim, 1998.
 41. Graf, E.; Lehn, J. M. *J.Am.Chem.Soc.* **1976**, *98*, 6403.

-
42. Beer, Paul D.; Gale, P. A. *Angew.Chem.Int.Ed.* **2001**, *40*, 486-516.
 43. Best, Michael D.; Tobey, Suzanne L.; Anslyn, Eric V. *Coord.Chem.Rev.* **2003**, *240*, 3-15.
 44. Houk, Ronald J. T.; Tobey, Suzanne L.; Anslyn, Eric V. *Topics in Current Chemistry* **2005**, *255*, 199-229.
 45. Antonisse, Martijn M. G.; Reinhoudt, David N. *Chem.Commun.* **1998**, 443-48.
 46. Bisson, Adrian P.; Lynch, Vincent M.; Monahan, Mary Katherine; Anslyn, Eric V. *Angew.Chem.Int.Ed.* **1997**, *36*, 2340-42.
 47. Bondy, Chantelle R.; Loeb, Stephen J. *Coord.Chem.Rev.* **2003**, *240*, 77-99.
 48. Scheerder, J.; Engbersen, J. F. J.; Casnati, R. U.; Reinhoudt, D. N. *J.Org.Chem* **1995**, *60*, 6448-54.
 49. Nishizawa, S.; Teramae, N. *Anal.Sci.* **1997**, *13*, 485-88.
 50. Beer, P. D.; Bayly, S. R. *Topics in Current Chemistry* **2005**, *255*, 125-62.
 51. Dickins, R. S.; Gunnlaugsson, D. P.; Parker, D.; Peacock, R. D. *Chem.Commun.* **1998**, 1643-44.
 52. Badr, I. H. A.; Jhonson, R. D.; Díaz, M; Hawthorne, M. F.; Bachas, L. G. *Anal.Chem.* **2000**, *72*, 4249-54.
 53. Inoue, Yoshihisa; Hakushi, Tadao; Liu, Yu; Tong, Linhui; Shen, Baojian; Jin, Daosen *J.Am.Chem.Soc.* **1993**, *115*, 475-81.
 54. Martinez-Manez, Ramon; Sancenon, Felix *Chemical Reviews* **2003**, *103*, 4419-76.

-
55. Dujols, Virginie; Ford, Francis; Czarnik, Anthony W. *J.Am.Chem.Soc.* **1997**, *119*, 7386-87.
 56. Suksai, Chomchai; Tuntulani, Thawatchai *Topics in Current Chemistry* **2005**, *255*, 163-98.
 57. Martinez-Manez, Ramon; Sancenon, Felix *J.Fluor.* **2005**, *15*, 267-85.
 58. Davis, Frank; Collyer, Stuart D.; Higson, Seamus P. J. *Topics in Current Chemistry* **2005**, *255*, 97-124.
 59. Fabbrizzi, L.; Licchelli, M.; Rabaioli, G.; Taglietti, A. *Coord.Chem.Rev.* **2000**, *205*, 85-108.
 60. Pohl, Radek; Aldakov, Dmitry; Kubat, Pavel; Jursikova, Karolina; Marquez, Manuel; Anzenbacher, Pavel, Jr. *Chem.Comm.* **2004**, 1282-83.
 61. Mohr, G. J.; Murkovic, I.; Lehmann, F.; Haider, C.; Wolfbeis, O. S. *Sens.Actuators B* **1997**, *39*, 239-45.
 62. Bakker, E.; Bühlmann, P.; Pretsch, E. *Chemical Rev.* **1997**, *97*, 3083-132.
 63. Charlton, S. C.; Fleming, R. L.; Zipp, A. *Clin.Chem.* **1982**, *28*, 1857-61.
 64. Rittersdorf, W., Guethlein, W., Thym, D., Vogel, P. (1993) Patente US 5,215,924
 65. Gantzer, M. L., Hemmes, P., Wong, D (1984) Patente US Appl. 583,127
 66. Gantzer, M. L., Hemmes, P., Wong, D (1985) Patente Eur. Pat. Appl. EP 153,641
 67. Spichiger-Keller, U. E. *Chemical Sensors and Biosensors for Medical and Biological Applications*, 1 ed.; Wiley-VCH: Weinheim, 1998; Capítulo 6.
 68. Bühlmann, P.; Pretsch, E.; Bakker, E. *Chem.Rev.* **1998**, *98*, 1953-687.

69. Spichiger-Keller, U. E. *Chemical Sensors and Biosensors for Medical and Biological Applications*, 1 ed.; Wiley-VCH: Weinheim, 1998; Capítulo 3.
70. Seiler, K.; Simon, W. *Anal.Chim.Acta* **1992**, *266*, 73-87.
71. Seiler, K.; Wang, K.; Bakker, E.; Morf, W. E.; Rusterholz, B.; Spichiger-Keller, U. E.; Simon, W. *Clin.Chem.* **1991**, *37*, 1350-55.
72. Shortreed, M. R.; Bakker, E.; Kopelman, R. *Anal.Chem.* **1996**, *68*, 2656-62.

CAPITULO 2

SENSOR DESECHABLE PARA LA DETERMINACIÓN DE NITRITO EN AGUAS

SENSOR DESECHABLE PARA LA DETERMINACIÓN DE NITRITO EN AGUAS

1. Introducción

La presencia de compuestos nitrogenados en aguas naturales, tanto superficiales como subterráneas, se debe a que intervienen en reacciones bioquímicas que son necesarias para satisfacer los requerimientos metabólicos de organismos vivos. El vertido de aguas residuales, tanto urbanas como industriales y sobretodo el empleo de fertilizantes en agricultura, incrementan los contenidos de materia nitrogenada orgánica y inorgánica en aguas. Bajo condiciones ambientales normales y en presencia de oxígeno, muchos compuestos nitrogenados orgánicos pueden sufrir una serie de reacciones enzimáticas por las que se produce amoníaco, el cual es posteriormente oxidado a nitrito y nitrato (proceso de nitrificación).

El nitrato, aparte de otros problemas, puede ser reducido, por una bacteria que se encuentra en el aparato digestivo, especialmente en lactantes, a nitrito, el cual reacciona con la hemoglobina dando lugar a metahemoglobinemia. Además, el nitrito, reacciona con aminas secundarias y terciarias en productos alimentarios para dar lugar a la producción de nitrosaminas, compuestos que parecen poseen acción cancerígena. Por todo esto, el análisis de nitrito en agua es necesario no solo por su carácter indeseable, sino también porque actúa como un indicador de contaminación bacteriana. De hecho, muchos países miembros de la comunidad europea^{1:2} requieren que el agua de consumo humano tenga una concentración máxima admisible en nitrito de $0,1 \text{ mg L}^{-1}$.

El método usual para llevar a cabo este análisis, requiere, tomar una muestra, conservarla refrigerada a una temperatura de 4°C , o acidificarla a $\text{pH} < 2$ con H_2SO_4 y ser transportada al laboratorio donde el análisis tendrá que ser llevado a cabo con la mayor brevedad posible, no mas tarde de 24 horas después de la toma de muestra.

Sin embargo, una de las tendencias actuales de la Química Analítica, es la obtención de la información química en el lugar donde se necesite sin necesidad de toma de muestra, conservación, transporte o análisis en el laboratorio por personal especializado. Existen métodos de análisis rápido (*test kits*) para análisis químico³ que presentan interés por su rapidez, simplicidad, bajo coste económico, y porque permiten la detección y/o determinación del analito sin la necesidad de personal especializado o incluso de un laboratorio⁴. Estos métodos de análisis rápido son procedimientos de análisis especialmente adaptados y consisten en una reacción química, bioquímica o inmunológica junto con un sistema para la evaluación, estando ambos procesos bien acoplados uno a otro. Se basan en el uso de algún efecto observable visualmente, normalmente una comparación con una carta de colores o la medida de alguna propiedad analítica susceptible de ser medida.

Los análisis basados en ensayos rápidos se pueden llevar a cabo de dos maneras: en disolución o en fase sólida. Los sistemas de fase sólida más comunes son los sensores desechables, también llamados tiras reactivas, los cuales normalmente consisten en unas pequeñas láminas de un material plástico con matrices o zonas de reacción adheridas o termoselladas.

La mayoría de los procedimientos para tiras reactivas se basan en medidas de reflectancia difusa de una zona reactiva opaca que contiene los reactivos del ensayo. Se han descrito algunos sistemas para la preparación de tiras reactivas transparentes que absorben líquidos empleando un polímero formador de membrana y un componente que se hincha en agua⁵. Nosotros hemos empleado la metodología de membranas tridimensionales, llamadas "*bulk membranes*"⁶ para el desarrollo de una base transparente y desechable para el sensor de este tipo. Así, este grupo de investigación ha propuesto diversos métodos cuantitativos basados en sensores desechables para la determinación de diferentes analitos, como por ejemplo, hierro⁷, calcio⁸, o ácido nalidíxico en agua y orina⁹.

Existe un buen número de tiras reactivas comerciales para análisis semicuantitativo de nitritos. Entre las más usadas en análisis medioambiental, especialmente para aguas, podemos citar las varillas de Merckoquant para análisis rápidos que nos dan una información semicuantitativa por comparación óptica en un rango de 1 a 80 mg·L⁻¹ y las de RQ Flex, que son capaces de medir nitritos entre 0,02 y 3 mg·L⁻¹ usando un reflectómetro de bolsillo; ambos son de Merck. También podemos citar las tiras de Quantofix de la casa Macherey-Nagel para análisis semicuantitativo, las cuales permiten trabajar en un rango entre 1 y 3000 mg·L⁻¹ de nitrito, empleando una carta de colores.

Sin embargo, el uso más común de tiras reactivas para nitrito en análisis clínico es en el diagnóstico de infecciones en el tracto urinario causados por bacterias como *E. Coli*, *Proteus*, *Klebsiella*, *Stafilococcus* o *Enterococcus*, las cuales son capaces de reducir enzimáticamente nitratos a nitritos. Las más comunes son las tiras multirreactivo, las cuales contienen adheridas a una tira de plástico una serie de pequeños cuadrados de un material poroso que están impregnadas en los reactivos necesarios, y son capaces de responder hasta a diez analitos diferentes cuando se humedecen con orina.¹⁰

En este Capítulo se expone el diseño y caracterización de un sensor desechable óptico e irreversible, que nos permite la determinación de nitritos, en aguas de diverso tipo, de forma cualitativa y cuantitativa con la ayuda de un espectrofotómetro convencional, en un rango de concentraciones entre 2,5 y 500 µg·L⁻¹, dependiendo del tiempo de contacto. Para ello, nos hemos basado en la reacción clásica de diazotación de la sulfanilamida (SA) con nitrito en medio ácido y posterior

copulación con N-(1-naftil)etilendiamina (NED), encontrándose todos los reactivos incorporados en una membrana de Nafión.

Este sensor desechable permite la determinación de nitrito en concentraciones mayores de $1,7 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, con un bajo costo y una buena precisión (7,8 %) y, como consecuencia de su diseño, puede ser usado con equipamiento portátil para análisis de rutina. Su principal desventaja, como consecuencia del mecanismo de reacción en el que se basa, es un largo tiempo de análisis cuando se trabaja a alta sensibilidad.

El método propuesto^{11;12} es selectivo, debido a la selectividad que muestra la reacción de derivación, y es sensible, ya que el rango de aplicación de la clásica reacción es reducido considerablemente por preconcentración del producto de reacción en la matriz sólida.

El sensor desechable consiste en una pequeña lámina rectangular de poliéster que tiene una pequeña superficie circular, transparente e incolora de unos 6 mm de diámetro que se encuentra adherida sobre dicha lámina. Esta capa denominada zona activa, contiene todos los reactivos necesarios para la formación y fijación de la especie coloreada y permite una respuesta rápida y selectiva para nitrito.

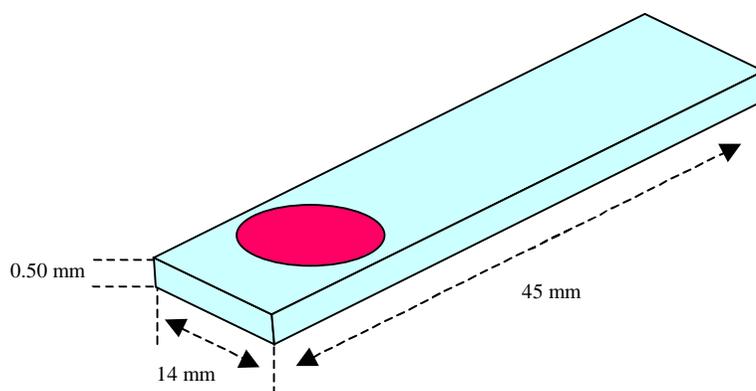


Figura 3.1. Sensor desechable para nitrito

A continuación se detallan los diferentes estudios realizados para la caracterización de este sensor desechable.

2. Experimental

2.1. Instrumentación y software

Para llevar a cabo las medidas de absorbancia se utilizó un espectrofotómetro Perkin-Elmer Lambda 2 (Norwalk, CT, USA) conectado a un ordenador IBM SX-486. La adquisición y tratamiento de los espectros fue llevada a cabo con el software PECSS suministrado por Perkin-Elmer. Las medidas de absorbancia se realizaron utilizando el soporte de la Figura 3.2. Este accesorio está construido en un bloque de hierro pintado de negro y presenta un orificio de 4 mm de diámetro que delimita la superficie del haz de luz y evita los posibles fenómenos de refracción en el borde de la zona sensora. Dicho fenómeno de refracción podría incrementar los errores en la medida de la señal analítica.

Para el tratamiento estadístico de datos se empleó el software: Statgraphics Versión 6.0, STSC. ,Manugistics and Statistical Graphics Corp., USA, 1992.

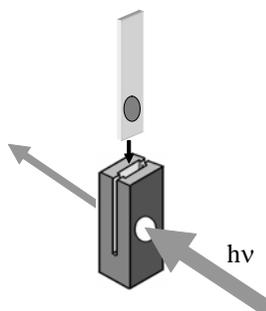


Figura 3.2. Soporte utilizado para medir la absorbancia del sensor desechable.

2.2. Reactivos y materiales

La disolución madre de nitrito ($10,0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) se preparó en agua a partir de nitrito sódico (Merck, Darmstadt, Alemania) secado a 105°C . La disolución que se conservó en botella ámbar y refrigerada, fue periódicamente contrastada por valoración con disolución patrón de permanganato potásico. Disoluciones de menor concentración se prepararon por dilución adecuada con agua. Otros reactivos y materiales usados fueron: láminas de poliéster tipo Mylar (Goodfellow, Cambridge, UK), disolución de Nafión al 5% p/p en mezcla de alcoholes alifáticos, sulfanilamida, clorhidrato de N-(1-naftil)etilendiamina; todos ellos fueron suministrados por Sigma-Aldrich (Madrid, España). También se utilizaron disoluciones patrón de los iones: Na(I), K(I), Mg(II), Ca(II), Zn(II), Al(III), Pb(II), Cd(II), Hg(II), Fe(III), Ni(II), Co(II), Mn(II), Cr(III) y Cu(II), todos ellos como nitratos; CrO_4^{2-} , SO_4^{2-} , CO_3^{2-} , PO_4^{3-} , ClO^- , y Cl^- como sales sódicas y NO_3^- como sal potásica que en todos los casos fue suministrada por Merck. Todos los reactivos utilizados fueron de grado analítico y el agua utilizada procedía de un equipo de ósmosis inversa (Milli-Ro 12 acoplado a un equipo Milli Q de Millipore Co. (Bedford, MA, USA).

2.3. Preparación de las membranas sensoras

Para preparar la membrana sensora se pesó en un vial de vidrio con tapón de unos 3 mL de capacidad, 7,0 mg de sulfanilamida y 0,7 mg de N-(1-naftil)etilendiamina, se añadieron 0,6 mL de Nafión y se agitó vigorosamente la mezcla hasta conseguir que fuera completamente homogénea. Esta disolución es la que denominamos cóctel.

Con este cóctel se prepararon las membranas utilizando un sistema centrífugo de fabricación propia basado en el descrito por Seiler y Simon¹³. El diseño y partes fundamentales de este dispositivo se pueden ver en la Figura 3.3. El sistema consta de un motor que hace girar un plato que tiene una muesca superficial de las mismas dimensiones de la lámina de poliéster con el propósito de que ésta encaje perfectamente en ella. La velocidad de giro se puede ajustar mediante un sistema digital que permite seleccionar la velocidad de giro del plato. El conjunto va cerrado con una tapa metálica superior que presenta un orificio en el cual encaja una pieza cilíndrica de teflón expresamente realizada de forma que una vez cerrada dicha tapa, la pieza queda a una altura y posición adecuada, para que con ayuda de una micropipeta se pueda depositar un cierto volumen de cóctel sobre la

lámina de poliéster que se encuentra girando a una velocidad establecida. De esta forma, el cóctel se extenderá de forma homogénea sobre la lámina de poliéster debido a la acción de la fuerza centrífuga. Después de un tiempo dado de giro del plato, se deja reposar la lámina en el mismo sistema cerrado o bien en un recinto externo, durante un tiempo suficiente para que se evapore el disolvente. Una vez evaporado el disolvente, el sensor desechable resultante posee una zona circular homogénea, denominada zona activa del sensor, donde se encuentran los componentes necesarios para reconocer al analito y sobre la que se realizará la media del parámetro analítico.

En este caso concreto, el sistema centrífugo de preparación de membranas operó a una velocidad de rotación de 300 rpm y se depositaron 30 μ L de cóctel sobre una lámina rectangular de poliéster de dimensiones 50 mm x 14 mm x 0,5 mm, que hace de soporte. Después de 30 segundos, que es cuando el cóctel se ha distribuido homogéneamente sobre la lámina de poliéster, se detiene la rotación y se deja la membrana al aire en un lugar oscuro durante 20 minutos donde la evaporación lenta de la mezcla de alcoholes alifáticos que disuelven el Nafión dará lugar a la formación de una membrana sensora homogénea.

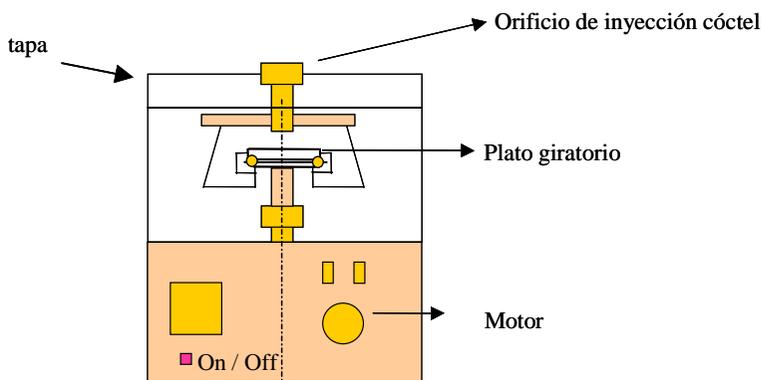


Figura 3.3. Sistema centrífugo de preparación de membranas

Las características físicas de la zona sensora obtenida para el sensor de nitritos fueron: membrana circular sólida y homogénea de 6 mm de diámetro, transparente e incolora, que está

firmemente adherida al soporte sólido. El espesor de esa capa sensora se calculó en $0,2 \mu\text{m}$ aproximadamente. Este espesor se estimó por cálculo considerando la membrana como un cilindro del que conocemos su diámetro, el volumen de cóctel añadido y la densidad que se asimila a la del constituyente mayoritario, el Nafión.

2.4. Medida de la absorbancia.

Las medidas de absorbancia se obtuvieron a partir de un sensor desechable que previamente ha estado en contacto con la muestra problema y de una tira de Mylar de las mismas dimensiones que hace de blanco. Ambas tiras fueron depositadas en dos soportes como los descritos en el apartado 2.1. Esta forma de medir hace que aumente la reproducibilidad, ya que la medida es llevada a cabo en una zona de diámetro constante, 4 mm, el cual es inferior al diámetro de la zona activa del sensor desechable. Así, evitamos la variabilidad en el tamaño de la zona entre una membrana y otra. Las medidas de absorbancia se llevaron a cabo a 536 nm.

2.5. Procedimiento para muestras y patrones.

Se coloca una alícuota de 25 mL de una disolución de patrón o problema conteniendo entre 8,9 y $500 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, 4,7 y $200 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ o 2,6 y $100 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ de nitrito, dependiendo del rango en el que queramos hacer la medida, en un vaso de 30 mL y se le añaden 0,5 mL de disolución de HCl 2 M. A continuación, se introduce en la disolución el sensor desechable, sujeto a un soporte, y se agita la disolución magnéticamente (Figura 3.4) a 300 rpm durante un tiempo que oscila entre 45 y 90 minutos, dependiendo del rango de concentraciones que se desee ensayar, todo esto a temperatura ambiente. A continuación, se saca el sensor de la disolución y se sacude para eliminar las gotas de disolución que lo puedan mojar, tras lo cual se mide la absorbancia en la forma anteriormente descrita. Todas las medidas se realizan a temperatura ambiente. En ningún caso se acondicionan las membranas antes de su uso.

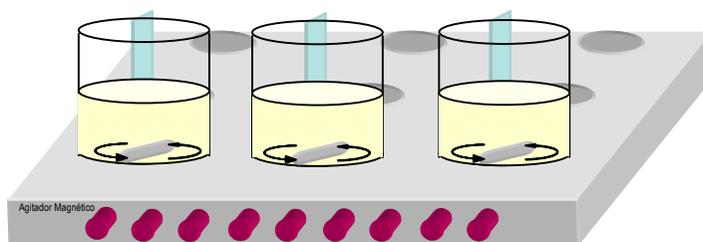


Figura 3.4. Sistema de agitación magnética.

3. Resultados y discusión

Condiciones experimentales

Para optimizar el desarrollo de color en el sensor desechable, se han estudiado los factores que afectan a la composición de la membrana (naturaleza y composición de los componentes de la mezcla, volumen y condiciones usadas para la preparación de la membrana) y los factores que afectan a la reacción con nitrito y fijación de los productos de reacción en la membrana sensora (pH, fuerza iónica, temperatura y tiempo de contacto).

3.1. Composición de la membrana

Como soporte de la membrana sensora se seleccionaron láminas de poliéster de politereftalato tipo Mylar, debido a que son transparentes en la región del visible y son inertes frente a los reactivos químicos empleados. Como reacción para la determinación de nitrito se utiliza la conocida reacción de formación de colorantes azoicos (reacción de Griess) basada en la diazotación de aminas aromáticas por parte del nitrito en medio ácido y acoplamiento o copulación posterior con aminas o fenoles. Se seleccionó esta reacción debido a su alta reactividad, sensibilidad y selectividad para esta especie. Los reactivos que forman la capa sensora son un compuesto diazotante o nitrosante, un reactivo

copulante y un soporte sólido polimérico que incorpora los reactivos y retiene al colorante azoico cuando se forme.

Como reactivos diazotante y copulante se seleccionaron sulfanilamida (SA) y N-1-(naftil)etilendiamina (NED), respectivamente. Otros reactivos, tales como ácido sulfanílico, p-nitroanilina, ácido p-aminobenzoico, 1-naftilamina o el 1-naftol, conducen a peores resultados en términos de velocidad de reacción en la membrana, solubilidad en la membrana y toxicidad.

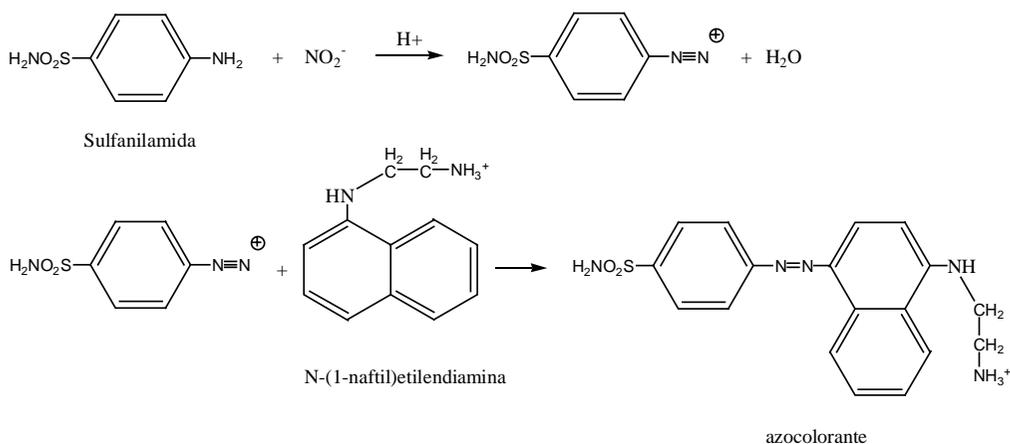


Figura 3.5. Esquema de las reacciones en las que se basa el sensor para el reconocimiento de nitrato.

El colorante azoico que se forma en el medio ácido de reacción está cargado positivamente y por tanto puede ser retenido fuertemente por resinas de cambio catiónico (p.e. Dowex 50W-X2-H⁺) como se ha demostrado previamente¹⁴. Por lo tanto, para ser retenido en la membrana sensora es necesaria la presencia de grupos cargados negativamente que doten a la membrana de propiedades de cambio iónico y permitan retener al colorante azoico por interacciones electrostáticas. Esta carga negativa puede ser introducida en la membrana como una especie aniónica lipofílica formando un par iónico con el indicador o bien como un polímero cargado negativamente que actúa como polímero formador de membrana. La primera alternativa no dio buenos resultados, ya que las membranas de PVC preparadas con diferentes plastificantes y sales de anión lipofílico como son las derivadas de tetrafenilborato, fueron propensas a la lixiviación de componentes a la disolución problema, lo cual

resulta en una baja reproducibilidad. Este problema se solucionó empleando membranas de Nafión¹⁵, que es un copolímero de tetrafluoroetileno sulfonado, descubierto en la década de los 1960 por Walther Grot de DuPont de Nemours y considerado el primer tipo de polímeros sintéticos con propiedades iónicas (ionómeros). Este polímero forma una membrana iónica que es capaz de retener especies catiónicas del colorante azoico por cambio iónico con los grupos sulfónicos del Nafión. El Nafión se suministra comercialmente disuelto en una mezcla de alcoholes alifáticos, lo que permite la solubilización de los componentes de la zona sensora y su evaporación posterior para formar la zona sensora sólida.

Para optimizar las proporciones de los componentes de la membrana (SA, NED y Nafión) se prepararon varios sensores utilizando un volumen constante de Nafión de 0,6 mL, cantidad que nos permite llegar a una situación de compromiso entre la mínima cantidad necesaria para poder disolver en ella diferentes proporciones de los reactivos y la máxima cantidad posible que no encarezca el sensor desechable. Se utiliza una cantidad constante de uno de los dos reactivos utilizados en este cóctel, variándose la cantidad del otro constituyente. Se sigue este modelo de optimización univariante debido a que el empleo de optimización multivariante nos llevó a resultados erróneos, ya que aunque se producía aumento de señal en determinadas ocasiones, este iba acompañado de un empeoramiento de las propiedades físicas de la membrana, tales como pérdida de homogeneidad, de transparencia, aumento de fragilidad, etc. Para evitar llegar a estas situaciones cuando se planteaba un diseño de experimentos, se optó por la optimización univariante. Las diferentes mezclas preparadas contenían cantidades de SA y NED entre 0,5 y 10,0 mg y entre 0,1 y 1,5 mg, respectivamente.

Se encontró que para cantidades de NED mayores a 1,0 mg y/o cantidades de SA mayores a 10 mg se obtenían sensores desechables cuya zona activa era opaca y quebradiza, por lo cual no era posible su utilización. Las Figuras 3.6 y 3.7 muestran la respuesta de diferentes sensores frente a 0,1 mg L⁻¹ de nitrito; estos resultados indican que 0,7 mg de NED y 7 mg de SA son las cantidades apropiadas para la preparación del sensor desechable.

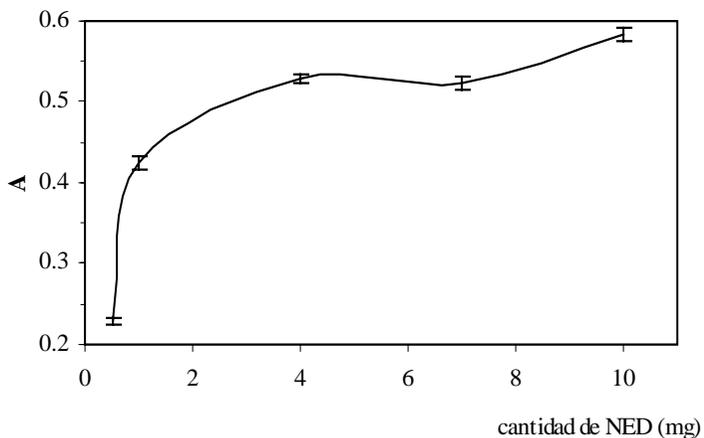


Figura 3.6. Optimización de la cantidad de NED en la membrana.

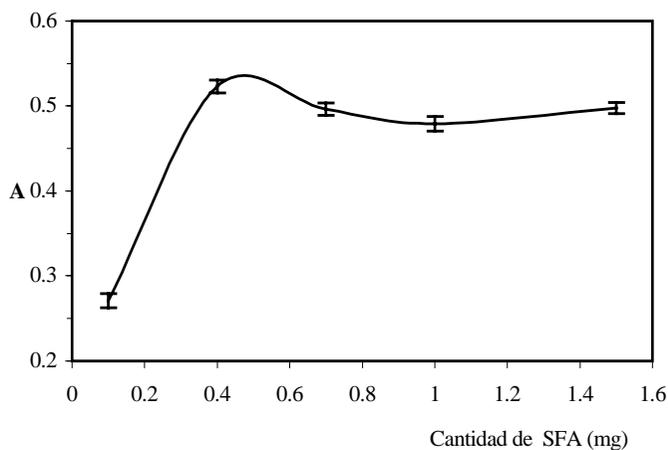


Figura 3.7. Optimización de la cantidad de SA en la membrana

Otras condiciones relacionadas con la preparación de la membrana que pueden influir en su respuesta son el volumen de la mezcla depositada sobre el soporte y el tiempo de secado. Empleando la composición optimizada, se prepararon un conjunto de membranas empleando volúmenes de cóctel comprendidos entre 5 y 40 μL . En este rango, se observó que la señal analítica aumentaba debido al incremento en el diámetro de la zona sensora. Dado que el tamaño de la zona sensora viene limitado por la anchura de la lámina soporte, se seleccionó como óptimo un volumen de 30 μL del cóctel, ya

que volúmenes mayores alcanzan los bordes de la tira de poliéster y el espesor de la zona sensora no es uniforme. Cuando se emplea este volumen de cóctel, el diámetro de la membrana circular que se forma es ligeramente menor que el ancho de la tira de poliéster y mayor que el ancho del haz de radiación del espectrofotómetro.

También se han estudiado los efectos de las condiciones de secado y el tiempo de secado. Se probaron dos condiciones de secado, que fueron a presión atmosférica y bajo condiciones de vacío, ambas en ausencia de luz. El secado al aire a presión atmosférica resultó ser el que originaba membranas de mejores características; así 20 minutos fueron suficientes para un completo secado del sensor desechable.

3.2. Condiciones de reacción

Como consecuencia de la reacción con nitrito, el sensor desechable que en un principio es incoloro, desarrolla un color violáceo cuyo máximo de absorbancia está a 536 nm. Este valor es muy similar al que se obtiene en agua (540nm) o en fase resina (550nm) para el mismo colorante azoico¹⁴.

Los factores experimentales que afectan a la reacción de nitritos y fijación del indicador son el pH, la fuerza iónica y el tiempo de reacción.

Como es sabido, las especies nitrosantes (H_2NO_2^+ , NOX, N_2O_3) se forman a partir del ácido nitroso, por lo que el pH del sistema debe estar por debajo del valor del pKa de este ácido (3,6) para asegurar una completa protonación del nitrito¹⁶. Para comprobar la influencia del pH sobre la respuesta de la membrana, se emplearon varios sensores desechables en disoluciones acuosas que contenían $100 \mu\text{g L}^{-1}$ de nitrito a diferentes valores de pH, comprendidos entre 1 y 7. El pH fue ajustado con ácido clorhídrico e hidróxido sódico. Como se puede ver en la Figura 3.8 la respuesta máxima se consigue para un pH de $2,0 \pm 0,5$.

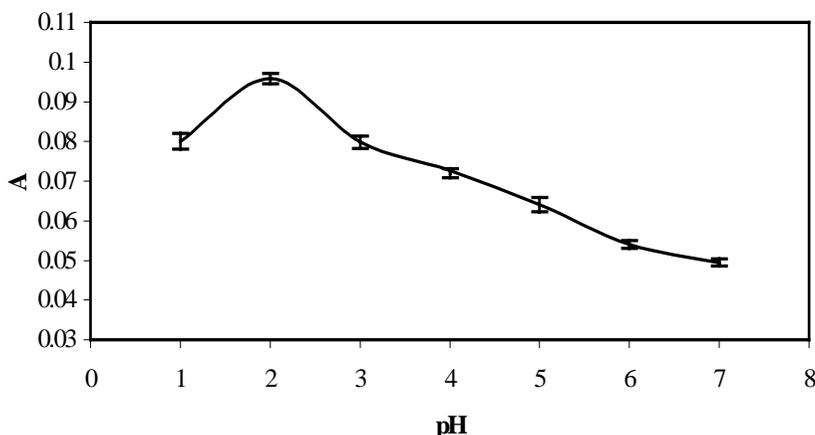


Figura 3.8. Efecto del pH en la señal del sensor desechable para una concentración de nitrito de $0,1 \text{ mg L}^{-1}$

También se ha intentado el evitar tener que añadir ácido a la disolución problema, incluyendo a este en la membrana, como se hace en tiras reactivas para determinar nitrito en orina para el diagnóstico de infección bacteriana ¹⁷⁻¹⁹o en diagnósticos para distinguir alergias de infecciones ²⁰.

Se probaron los siguientes ácidos hidroxycarboxílicos, ácidos mono, di y tricarboxílicos en un porcentaje aproximado del 10%: cítrico, oxálico, tartárico, málico, malónico, succínico, glutárico, adipico, benzoico y tricloracético y también ácido p-toluensulfónico e hidrógeno sulfato de potasio. Pese a que los ácidos tartárico, cítrico y oxálico dieron los mejores resultados, en general las propiedades ópticas y mecánicas de la membrana sensora se deterioran, volviéndose opaca y quebradiza, y necesitándose un mayor tiempo de contacto entre el sensor desechable y la disolución que cuando el ácido se encuentra en la disolución. Por otra parte, se pueden utilizar membranas de Nafión conteniendo solo los reactivos, debido a la acidez que se origina debido a los protones presentes en los grupos sulfónicos del Nafión.

Dado que este sensor desechable se pretende utilizarlo para determinar nitrito en aguas naturales, no es buena alternativa el emplear el ácido introducido dentro de la membrana ya que el nivel de nitrito puede estar por debajo de $10 \mu\text{g L}^{-1}$ y el uso del ácido dentro de la membrana conduce a una menor sensibilidad del procedimiento. Por ello, es necesario que el sensor desechable esté en contacto con un volumen de la disolución para que así se produzca una preconcentración del

colorante azoico. Este método es diferente del empleado con tiras reactivas para uso clínico, las cuales son humedecidas con la muestra, o bien se añade sobre la zona sensora una pequeña cantidad de muestra. Por todo ello se decidió añadir el ácido a la disolución problema donde se va a introducir el sensor desechable.

Para ajustar el pH se estudiaron diferentes ácidos y tampones. Pero aunque ha sido observado que los ácidos minerales dan peores resultados que otros como el ácido acético¹⁶, hemos encontrado en este estudio que el pH óptimo es ligeramente inferior que el pH usual empleado para este método en disolución, pH 2,5-3,0, y se comprobó que el HCl originaba buenos resultados y presentaba una capacidad reguladora adecuada.

La influencia de la fuerza iónica se ha estudiado a dos niveles de concentración de nitrito, a 0,5 mg ·L⁻¹ y a 3,0 mg ·L⁻¹, mediante la adición de cantidades crecientes de NaCl. Se ha comprobado que el efecto de la fuerza iónica sobre la respuesta de la señal de la membrana es muy pequeño para valores de fuerza iónica superiores 0,5 M cuando la concentración de nitrito es de 0,5 mg ·L⁻¹, mientras que para concentraciones de nitrito de 3,0 mg ·L⁻¹ el efecto de la fuerza iónica sobre la señal es menor, comenzando a apreciarse una disminución solo a valores superiores a 2,5 M de NaCl.

Para ambas concentraciones de nitrito, la presencia de concentraciones mayores de NaCl conlleva una lixiviación del colorante azoico hacia la disolución, que posiblemente sea debido a la existencia de una competencia por los grupos negativos del Nafión entre los iones Na⁺ y el azocompuesto protonado. A bajas concentraciones de nitrito, no se observa este fenómeno de lixiviación.

Aunque se ha observado que incrementando la temperatura se incrementa la velocidad de respuesta del ensayo, se eligió el trabajar a temperatura constante para simplificar el procedimiento operatorio.

Se ha comprobado que, al igual que nos ocurrió con un sensor de este tipo para la determinación de hierro en disolución⁷, el tiempo de equilibrio óptimo entre el sensor y la disolución de la muestra depende de la concentración de analito. Así el tiempo necesario para obtener un valor constante de

absorbancia, disminuye cuando aumenta la concentración de analito en la disolución. Por tanto, se puede decir que no hay una única relación entre absorbancia y concentración, sino diferentes en función de los diferentes tiempos de equilibración utilizados. Esto es habitual en este tipo de sensores desechables, que podemos llamar de preconcentración, pues conforme se aumenta el tiempo de contacto se produce un mayor desplazamiento del equilibrio hacia la formación de producto de reacción y su retención en la membrana, debido a la alta variación negativa de energía libre que involucra.

Para demostrar este hecho se estudió la variación de la señal debida a nitrito en el sensor desechable con el tiempo, al introducir este en disoluciones de concentración creciente de nitrito en el rango de concentraciones de 0,1 a 3,0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Para realizar este experimento, se colocó el sensor desechable en una cara de una cubeta de 10 mm de paso óptico, añadiéndose 5 mL de la disolución de nitrito de la concentración que corresponda en cada experiencia.

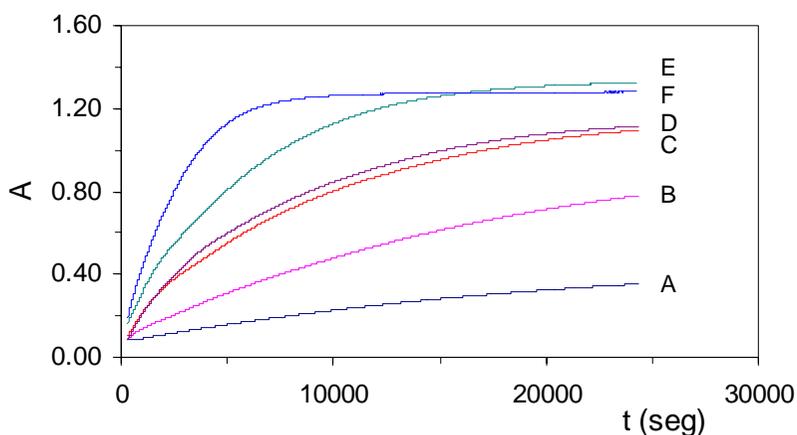


Figura 3.9. Influencia del tiempo de contacto sobre la respuesta del sensor para diferentes concentraciones de nitrito: A) 0,1 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$; B) 0,5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$; C) 1,0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$; D) 1,5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$; E) 2,0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$; F) 3,0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$.

Como puede observarse en la Figura 3.9, la velocidad de la reacción se incrementa a medida que la concentración de nitrito es mayor, hasta una concentración de nitrito de 2,0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ aproximadamente. También se observa que la señal permanece constante cuando se alcanza el

equilibrio. Todo ello es debido a que se ocupan todas las posiciones iónicas en la membrana, valor que coincide aproximadamente con la capacidad cambiadora del Nafión ($0,85 \text{ meq}\cdot\text{g}^{-1}$)²¹. En consecuencia, un aumento en el tiempo de reacción permitiría la determinación de bajas concentraciones de nitrito.

Para aumentar la velocidad del método de análisis es necesario agitar la disolución después de la inserción del sensor desechable, ya que de esta forma se facilita el transporte de los iones nitrito desde la disolución hasta la superficie de la membrana. Se ensayaron diferentes formas de agitación, (agitación magnética, rotación y agitador vibratorio); de ellas la que producía unos mejores resultados, en términos de mayor reproducibilidad y coloración homogénea, fue la agitación magnética a 300 rpm y durante un tiempo que depende del nivel de concentración de nitrito de la muestra.

3.3. Parámetros analíticos

Debido a la influencia del tiempo de equilibración sobre la respuesta del sensor, se establecieron funciones de calibrado a diferentes tiempos de contacto del sensor con la muestra (45, 60 y 90 minutos), preparando para ello varias disoluciones patrón de nitrito de concentraciones comprendidas entre $0,001$ y $500,0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Cada curva de calibrado se obtuvo con 8 patrones y tres réplicas de cada patrón.

El test de fallo de ajuste (*lack-of-fit test*) se empleó para determinar la linealidad de estas curvas analíticas como se recomienda por el Analytical Method Committee²² y también para establecer el límite superior del rango lineal. La precisión, expresada como desviación estándar relativa (DER), se obtuvo a partir del análisis de diez patrones de nitrito de concentración $0,1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ y tres réplicas de cada uno. El límite de detección y cuantificación según la IUPAC²³⁻²⁵ se determinaron a partir de diez blancos.

Se aprecia que el límite de detección disminuye conforme aumenta el tiempo de contacto del sensor con la disolución. En la Tabla 3.1 se muestran los diferentes parámetros analíticos del

procedimiento propuesto. La repetibilidad, incluida la reproducibilidad de la construcción de las membranas, es aproximadamente del 8%.

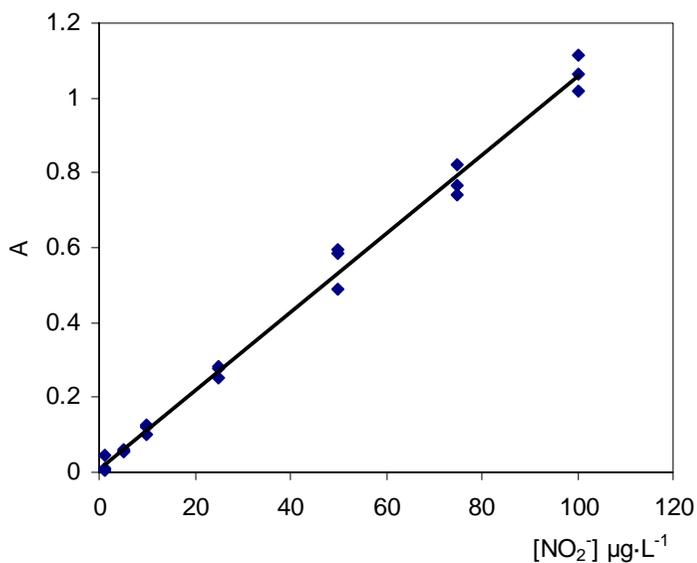


Figura 3.10. Curva de calibrado para el método de 90 minutos.

Tabla 3.1. Parámetros analíticos del sensor desechable de nitrato

MÉTODO:	45 MIN	60 MIN	90 MIN
PARÁMETRO			
Ordenada en origen	0,0093	0,0141	0,0098
Pendiente ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	0,0034	0,0055	0,0105
Lack of fit. (P-value)	0,641	0,397	0,677
Rango Linear ($\mu\text{g L}^{-1}$)	8,9-500	4,7-200	2,6-100
LD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	2,7	1,4	0,8
LQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	8,9	4,7	2,6
DER (%)	6,9	8,8	7,8

3.4. Selectividad

Con el fin de comprobar el efecto producido por otras especies químicas, que se puedan encontrarse de manera habitual en las muestras de agua, se ha realizado un estudio sistemático de los efectos producidos en la determinación de muestras que contienen $0,1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de nitrito. Para realizar este estudio se han ensayado los posibles interferentes a diferentes concentraciones de tal modo que si se observa interferencia, la concentración del interferente se reduce hasta que origine un error inferior al 8% en la determinación del analito. La máxima concentración de interferente que origina un error del 8% se toma como nivel de tolerancia.

De esta manera, se han encontrado tolerancias para NO_3^- , SO_4^{2-} , CO_3^{2-} , HCO_3^- , Cl^- , PO_4^{3-} , Ca (II), Mg (II), Na (I), K (I), Pb (II), Zn (II), Cd (II), Hg (II), Cu (II), Ni (II), Co (II), Mn (II), Al (III), Cr (III) y (VI), y Fe (III) mayores de $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, que es la máxima cantidad ensayada. La única interferencia que se presentó fue para hipoclorito y cromato, con una tolerancia para ambos iones de $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, pues estos oxidan a las aminas presentes en la membrana.

3.5. Aplicaciones analíticas

Se ha aplicado el método a muestras reales de agua de diferente procedencia (fuente, grifo, agua mineral, pozo y mar). Dado que ninguna muestra contenía nitrito, se les añadió a todas ellas una cantidad de este de $50 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. En muchas muestras el contenido en nitrito se ha determinado directamente, mientras que en otras, como es el caso del agua de grifo, fue necesario previamente eliminar el hipoclorito presente mediante la adición de 2 g de carbón activo por litro de agua, agitando durante 30 minutos y filtrando posteriormente.

Para la validación del método hemos utilizado el método de calibrado por adición de patrón^{26,27}. Esta metodología implica la realización de tres calibrados: 1) calibrado con patrones (CS); 2) calibrado con adición de patrón (CA); 3) calibrado de Youden (CY). Este último consiste en obtener la recta de regresión utilizando volúmenes crecientes de muestra diluidos todos ellos hasta un mismo volumen final y representar gráficamente la señal obtenida en función del cociente $V_{\text{añadido}}/V_{\text{final}}$.

Aplicando el protocolo estadístico del análisis de regresión lineal, se calculan las desviaciones estándar de las regresiones, los términos independientes (a_s , a_A y a_Y), y las pendientes (b_s , b_A y b_Y) de los tres calibrados y, suponiendo que no existen interacciones analito-matriz que produzcan errores sistemáticos proporcionales y que se elimina la contribución de la matriz a la respuesta analítica, se procede como sigue:

1. Se comparan las varianzas de regresión de los calibrados CS y CA y se calcula la varianza promedio.
2. Se comparan las pendientes de los calibrados CS y CA y se calcula la pendiente promedio.
3. Se corrigen las ordenadas en el origen de los calibrados CS y CA y se estima el blanco de la matriz a partir del calibrado CY.
4. Se estima el contenido en analito en la muestra mediante los calibrados CS y CA y se comparan ambos contenidos.

Si ambos contenidos son iguales, el error sistemático constante ha sido corregido mediante el blanco de Youden y se puede utilizar el calibrado CS para la determinación de analito en esa muestra.

La pendiente, ordenada en origen, y la desviación estándar de la regresión para cada curva fue calculada empleando un análisis por regresión lineal. Se encontró que el método propuesto es válido bajo las condiciones siguientes: 1) homogeneidad de las varianzas para todas las curvas de calibrado; 2) similares pendientes y 3) que el valor de la ordenada en origen obtenida por la curva de YC está incluida en el valor del intervalo de confianza para la curva SC. Bajo estas condiciones la veracidad del método se confirma al comparar el contenido de analito determinado por las diferentes funciones de calibrado. Dado que se comprobó que los resultados por ambos métodos fueron similares, el método es veraz, aceptándose la hipótesis nula para un nivel de significación del 95%.

La Tabla 3.2 muestra los resultados obtenidos del estudio de validación. No se encontró diferencia significativa entre las pendientes del calibrado AC y el SC, y en todos los casos t_{cal} fue $< t_{tab.}$, para un valor de α del 0,05 y 16 grados de libertad.

Tabla 3.2. Determinación de nitrito en diferentes muestras de agua (se añadió 50 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de nitrito a todas las muestras)

Muestras de agua	Concentración obtenida del calibrado SC ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	Concentración obtenida del calibrado AC ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	P-value (%)	$\bar{C} \pm s_{n-1}$
Fuente (Granada)	15,04	18,93	34,65	53,12 \pm 0,006
Mar (Almería)	21,76	21,56	93,91	57,11 \pm 0,017
Mineral (Benzoya)	14,75	15,98	65,10	53,38 \pm 0,036
Mineral (Lanjaron)	21,29	26,07	15,60	50,46 \pm 0,008
Grifo (Granada)	16,81	19,46	33,62	50,89 \pm 0,023
Grifo (Illora, Granada)	15,02	16,67	54,21	48,51 \pm 0,019
Pozo (Illora, Granada)	18,89	20,50	54,28	50,36 \pm 0,017

Los datos son el promedio de 3 calibrados independientes: SC calibrado estándar; AC adición estándar y YC (P-value). $\hat{C} \pm s_{n-1}$: concentración media para 3 \pm desviación estándar.

4. Conclusiones

Se ha diseñado un sensor desechable para nitrito basado en medidas de transmisión que ofrece buena repetibilidad y bajo costo. El sensor desechable propuesto permite la determinación de nitrito en aguas después de la adición de ácido clorhídrico diluido como único pretratamiento de la muestra. Los resultados obtenidos indican una buena exactitud y precisión. Dado su bajo costo, el sensor desechable puede emplearse para análisis de rutina con equipamiento portátil. También podría usarse para la determinación semicuantitativa de nitrito empleando una carta de colores.

Las desventajas de este sensor desechable son su relativamente largo tiempo de respuesta (60 minutos) cuando la concentración de nitrito es muy baja, y su tiempo de vida limitado, un mes bajo condiciones óptimas, aunque este puede ser incrementado por el empleo de procedimientos apropiados de preservación (ausencia de luz, atmósfera inerte, y/o bajas temperaturas).

5. Bibliografía

1. *Off.J.Eur.Comm.* 1980, No. L 229, 15, julio1980.
2. R.D. 1138/1990; BOE 226, 27488-27497, 20-9-1990.
3. Unger-Heumann, M. *Fresenius J.Anal.Chem.* 1996, 354, 803-06.
4. Zolotov, Yu. *Ann.Chim.* 1997, 87, 285-95.
5. Hildenbrand, K., Von Döhren, H. H., Perrey, H., Frank, G.; Dhein, R. (1989) Patente US 4,824,639
6. Oehme, I.; Wolfbeis, O. S. *Mikrochim.Acta* 1997, 126, 177-92.
7. Capitán-Vallvey, L. F.; Arroyo, E.; Berenguer, C.; Fernández-Ramos, M. D.; Avidad-Castañeda, R. *Fresenius J.Anal.Chem.* 2001, 369, 144.
8. Capitán-Vallvey, L. F.; Alvarez de Cienfuegos, P.; Fernández-Ramos, M. D.; Avidad-Castañeda, R. *Sens.Actuators B* 2000, 71, 140-46.
9. Capitán-Vallvey, L. F.; Al-Barbarawi, O. M. A.; Fernández-Ramos, M. D.; Avidad-Castañeda, R.; Ramirez Gonzalez, V. *Analyst* 2000, 125, 2000-05.
10. Guardiola Vicente, J. M. *La orina y su analisis*, Quimica Farmaceutica Bayer, Ed.; Madrid, 1995.
11. Capitán-Vallvey, L. F., Fernández-Ramos, M. D.; Arroyo, E. (2005) Patente ES P 200500199
12. Capitán-Vallvey, L. F.; Ariza-Avidad, A.; Fernández-Ramos, M. D.; Arroyo, E.; Avidad-Castañeda, R. *Anal.Bioanal.Chem.* 2002, 373, 289-94.

-
13. Seiler, K.; Simon, W. *Anal.Chim.Acta* **1992**, *266*, 73-87.
 14. Capitán, F.; Valencia, M. C.; Capitán-Vallvey, L. F. *Mikrochim.Acta* **1984**, *III*, 303-311.
 15. Smith, F. *Anal.Chim.Acta* **1957**, *16*, 464-72.
 16. Fox, J. B. *Crit.Rev.Anal.Chem.* **2000**, *15*, 283.
 17. Avakian, S. (10-12-1968) Patente US 3,415,717
 18. Rittersdorf, W., Ray, H. G.; Rieckmann, P. (1973) Patente US 3,712,853
 19. Takino, K., Asahi, H.; Wada, H. (1986) Patente US 4,631,255
 20. Small, P. A.; Huang, S. H. (1999) Patente US 5,910,421
 21. Aldrich. Nafion resins. [AL-163]. 12-2-1999. Aldrich.
 22. Analytical Methods Committee *Analyst* **1994**, *119*, 2363-66.
 23. Analytical Methods Committee *Analyst* **1988**, *113*, 1469.
 24. 24. Guidelines for Data Acquisition, *Anal.Chem.* **1980**, *52*, 2242.
 25. Nomenclature, symbols, units and their usage in spectrochemical analysis II, *Spectrochim.Acta B* **1978**, *33B*, 242.
 26. Cuadros Rodriguez, Luis; Garcia Campaña, A. M.; Jimenez Linares, Carlos; Roman Ceba, Manuel *Anal.Lett.* **1993**, *26*, 1243-58.

27. Bosque-Sendra, J. M.; Cuadros Rodriguez, L.; Garcia Campaña, A. M. *Recent.Res.Dev.Pure Appl.Anal.Chem.* **1988**, *1*, 115-31.

CAPITULO 3

SENSOR DESECHABLE PARA LA DETERMINACIÓN DE CLORURO EN AGUAS

SENSOR DESECHABLE PARA LA DETERMINACIÓN DE CLORURO EN AGUAS

1. Introducción

El ión cloruro es un anión cuyo análisis es muy habitual y necesario en diferentes contextos, como son aguas naturales, industriales, fluidos biológicos, etc. Por lo general, el ión cloruro en aguas es analizado en los laboratorios principalmente mediante volumetría, gravimetría, espectrofotometría, potenciometría (ISE), coulometría y cromatografía iónica. El uso de métodos rápidos (*test methods*) puede ser una alternativa en algunos casos donde puede ofrecer una reducción en el costo, tiempo de análisis, personal especializado, así como la posibilidad de ser usados en cualquier sitio donde se necesiten y de forma sencilla.

Han sido propuestos diversos sistemas de ensayo para la estimación y/o determinación rápida y simple de cloruro, principalmente en muestras de agua. Entre los sistemas de ensayo para cloruro se encuentran valoraciones, tanto visuales como instrumentales, y cromatografía radial en kits que son distribuidos por diferentes compañías como CHEMetrics, Hach, Macherey-Nagel, Merck, Lange o Kyoritsu Chemical-Check, entre otras. Diferentes dispositivos de estado sólido ha sido usados para determinar cloruro. Los más sencillos son las tiras reactivas de papeles impregnados con sales como Ag_2CrO_4 ¹ o complejos con reactivos orgánicos como es el complejo de plata de una triazina² o tubos indicadores³, donde el color o área de la tira reactiva, o la longitud de la mancha de los tubos indicadores es la propiedad observada.

Otras tiras reactivas, que se utilizan principalmente para uso clínico, incluyen membranas de PVC basadas en el empleo de ionóforos⁴ y ensayos enzimáticos multicapa⁵, los cuales miden absorción de radiación por transmisión o reflexión, respectivamente, o las membranas de poliacrilamida que contienen atenuadores de fluorescencia, como los derivados del acridinio⁶.

Entre los diferentes sistemas huésped-receptor para aniones, los ligandos organometálicos neutros han sido usados en diferentes esquemas de sensado, que se basan en la coordinación del anión a un centro ácido de tipo Lewis⁷. Así, varios compuestos orgánicos de estaño han sido usados como receptores tipo ácido Lewis para sensado de aniones, tanto en electrodos selectivos de aniones^{8,9}, como en optodos⁴. La secuencia de selectividad que se observa con este tipo de receptores se desvía de la secuencia que se observa para membranas cambiadoras de aniones, conocida como secuencia de selectividad liotrópica de Hofmeister para aniones. Esta desviación de la serie de Hofmeister se debe a que la selectividad no está gobernada por una simple lipofiliidad del anión, sino por interacciones químicas específicas entre el receptor neutro y el anión. Dependiendo de los sustituyentes orgánicos, la selectividad normalmente se desvía de la serie de Hofmeister siendo el ión cloruro altamente favorecido¹⁰. También se han propuesto otros sistemas sensores de tipo óptico para cloruro¹¹⁻¹⁵.

En este Capítulo, se expone el trabajo realizado para el desarrollo y puesta a punto de un sensor óptico desechable para la determinación de cloruro en aguas de diverso tipo que está basado en un mecanismo de coextracción e implementado en un formato de tipo sensor desechable. El sensor

desechable se basa en el uso de un ionóforo selectivo de cloruro, el cloruro de trioctil estaño, y la 4',5'-dibromofluoresceína octadecilester como cromoionóforo¹⁶. El sensor óptico desechable desarrollado para la determinación de cloruro en aguas funciona de modo reversible y ofrece suficiente selectividad y sensibilidad para su uso en aguas naturales, que es el objetivo de este estudio.

2. Experimental

2.1. Reactivos y materiales

Todos los productos químicos usados fueron de grado reactivo analítico. El agua empleada en todo momento fue de tipo ósmosis inversa (Milli-Ro 12 acoplado a un equipo Milli Q de Millipore Co. (Bedford, MA, USA). Las disoluciones patrón de cloruro (1,000 M) se prepararon en agua por pesada exacta de cloruro potásico anhidro (Sigma-Aldrich Química S.A., Madrid, España). También se emplearon disoluciones patrón de los siguientes iones: Br⁻, I⁻, y NO₃⁻ como sales potásicas y SO₄²⁻, como sal sódica, todos suministrados por Merck (Darmstadt, Alemania).

Para preparar las membranas sensoras se ha utilizado PVC de alto peso molecular, tributil fosfato (TBP), 2-notrofeniloxiléter (NPOE), bis(2-etilhexil)sebacato (DOS), dioctilftalato (DOP), tris(2-etilhexil)fosfato (TEHP) y tetrahidrofurano (THF), todos ellos proporcionados por Sigma (Sigma-Aldrich Química S. A., Madrid) y cloruro de trioctilestaño (TOT) suministrado por Fluka (Fluka, Madrid, España). El cromoionóforo dibromofluoresceína octadecil ester (BFE) fue sintetizado por nosotros de acuerdo con descrito por Tan¹⁶ y su síntesis se describe en el Anexo 1. Como soporte se emplearon láminas de poliéster tipo Mylar (Goodfellow, Cambridge, UK).

2.2. Instrumentación y software

Para realizar las medidas de absorbancia se utilizó un espectrofotómetro Hewlett-Packard HP-8453 de diodos en fila (Nortwalk, CT, USA) conectado a un ordenador personal Pentium MMX 200 a

través de una interface y un cable HP IB para adquisición de espectros y posterior tratamiento de los datos. La recogida y tratamiento de los espectros UV-Vis fue llevada a cabo utilizando el software UV HP ChemStation Software proporcionado por HP. Las medidas de absorbancia se realizaron utilizando el soporte¹⁷ anteriormente descrito en el Capítulo anterior, el cual tiene un orificio circular de 4 mm de diámetro que delimita la superficie del haz de luz y previene posibles fenómenos de refracción que se producen en el borde de la zona sensora. Estos fenómenos de refracción podrían incrementar los errores en la medida de la señal analítica. Las medidas de absorbancia se realizaron frente a una lámina de poliéster tipo Mylar de las mismas dimensiones que el sensor desechable.

Otros aparatos y material de laboratorio utilizados fueron: un sistema rotatorio de velocidad de giro variable para la preparación de las membranas¹⁸, ya descrito en el Capítulo anterior, un pH-metro digital provisto de electrodo combinado de vidrio y cloruro de plata (Crison Instruments, Barcelona, España) y, entre otros, un agitador de tubos Vibromatic (Selecta, Barcelona, España). Los programas utilizados para el tratamiento de datos fueron: Statgraphics Plus Versión 6.0 (Manugistics Inc. y Statistical Graphics Corporation, version 6, USA, 1992) y GraphMatica para Win32 v1.60d, (1998 editado por K. Hertzler y adaptado por J. Garrido).

2.3. Preparación de la membrana

Para la preparación de la zona sensora para cloruro se utiliza una mezcla que contiene 40,00 mg (37,8 % p/p) de PVC, 63,50 mg (60 % p/p) de tributilfosfato, 1,33 mg (1,26 % p/p) del ionóforo TOT, y 1,00 mg (0,94 % p/p) de cromoionóforo BFE en un vial de vidrio y que se disuelven en 0,75 mL de tetrahidrofurano recién destilado. Se depositan 20 μ L de ese cóctel sobre una lámina de poliéster de 14 mm \times 45 mm \times 0,25 mm de espesor, con ayuda del sistema centrífugo de preparación de membranas. A continuación, se introduce la tira en un desecador de vacío durante 10 minutos, para lograr una evaporación lenta del disolvente. La membrana así preparada consiste en una película circular sólida, homogénea, de 6 mm de diámetro y 9,5 μ m de espesor, transparente, de color anaranjado y bien adherida al soporte sólido. La concentración de ionóforo y cromoionóforo en el sensor una vez seco es de 25,4 mmol \cdot kg⁻¹ y 12,7 mmol \cdot kg⁻¹, respectivamente. Las características

físicas y dimensiones finales del sensor utilizando los componentes seleccionados fueron las reflejadas en la Figura 4.1.

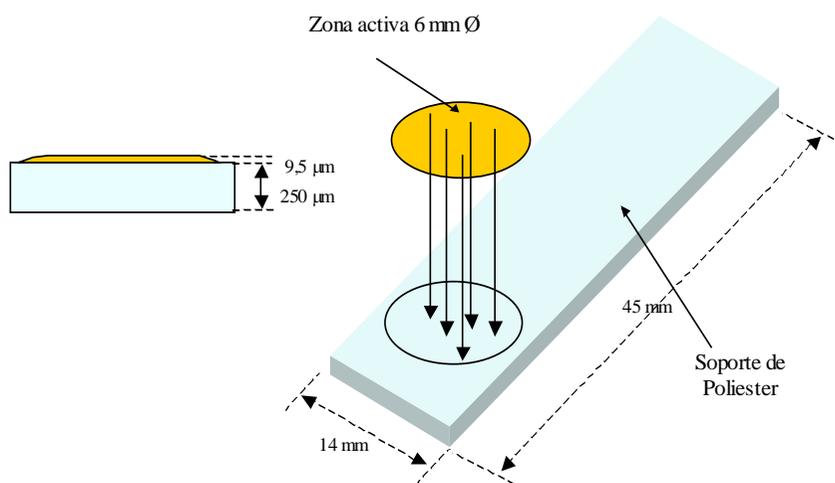


Figura 4.1. Esquema y dimensiones del sensor para cloruro.

2.4. Procedimiento experimental

Se toma una alícuota de una disolución patrón conteniendo cloruro en actividades comprendidas entre 0,15 y 24,7 mM (0,18 y 31,6 mM en concentraciones) y se coloca en un matraz de 50 mL junto con 1,0 mL de una disolución reguladora 1M de ácido ortofosfórico/ sodio dihidrogenofosfato de pH 2,0, enrasando con agua. Se toman 10,0 mL de la anterior disolución que se introducen en un tubo de polietileno de 10x1,5 cm junto con el sensor desechable para cloruro durante 6 minutos sin agitación. A continuación, la membrana se saca de la disolución y se sacude para eliminar las gotas de disolución que la puedan mojar; tras lo cual se mide la absorbancia a 534 nm. Antes de ser usado, se introduce el sensor desechable en una disolución de NaOH 0,02 M, para eliminar los iones cloruro de

la membrana, produciéndose un cambio de color de la misma de amarillo-anaranjado a rojo. Todas las medidas se realizan a temperatura ambiente, no siendo necesario acondicionar las membranas antes de su uso.

En el caso de las muestras de agua, se introducen 8 mL de agua en un tubo de polietileno, diluida si es necesario, junto con 2 mL de tampón ácido ortofosfórico/ sodio dihidrogeno fosfato 0,1 M de pH 2,0, operando igual que antes.

2.5. Cálculos

El valor de la constante de coextracción K_e necesaria para obtener un ajuste óptimo de los datos experimentales se calculó de acuerdo con estudios previos¹⁹, para lo cual se toman los valores en la zona de máxima pendiente de la curva de calibrado pues son los que ofrecen más información y producen menos error.

El grado de desprotonación (α , ecuación 4.1) del cromoionóforo se obtuvo de los espectros haciendo uso de los valores de mínima y máxima absorbancia (A_{HC} y A_{C^-}) obtenidos al equilibrar el sensor desechable con HCl 10^{-2} M y NaOH $2 \cdot 10^{-2}$ M, respectivamente.

$$\alpha = \frac{A - A_{HC}}{A_{C^-} - A_{HC}} \quad (4.1)$$

Dado que el cromoionóforo no puede estar completamente protonado ($\alpha \cong 0,95$) al pH de trabajo (pH 2,0), sustituimos el valor de α por un valor de α efectivo, α_{ef} , con el fin de usar una medida que nos de el grado de desprotonación con respecto al pH de las disoluciones tampón (2,0). Para ello, se obtienen los valores de absorbancia mínima y máxima ($A_{tampón}$ y A_{C^-}) equilibrando los sensores desechables con tampón de pH 2,0, 10^{-2} M y con NaOH $2 \cdot 10^{-2}$ M. Los coeficientes de selectividad $K_{Cl^-, j^{z-}}^{opt}$ fueron calculados usando el método de las disoluciones separadas (SSM)^{20,21}. Las actividades se calcularon de acuerdo con el formalismo de Debye Hückel²².

3. Resultados y discusión

Este sensor desechable consiste en una lámina de poliéster que se emplea como soporte de una membrana polimérica sensora plastificada y transparente que contiene todos los reactivos necesarios para poder extraer y reconocer cloruros de forma rápida y selectiva^{16,23}. El proceso de reconocimiento huésped-receptor de cloruros por parte del ionóforo, está acoplado, a través de una condición de electroneutralidad, a la coextracción de un ión de referencia, un protón, el cual se encuentra complejoado de manera reversible por un indicador de pH, denominado cromoionóforo, que actúa como transductor del proceso de reconocimiento. Cuando la membrana sensora entra en contacto con una disolución acuosa conteniendo cloruro, ocurrirá el siguiente proceso de coextracción, caracterizado por una constante K_e :



De este modo, a partir de la absorbancia de la forma desprotonada del cromoionóforo, que es la especie medible en la fase membrana, podemos obtener el grado de desprotonación α , que se define como la relación entre el cromoionóforo desprotonado respecto a su concentración analítica C_0 . Se trata por tanto de una absorbancia normalizada y es el parámetro analítico usado.

La actividad de cloruro y la actividad protónica en la fase acuosa están relacionados con la constante de equilibrio K_e y con α , a través de la siguiente función respuesta obtenida considerando el equilibrio total y realizando los oportunos balances de masa y carga:

$$a_{\text{Cl}^-} = \frac{(1 - \alpha_{\text{ef}})^2}{\alpha_{\text{ef}} \left[\left(\frac{C_{\text{L}}}{C_{\text{C}}} - (1 - \alpha_{\text{ef}}) \right) \right]} K_e \cdot a_{\text{H}^+} \quad (4.3)$$

donde C_L y C_C son las concentraciones analíticas de ionóforo y cromoionóforo, respectivamente. Para determinar ópticamente la actividad de cloruros, el pH del problema se ajusta a un valor adecuado y conocido con una disolución reguladora.

3.1. Optimización de la respuesta del sensor desechable

Los parámetros que pueden influenciar la respuesta óptica se relacionan con: a) diseño y composición de la membrana, y b) el proceso de equilibración entre la disolución problema y el sensor desechable.

3.1.1. Optimización de la composición de la membrana

Para garantizar la movilidad y/o permeabilidad del analito y de los protones a través de la membrana, es necesario introducir en la membrana una sustancia plastificante. El tipo y la proporción de plastificante se optimizaron teniendo en cuenta la extensión de la reacción con cloruro, el tiempo de respuesta y la selectividad. Después se estudió la selectividad de la membrana para aniones concomitantes con cloruro en agua para diferentes relaciones ionóforo:cromoionóforo.

Fueron ensayados cinco plastificantes diferentes, provenientes de diferentes grupos como son ésteres fosfato, éteres y ácidos carboxílicos, en concreto: tributilfosfato (TBP), o-nitrooctilfeniléter (NPOE), bis(2-etilhexil)sebacato (DOS), dioctilftalato (DOP) y tris(2-etilhexil)fosfato (TEHP). Para seleccionar el plastificante, se prepararon membranas conteniendo cada uno de los plastificantes y manteniendo una composición fija del resto de los componentes. Todos ellos contenían 33% de PVC, 65% en peso del plastificante correspondiente, 1,00 mg de cromoionóforo y una cantidad de ionóforo de 1,33 mg correspondiente a una relación molar 2:1 ionóforo/cromoionóforo, todo ello disuelto en 0,75 mL de THF recién destilado. Estas proporciones de partida seleccionadas fueron valores habituales en estudios de este tipo¹⁶. Con 20 μ L de cada cóctel se prepararon diferentes membranas, según se indica anteriormente. A continuación, se puso cada una de las membranas en contacto con

disoluciones 0,04 M de cloruro a pH 2 con tampón ácido ortofosfórico/ dihidrogenofosfato potásico 0,02M y se registró la variación de absorbancia a 534 nm.

Los mejores resultados se obtuvieron empleando DOS y TBP, pues eran los que daban lugar a absorbancias mayores. El orden de respuesta encontrado, de mayor a menor, fue el siguiente: DOS ~ TBP > DOP > NPOE > THEP. Para elegir entre DOS y TBP se realizó un estudio cinético para comprobar con que plastificante se obtenía una máxima respuesta en un menor tiempo. Para ello, se prepararon dos sensores desechables con los dos plastificantes a estudiar a un 65% y se depositaron en una de las caras de una cubeta de cuarzo de 10 mm de longitud de paso óptico, añadiendo 5 mL de una disolución $4 \cdot 10^{-2}$ M de Cl^- . Se comprueba que utilizando DOS como plastificante, el tiempo de respuesta necesario para alcanzar la máxima señal es la mitad que el tiempo necesario cuando se emplea TBP, como se puede ver en la Figura 4.2, por lo que se eligió DOS como plastificante para siguientes experiencias.

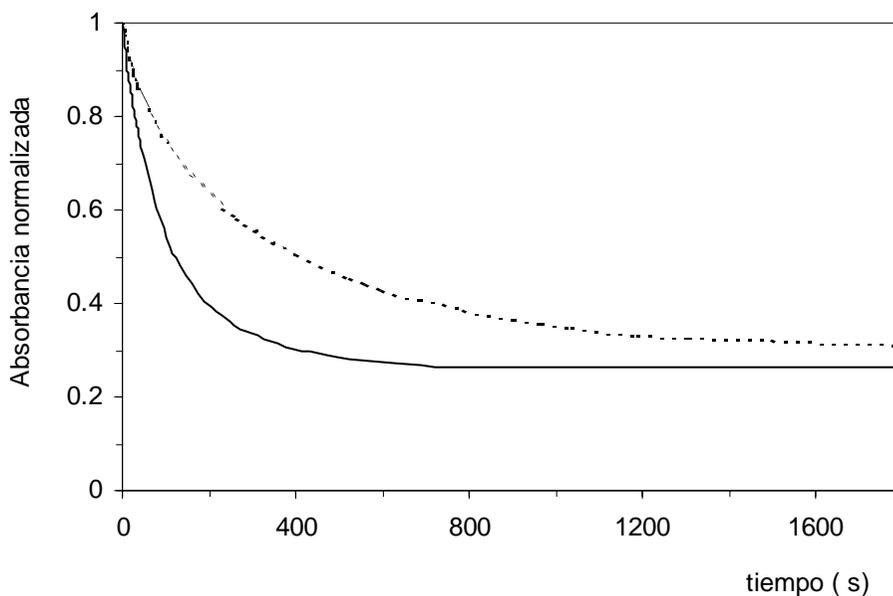


Figura 4.2. Tiempo de respuesta de las membranas para cloruro usando como plastificante DOS (línea continua) y TBP (línea discontinua).

La proporción óptima de DOS se estableció considerando: 1) su influencia sobre la selectividad²⁴ con respecto a aniones concomitantes que están presentes en aguas naturales y 2) su influencia sobre la velocidad de respuesta.

Se denomina selectividad, a la capacidad de una membrana sensora para extraer exclusivamente el analito y para discriminar especies interferentes que respondan originando el mismo tipo de señal. Se define mediante el coeficiente de selectividad K_{ij}^{opt} , para el caso de que junto con el ión primario i^{v-} coexista un ión interferente j^z . Ese coeficiente lo calculamos mediante el método de las disoluciones separadas²⁵ y viene dado por el cociente entre las actividades de los iones principal e interferente para un valor de $\alpha = 0,5$. Para seleccionar la proporción óptima de plastificante, se estudió la influencia de esta proporción sobre la selectividad de la membrana, así como en la velocidad de la reacción. El estudio se realiza variando el porcentaje de DOS en el cóctel, desde un 30% hasta un 70%, manteniendo constante la masa final del cóctel. Esto implica el ir bajando la cantidad de PVC al ir subiendo la de DOS, ya que ambas están relacionadas.

Se prepararon series de disoluciones de cloruro y de los interferentes bromuro, yoduro, nitrato y sulfato con seis niveles de actividad diferentes en cada serie y con el valor de pH ajustado a 2,0 con una disolución reguladora de ácido ortofosfórico / dihidrógeno fosfato. Se analizó cada serie con una misma membrana, efectuando tres réplicas por serie. Cada membrana se introdujo durante 6 minutos para asegurar la consecución del equilibrio y, a continuación, se midió la absorbancia y se establecieron las funciones α_{ef} frente a $\log a_{Cl^-}$, lo que permitió calcular los coeficientes de selectividad.

El coeficiente selectividad está directamente relacionado con α_{ef} y gráficamente se corresponde a la distancia que separa las funciones respuesta del analito y del interferente. En esta Memoria de Doctorado se han determinado los coeficientes de selectividad matemáticamente utilizando la ecuación:

$$K_{I^{v-}, J^{z+}}^{\text{opt}} = \left(\frac{\alpha \cdot a_{\text{H}^+}}{1 - \alpha} \right)^{z-v} \cdot \frac{K_{J^{z-}} \left(\frac{C_L}{C_C} - (1 - \alpha) \frac{q}{z} \right)^q \cdot z C^{q-1}}{K_{X^{v-}} \left(\frac{C_L}{C_C} - (1 - \alpha) \frac{p}{v} \right)^p \cdot v C^{p-1}} \quad (4.4)$$

Donde v y p son la carga y la estequiometría del anión principal (i); y z y q las del anión interferente j .

Para el cálculo de este coeficiente de selectividad fue necesario estudiar por separado el comportamiento y respuesta para cada uno de los iones, para luego extraer de esos datos experimentales los parámetros de la ecuación 4.4.

Los valores experimentales de α_{ef} para sulfato, se ajustaron para el caso de un anión monovalente ya que al pH de trabajo, la cantidad de HSO_4^- es significativamente alta. El orden de selectividad encontrado fue: $\text{I}^- > \text{Br}^- > \text{Cl}^- \gg \text{NO}_3^- > \text{SO}_4^{2-}$ lo que implica un cambio en el modelo usual de selectividad de aniones debida a transferencia de energía libre desde agua a una membrana orgánica (serie de Hofmeister). Esta variación es debida a la interacción tipo ácido Lewis que es producida por el ionóforo dentro de la membrana. Como se ve en la Figura 4.3, al variar el porcentaje de plastificante no se altera este orden en la serie de Hofmeister, aunque el valor de coeficiente de selectividad, especialmente para nitrato y sulfato se incrementa a partir de porcentaje de un DOS del 50% en adelante.

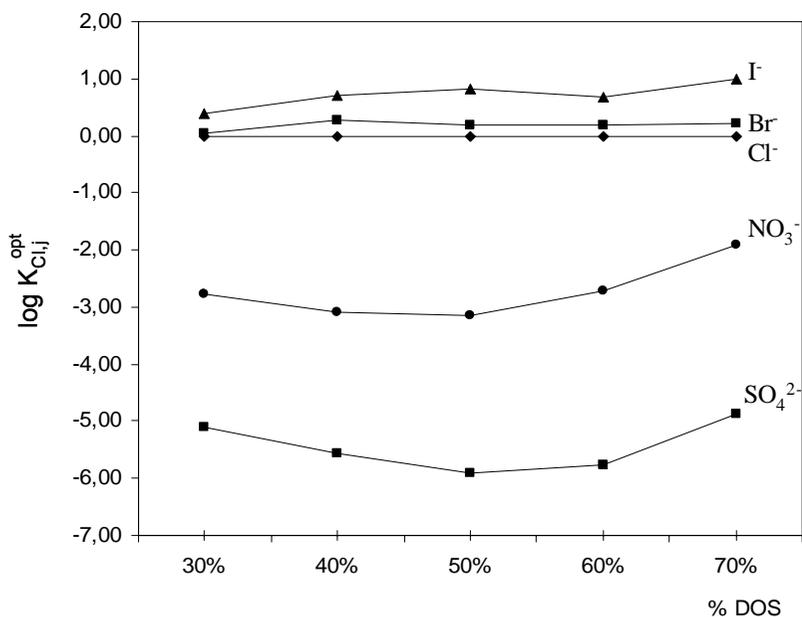


Figura 4.3. Variación de la selectividad del sensor desechable en función del porcentaje de DOS.

Por otra parte, y para seleccionar el porcentaje de plastificante más adecuado, se realizó un estudio para comprobar en que caso se obtiene una respuesta más rápida y alta. Para ello, se utilizó una disolución de cloruro de concentración 0,04 M y se estudió la variación de la absorbancia en función del tiempo de igual manera a como antes se ha indicado (Tabla 4.1).

Se observa que la velocidad se incrementa con la cantidad de DOS hasta un porcentaje del 60%. Con cantidades mayores, tanto la velocidad como las propiedades físicas son peores pues la membrana es menos homogénea y aumenta el tiempo de secado para su preparación. Aunque del estudio de selectividad, como se ve en la Figura 4.3, se deduce que el 50% de plastificante es el que produce una mejor selectividad, se seleccionó finalmente un 60% de plastificante dado que la selectividad en este porcentaje es más que suficiente y el tiempo de respuesta se mejora en un 25%. Si comparamos con otras membranas para cloruro basadas en un ionóforo organoestannico similar ⁴, se observa que el tiempo de análisis en nuestro caso lo hemos reducido de 10 a 6 minutos.

Tabla 4.1. Tiempo de equilibrio en función de porcentaje de DOS en membrana.

DOS (%)	Tiempo (min)
40	9,5
50	8,0
60	6,0
70	8,5

La concentración óptima de ionóforo en la membrana es la necesaria para alcanzar la máxima selectividad para cloruro. Con el objetivo de estudiar la influencia de la relación ionóforo:cromoionóforo sobre el coeficiente de selectividad, se prepararon un conjunto de membranas desechables en las que se varió dicho cociente. Para ello, la cantidad de cromoionóforo se mantuvo constante en todas ellas en una cantidad adecuada para minimizar el error fotométrico en la medida de la absorbancia, mientras que la proporción molar del ionóforo respecto al cromoionóforo se fue incrementando desde un 50% a un 500% respecto a la cantidad de cromoionóforo. De cada proporción se prepararon tres membranas distintas.

Se utilizaron series de disoluciones de los interferentes yoduro, bromuro, sulfato y nitrato, además de cloruro, con el valor de pH ajustado a 2,0 con una disolución reguladora ácido ortofosfórico / dihidrógeno fosfato, siendo la concentración de este tampón $1 \cdot 10^{-2}$ M en la disolución final. Se analizó cada serie con una misma membrana, efectuando tres réplicas por serie. Cada membrana se introdujo en la disolución durante 6 minutos para asegurar la consecución del equilibrio y, a continuación, se midió la absorbancia y se establecieron las funciones α_{ef} frente a $\log a_{Cl^-}$, lo que permitió calcular los coeficientes de selectividad.

Tal y como puede observarse en la Figura 4.4, no hay diferencias significativas en los coeficientes de selectividad entre los principales iones interferentes ensayados, sin embargo se selecciona una relación ionóforo/cromoionóforo de 2 por ofrecer mejores coeficientes de selectividad y porque se ajustan mejor los datos experimentales al modelo teórico.

Los valores de coeficiente de selectividad $K_{Cl^-,j}^{opt}$, que se obtienen para esta relación son los siguientes: I⁻ (0,82), Br⁻ (0,19), NO₃⁻ (-3,21) y SO₄²⁻ (-3,26). La selectividad encontrada supone alguna mejora respecto a los resultados publicados previamente para un sensor de membrana para cloruro en suero, el cual incorpora ese mismo ionóforo pero emplea bis(1-butilpentil)adipato como plastificante y que obtiene unos coeficientes de selectividad de I⁻ (1,0), Br⁻ (0,3), NO₃⁻ (-1,8) y SO₄²⁻ (-2,8)¹⁶. Además, el uso de un ionóforo similar, cloruro de triciclohexil estaño, combinado con el plastificante bis(2-etilhexil)sebacato da lugar a una membrana con coeficientes de selectividad mas bajos (I⁻ (1,0), Br⁻ (0,5), NO₃⁻ (<-2,0)⁴.

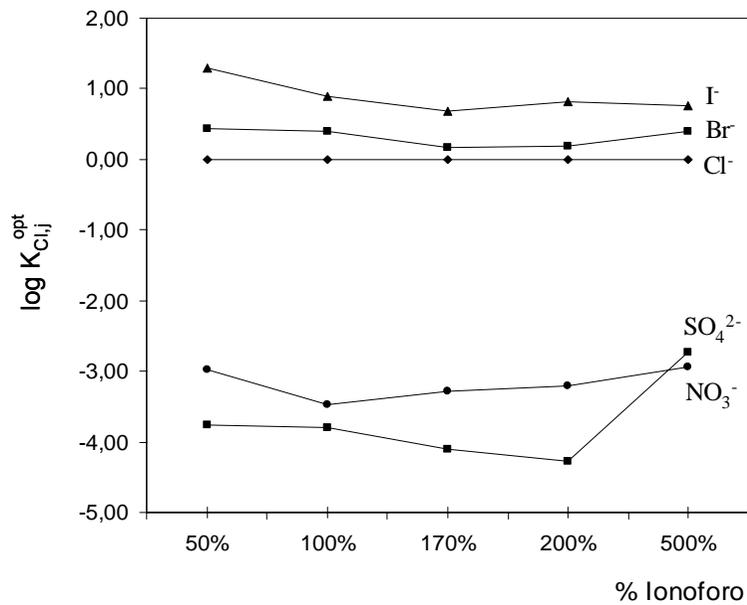


Figura 4.4. Variación de la selectividad del sensor en función de la relación molar ionóforo/cromoionóforo

3.1.2. Optimización de los parámetros de reacción

Los parámetros relacionados con la fijación del analito en la membrana sensora son el pH, y el tiempo de contacto entre el sensor desechable y la disolución

La 4',5'-dibromofluoresceína octadecil éster es una molécula neutra cuando se encuentra en su forma ácida y está cargada negativamente en su forma básica (Figura 4.5). La influencia de pH sobre la respuesta del sensor desechable se estudió a diferentes actividades de cloruro. Una vez preparados los sensores desechables se pusieron en contacto con disoluciones de cloruro cuyo pH se ajustó con disoluciones reguladoras de pH comprendidas entre 2,0 y 7,2, preparadas a partir de H_3PO_4 y NaOH . Se prepararon tres series de seis disoluciones que contenían una concentración de cloruro comprendida entre 0,1 y 1×10^{-4} M.

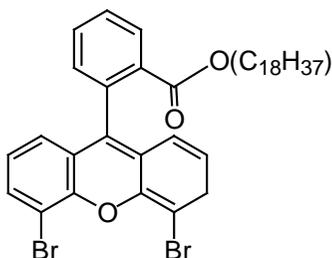


Figura 4.5. 4',5'-dibromofluoresceína octadecil éster.

Como puede apreciarse en la Figura 4.6, solo a valores de pH por debajo de 5 es cuando se observa coextracción de iones cloruro y protones. Para un pH entre 2,0 y 4,0, hay un buen ajuste entre los datos experimentales y el modelo teórico (usando como criterio de ajuste la suma de los cuadrados de las residuales). Se seleccionó como pH de trabajo 2,0 porque produce un mayor desplazamiento de la curva hacia la izquierda, lo que supone un incremento de la sensibilidad del sensor. El tampón empleado fue ácido fosfórico/ dihidrógeno fosfato de una concentración final 0,02 M.

En la Figura 4.7 se muestra la respuesta óptica del sensor desechable, basada en el cloruro de trioctil estaño como ionóforo, a actividades de cloruro comprendidas entre $8,1 \times 10^{-7}$ y $0,32$ (1×10^{-6} y $0,5$ M en concentraciones) a un pH de 2,0. Como se puede ver existe una clara distinción entre la estequiometría 1:2 (Cl:L) ($p=2$) y el resto ($p=0,5$, $p=1$). La distinción entre las estequiometrías 0,5, y 1,0 no está clara, pero se considera que la estequiometría que tiene lugar en la membrana es la 1:1 de acuerdo a lo publicado por Wuthier⁸.

El ajuste por mínimos cuadrados de los puntos experimentales en la zona lineal de máxima pendiente (6 diferentes niveles de concentraciones y nueve réplicas de cada uno) de la curva de calibrado al modelo matemático indicado en la ecuación 4.3 permite calcular un valor para el $\log K_e$ de 4,41.

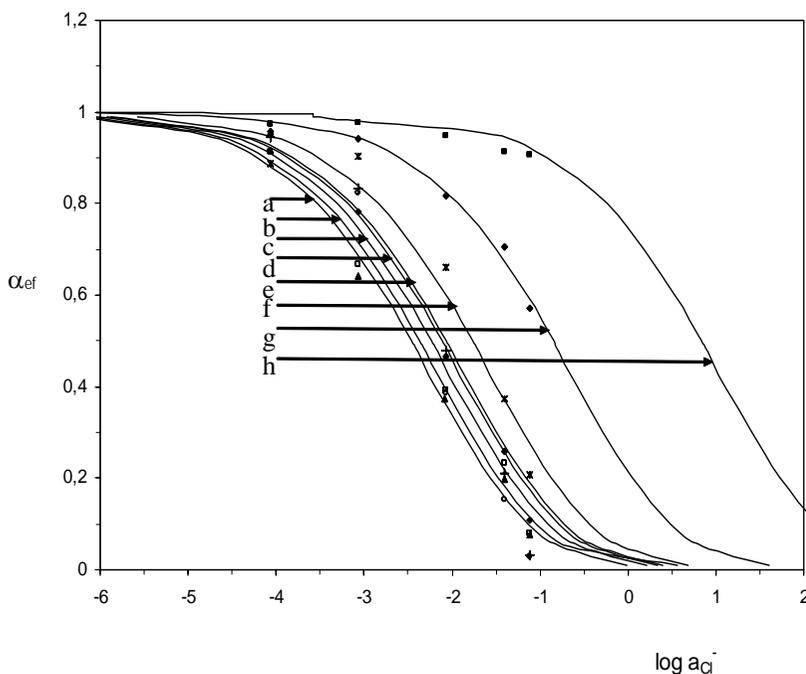


Figura 4.6. Curvas teóricas y experimentales obtenidas a diferentes pH: a) pH 2,0; b) pH 2,4; c) pH 2,7; d) pH 3,0; e) pH 3,4; f) pH 4,0; g) pH 5,2; h) pH 7,2.

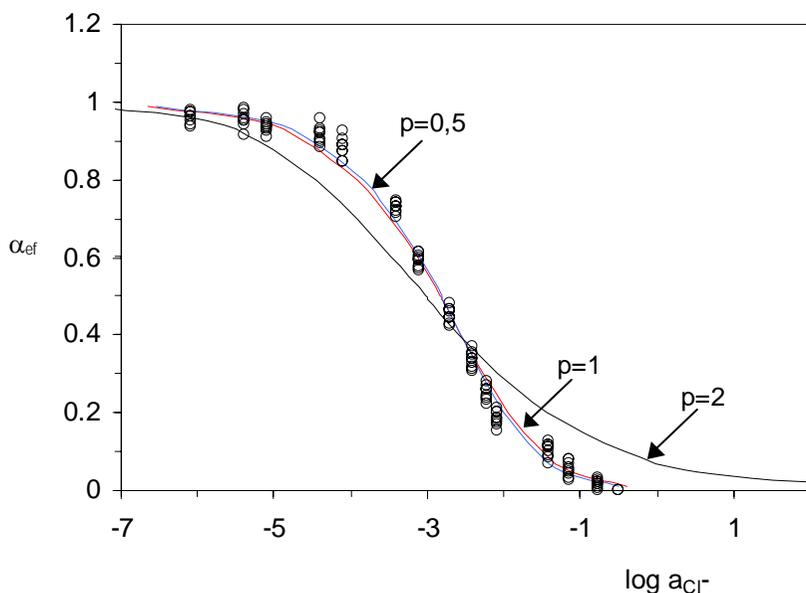


Figura 4.7. Estequiometría de la reacción de intercambio. Curvas teóricas.

3.2. Parámetros analíticos

Como rango de medida hemos usado la relación lineal en el centro de la función sigmoideal de respuesta, la cual ha sido establecida como una recta mediante un ajuste por medio de mínimos cuadrados y como límite de detección se ha utilizado la intersección de la función de calibrado lineal anteriormente definida y una función lineal ajustada en la zona de mínima pendiente²³ como puede verse en la Figura 4.8.

Para caracterizar el sensor desechable propuesto, se prepararon dos series de disoluciones patrón, una en la zona de máxima pendiente de la respuesta sigmoideal (seis patrones, nueve réplicas de cada uno), en un rango de concentraciones comprendido entre $4,05 \times 10^{-4}$ y $8,00 \times 10^{-3}$ en actividades ($5,00 \times 10^{-4}$ y $1,00 \times 10^{-2}$ M en concentraciones) y otra serie de disoluciones patrón en la zona de mínima pendiente del sigmoide (cinco patrones, nueve réplicas de cada), entre $8,10 \times 10^{-7}$ y $8,10 \times 10^{-5}$ en actividades ($1,00 \times 10^{-6}$ y 1×10^{-4} M en concentraciones). La linealidad de ambas series, como se ha explicado anteriormente, fue comprobada por aplicación de un test de fallo de ajuste²⁶.

Las funciones lineales que se obtuvieron fueron, respectivamente:

$$\alpha = -0,6538 - 0,4066 \log a_{\text{Cl}^-} \quad (4.5)$$

$$\alpha = 0,7924 - 0,0285 \log a_{\text{Cl}^-} \quad (4.6)$$

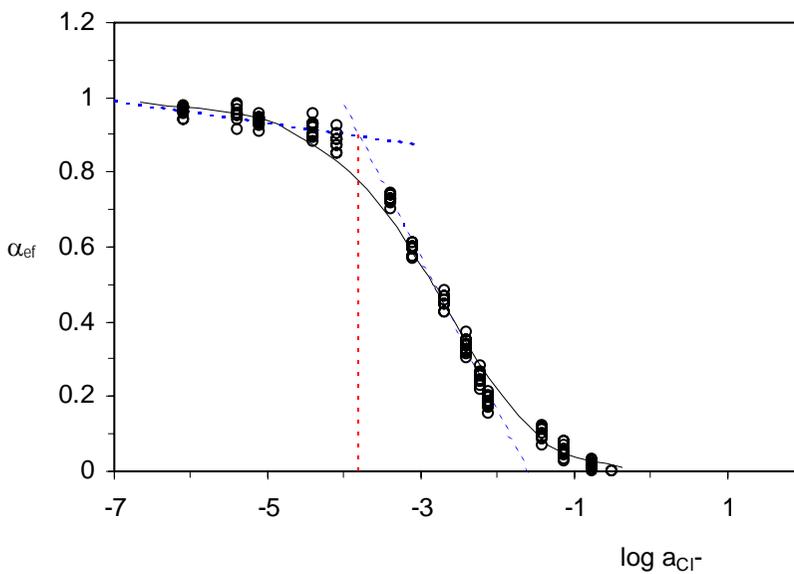


Figura 4.8. Cálculo del límite inferior y superior y del rango dinámico lineal.

El límite de detección se calculó por la intersección de ambas funciones, lo que dio un valor de 0,15 mM y el límite superior se obtuvo por la intersección de la función de calibrado con el eje de abscisas, resultando un valor de 24,7 mM. De esta manera, el rango de medida del sensor desechable propuesto para cloruro está comprendido entre 0,15 y 24,7 mM en actividades.

Tabla 4.2. Límites inferior y superior para el sensor de cloruro

	Límite de detección	Límite superior
Actividad	0,15 mM	24,7 mM

La precisión del sensor desechable expresada como desviación estándar relativa (DER), fue estudiada a para tres niveles de actividad de cloruro 0,41, 2,02, 8,00 mM (0,5, 2,5, y 10 mM en concentraciones) y usando diez réplicas de cada uno, realizándose un doble estudio. Por un lado, empleando siempre el mismo sensor desechable, esto es un estudio intramembrana, y por otro lado, empleando un sensor diferente en cada réplica, lo que llamaremos estudio intermembrana. La precisión intramembrana y intermembrana para el $\log a_{Cl^-}$ se muestra en la Tabla 4.3 y 4.4.

Tabla 4.3. Reproducibilidad intramembrana

a_{Cl^-} (mM)	DER (%)
0,41	2,6
2,02	4,4
8,00	4,8

Tabla 4.4. Reproducibilidad intermembrana

a_{Cl^-} (mM)	DER (%)
0,41	6,0
2,02	6,4
8,00	6,6

Tabla 4.5. Parámetros analíticos del sensor desechable para cloruro.

Parámetro		Valor; S
Ordenada		-0,654; 0,022
Pendiente		-0,407; 0,008
Nivel de probabilidad % (test fallo ajuste)		8,32
Rango lineal (mM)		0,15 – 24,68
Limite detección (mM)		0,15
DER (%) ^a	0,41	2,6
Intramembrana (mM ^b)	2,02	4,4
	8,00	4,8
DER (%) ^a	0,41	6,0
Intermembrana (mM ^b)	2,02	6,4
	8,00	6,6

^aDER en términos de $\log a_{Cl^-}$; ^b expresado en actividades

Los resultados obtenidos, indican que el sensor desechable propuesto actúa reversiblemente y ofrece buenos resultados de precisión, expresada como DER, tanto cuando se emplea el mismo sensor desechable así como cuando se emplean diferentes sensores. La Tabla 4.5 muestra un resumen de estos y otros parámetros analíticos.

En la Tabla 4.6, se puede ver una comparación de las características principales del ensayo desarrollado frente a otros procedimientos propuestos.

Tabla 4.6. Características de métodos rápidos usados para la determinación de cloruro

Medio de ensayo	Método de detección	Rango analítico (mg·L ⁻¹)	Tiempo de análisis (min)	Referencia
Tira reactiva Merckoquant	Visual (color)	500 –3000	5	27
Ensayo rápido Aquaquant	Visual (color)	5 –300	5	27
Tira reactiva Hach	Visual (color)	30 –600	-	28
Varillas de ensayo Quantofix	Visual (color)	500 –3000	-	29
Papel indicador Satesmo	Visual (microvaloración sobre papel)	250 –5000	-	30
Kyoritsu Chemical-Check Pack Test	Visual (color)	2 –50; 100 –200	110 s	31
Tira reactiva	Visual (color)	1500 –8000	1	2
Tira reactiva	espectrofotometría	20 –350	10	4
Tira reactiva sellada	Visual (longitud de la zona coloreada)	0,1 –1000	10	32
Tira reactiva	Visual (color)	1000 –4000; 2000 –6000	0,5 0,5	33
Polvo indicador	SFS	1 –30	20	3
Tubo indicador	Visual (longitud de zona coloreada)	20 –200	5	3
Membrana	Atenuación fluoresc.	3,5 –3550	-	6
Sensor desechable	Espectrofotometría	5 –877	6	esta Memoria

3.3. Aplicaciones del método

Para comprobar la aplicabilidad del sensor desechable propuesto para la determinación de cloruro, fue aplicado a la determinación de cloruro en aguas de diversa procedencia (grifo, pozo, río y mar). Los resultados han sido validados por comparación con un método potenciométrico (ISE)³⁴. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 4.7 donde se recogen los resultados correspondientes

al valor promedio de tres réplicas para cada muestra con cada uno de los métodos, la desviación estándar de estas medidas y el valor P del test de comparación de medias empleado. Como se observa no existe diferencia significativa entre las medias obtenidas utilizando el sensor desechable propuesto y el método de referencia.

Tabla 4.7. Determinación de cloruro en diferentes tipos de agua, empleando como método de referencia un método potenciométrico (ISE).

Muestra	Sensor desechable (mM Cl ⁻)	S	Metodo referencia (mM Cl ⁻)	S	P _{val}
Agua de mar (Almuñecar, Granada)	498	12,73	479	20,41	34,5
Agua de mar (Almería)	555	76,59	493	12,04	11,0
Agua de grifo (Balanegra, Almería)	6,8	0,98	6,1	0,15	30,8
Agua de grifo (Almería)	0,8	0,32	0,83	0,02	72,0
Agua de pozo (Rebeque, Almería)	7,7	0,58	7,2	0,18	20,6
Agua de arroyo (Chauchina, Granada)	22,5	0,58	23,6	0,59	12,2

4. Conclusiones

Se ha desarrollado un sensor desechable óptico para la determinación de cloruro basado en un ionóforo organoestánnico, el cual mide por transmisión y ofrece una buena eficiencia junto con una repetibilidad suficientemente buena. Este sensor desechable puede ser considerado como una alternativa económica para obtener información analítica *in situ*. La membrana tiene suficiente selectividad para la determinación de cloruro en aguas naturales y puede ser aplicada satisfactoriamente a la determinación de este ión en aguas de diferentes orígenes. El uso de este sensor sólo requiere tamponar la muestra problema y ofrece buenos resultados con una exactitud, precisión y costo que lo hacen útil para análisis de rutina con equipamiento portátil. El tiempo de vida de este sensor desechable es de un mes y medio en condiciones normales cuando esta protegido de la luz. Una desventaja de este sensor desechable es el relativamente largo tiempo de respuesta que es de 6 minutos.

5. Bibliografía

1. Zolotov, Yu.; Ivanov, V. M.; Amelin, V. G. *Chemical test methods of analysis*, 1 ed.; Elsevier: Amsterdam, 2002.
2. Ruperisi Lakshman, L. S. and Liese, K. Bandelette et methode d' analyse pour la detection de taux eleves de chlorures pour des piscines et stations thermales. Patente FR 2800166 (2000).
3. Morosanova, E.; Velikorodnyi, A.; Myshlyakova, O. V.; Zolotov, Yu. *J.Anal.Chem.* **2001**, *56*, 284-89.
4. Hisamoto, H.; Miyashita, N.; Watanabe, K.; Nakagawa, E.; Yamamoto, N.; Suzuki, K. *Sens.Actuators B* **1995**, *29*, 378-85.
5. Clement, P. L. Integral element for analysis of liquids. Patente US 4,042,335 (1977).
6. Kawabata, Y. and Toge, Y. Fluorometric analysis of chloride ion and chemical sensor therefor. Patente US 5,691,205 (1997).
7. Martijn, M. M.; Reinhoudt, D. N.; Reinhoudt, A. N. *Chem.Commun.* **1998**, 443-48.
8. Wuthier, U.; Pham, H. V.; Zuend, R.; Welti, D.; Funck, R. J. J.; Bezegh, A.; Ammann, D.; Pretsch, E.; Simon, W. *Anal.Chem.* **1984**, *56*, 535-38.
9. Moriuchi-Kawakami, T.; Aoto, H.; Takeda, N.; Fujimori, K.; Shibutani, Y. *Anal.Sci.* **2000**, *16*, 303-07.
10. Wuthier, U.; Pham, H. V.; Rusterholz, B.; Simon, W. *Helv.Chim.Acta* **1986**, *69*, 1435-41.
11. Bühlmann, P.; Pretsch, E.; Bakker, E. *Chem.Rev.* **1998**, *98*, 1953-687.

12. Xu, Chao; Qin, Yu; Bakker, Eric *Talanta* **2004**, *63*, 180-84.
13. Ceresa, A.; Quin, Y; Peper, S.; Bakker, E. *Anal.Chem.* **2003**, *75*, 133-40.
14. Zhang, W.; Rozniecka, E.; Malinowska, E.; Parzuchowski, P.; Meyerhoff, M. E. *Anal.Chem.* **2002**, *74*, 4548-57.
15. Hisamoto, H.; Watanabe, K.; Oka, H.; Nakagawa, E.; Spichiger-Keller, U. E.; Suzuki, K. *Anal.Sci.* **1964**, *10*, 615-23.
16. Tan, S. S. S.; Hauser, P. C.; Wang, K.; Fluri, K.; Seiler, K.; Rusterholz, B.; Suter, G.; Krüttli, M.; Spichiger-Keller, U. E.; Simon, W. *Anal.Chim.Acta* **1991**, *255*, 35-44.
17. Capitán-Vallvey, L. F.; Alvarez de Cienfuegos, P.; Fernández-Ramos, M. D.; Avidad-Castañeda, R. *Sens.Actuators B* **2000**, *71*, 140-46.
18. Seiler, K.; Simon, W. *Anal.Chim.Acta* **1992**, *266*, 73-87.
19. Capitán-Vallvey, L. F.; Fernández-Ramos, M. D.; Alvarez de Cienfuegos, P. *Anal.Chim.Acta* **2002**, *451*, 231-41.
20. Bakker, E.; Simon, W. *Anal.Chem.* **1992**, *64*, 1805-12.
21. Lerchi, M.; Bakker, E.; Rusterholz, B.; Simon, W. *Anal.Chem.* **1992**, *64*, 1534-40.
22. Meier, P. C. *Anal.Chim.Acta* **1982**, *136*, 363-68.
23. Bakker, E.; Bühlmann, P.; Pretsch, E. *Chemical Rev.* **1997**, *97*, 3083-132.
24. Preininger, C.; Mohr, G. J.; Klimant, I.; Wolfbeis, O. S. *Anal.Chim.Acta* **1996**, *334*, 113-23.

25. IUPAC *Pure Appl.Chem.* **1976**, *48*, 127.
26. Analytical Methods Committee *Analyst* **1994**, *119*, 2363-66.
27. Merck. Reflectoquant™ Liquid Analysis System. 2004.
28. Hach Lange. Drinking water. 2004.
29. Sigma-Aldrich. Quantofix® Test Sticks. 2004.
30. Macherey-Nagel. Testpapers and test sticks. 2004.
31. Kyoritsu Chemical-Check. Pack Test. 2004.
32. Nabivanets, B. I.; Sukhan, V. V.; Kokhonenko, T. V; Sukhan, T. A. *Zh.Anal.Khim.* **1998**, *53*, 136.
33. LaMotte Company. Insta-Test. 2004.
34. American Public Health Association *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 15 ed.; 1981.

CAPITULO 4

SENSOR OPTICO DESECHABLE PARA LA DETERMINACIÓN DE NITRATO BASADO EN UN RECEPTOR TIPO AMIDA

SENSOR OPTICO DESECHABLE PARA LA DETERMINACIÓN DE NITRATO BASADO EN UN RECEPTOR TIPO AMIDA

1. Introducción

El reconocimiento de aniones es un área emergente de especial interés en química supramolecular debido al reto que presenta cuando se compara con cationes (por tamaño, forma, geometría, interacciones, dependencia de pH, efectos del disolvente) así como por su importancia en monitorización ambiental, diagnóstico médico y análisis biológico^{1:2}.

El ión nitrato es un anión con un débil carácter básico y coordinante, por lo que el reconocimiento selectivo de nitrato requiere tanto complementariedad en tamaño como en forma por

parte del receptor. Diferentes receptores sintéticos han sido estudiados para el reconocimiento de nitrato, principalmente los basados en enlaces de hidrógeno. En este caso, los grupos enlazantes se disponen de forma convergente y rígida, empleando receptores con simetría C_3 , para ajustarse a la funcionalidad del nitrato, al igual que en los receptores basados en amidas propuestos por Anslyn³ o los receptores basados en tioureas por Herges⁴. En otros casos, se ha usado para el reconocimiento de nitrato receptores con amidas donoras de enlaces de hidrógeno y una contribución electrostática por parte de un centro metálico, como es el caso del platino (II) nicotinamida⁵.

Interacciones por enlace de hidrógeno con aminas protonadas se han utilizado para complejar dos nitratos, tal como ocurre con el macrocilo bicíclico de simetría C_3 que se obtiene por condensación entre tren y dicarboxialdehidos⁶. Las interacciones electrostáticas también han sido usadas para reconocimiento de nitratos empleando receptores tipo amonio cuaternario^{7-9,10}, o complejos catiónicos como el complejo de Ni (II)- fenantrolina¹¹, aunque la selectividad está influenciada por la hidrofobicidad de acuerdo con la serie de Hoffmeister¹², lo cual resulta en una fuerte interferencia de aniones de similar energía de hidratación como ocurre con nitrato y cloruro. La coordinación de metales o ácidos de Lewis son otros tipos de interacciones no covalentes empleadas para complejar a aniones, tal como los complejos altamente cargados de Pt, que encapsulan al nitrato a través de los átomos de platino que actúan como ácidos de Lewis¹³ o una metalocaja macrotríclica de Pd (II) que encapsula nitrato a través de átomos de Pd¹⁴.

El uso analítico de estos receptores es muy limitado. Así podemos citar un ensayo competitivo espectrofotométrico para nitratos, basado en el desplazamiento de un indicador aniónico, como es el rojo de metilo o la resorufina, que están complejados con el receptor al añadir nitrato¹⁵. Sin embargo el empleo de mezclas CH_3OH/CH_2Cl_2 (1:1) como disolvente impide su uso en muestras reales.

En cualquier aplicación al análisis de los receptores arriba citados, hay que tener siempre en consideración el importante papel jugado por los efectos del disolvente en el control de la unión del anión, en la fortaleza del enlace y en la selectividad¹⁶. Para cualquier aplicación a muestras reales, las cuales mayoritariamente son muestra acuosas, la competición entre el receptor neutro y los aniones solvatados en disolución homogénea, pueden conducir a que no haya reacción o a un pequeño

desplazamiento de la misma. Por el contrario, el empleo de sistemas basados en membrana sí hace posible el reconocimiento de aniones en disolución acuosa.

El ión nitrato se encuentra siempre presente en sistemas ambientales, alimentarios, industriales y fisiológicos, pero las fuentes comunes de contaminación de aguas son causadas por las escorrentías debido al uso de fertilizantes, lixiviación de tanques sépticos, aguas residuales, y la erosión de depósitos naturales¹⁷. El nitrato puede ser causa de diversos problemas sanitarios¹⁸ entre los cuales los más serios son la metahemoglobinemia infantil (o síndrome del niño azul), especialmente en niños lactantes y la formación de nitrosaminas por la reacción con aminas secundarias en productos alimentarios, que posiblemente esté relacionada con la aparición de cáncer de estómago. Estos problemas han sido comúnmente reconocidos, y como consecuencia, se han establecido reglamentos legales con el propósito de controlar los niveles medioambientales, especialmente en aguas, estableciéndose un MCL de 10 mg·L⁻¹ como nitrógeno en los Estados Unidos¹⁹ y 50 mg·L⁻¹ como nitrato en los países de la Unión Europea^{20,21}.

Se han empleado diferentes estrategias para facilitar la detección, determinación y monitorización de nitrato principalmente en aguas²². Estos incluyen sensores desechables, dispositivos analíticos miniaturizados autocontenidos con los reactivos necesarios incorporados en el elemento en forma seca, que responden a la presencia o concentración de un analito, normalmente a través de una reacción química o bioquímica. Entre los sensores desechables electroquímicos se encuentran los sensores amperométricos de tipo dispositivo capilar relleno (*capillary-fill device type*)²³, que se basan en la reacción de nitrato en un electrodo de cobre recién preparado a partir de sulfato de cobre e hidrógenosulfato de potasio serigrafiado en la lámina inferior del dispositivo²⁴.

Se han descrito dos tipos de sensores potenciométricos desechables para nitrato: electrodos selectivos de iones preparados usando tecnología de serigrafiado (*screen-printing*)^{9,10} y dispositivos potenciométricos preparados por deposición del polímero sensible a iones sobre la puerta aislante de un transistor de efecto de campo²⁵. El nitrato de tridodeciletilamonio es el receptor usual empleado y con él la selectividad sigue el esquema de Hoffmeister.

Los sensores visuales para nitratos, tiras reactivas, están basados en la reducción a nitrito y en la formación de un colorante azoico con los reactivos adsorbidos²⁶ o inmovilizados químicamente

en un soporte celulósico²⁷. Las técnicas empleadas para una determinación cualitativa o semicuantitativa son: comparación de la tira reactiva con una carta de colores²⁸ o medida de la longitud o diámetro de la zona coloreada de una tira reactiva sellada con polímero²⁷.

Tiras reactivas para nitrato con muy diferentes formatos, tanto mono como multianalito, son suministradas por diferentes fabricantes como Merck, Industrial Test Systems, Macherey-Nagel, Orion AQUAFast, Hach, Agri-Screen, CHEMetrics y EnviroEquip entre otras, y se emplean en diferentes aplicaciones como aguas, tierras, savia, tejidos de plantas, forrajes, vinos, zumos de frutas y sueros, entre otras. Los sensores ópticos desechables para nitrato están basados en las mismas reacciones que los visuales, empleando la medida de una propiedad óptica, normalmente la reflectancia difusa con instrumentación autónoma²⁷ o dispositivos portátiles, como es el caso del reflectómetro digital de bolsillo Nitracheck y el sistema Reflectoquant de Merck.

El uso de receptores o ionóforos para nitrato pueden mejorar las tiras reactivas convencionales de diferentes maneras: 1) por no requerir la reducción de nitrato o la formación de compuestos coloreados; además de la toxicidad asociada con nitratos, los reactivos que se emplean en tiras comerciales contienen aminos que son tóxicos por naturaleza; 2) por incrementar el rango dinámico usual en tiras reactivas para nitrato; 3) por poder determinar fácilmente la concentración de nitrato, mientras que la mayoría de las tiras comerciales solo ofrecen información semicuantitativa; 4) por ser reversibles, lo que posibilita su reutilización, y además tiene la ventaja de reducir el error de la determinación.

En este Capítulo se expone el trabajo realizado para el desarrollo y puesta a punto de un sensor óptico desechable altamente selectivo para la determinación de nitrato en aguas de diverso tipo mediante el empleo de un espectrofotómetro convencional, que está basado en el empleo de un receptor de simetría C_3 basado en amidas, que mejora las características analíticas de sensores desechables ya existentes²⁹.

2. Experimental

2.1. Reactivos

Los productos químicos empleados fueron de grado analítico y todas las disoluciones acuosas se prepararon empleando agua procedente de un sistema de purificación de osmosis reversa Milli-Ro 12 plus Milli-Q (Millipore, Bedford, MA).

Las disoluciones patrón (1M), se prepararon en agua a partir de sales potásicas de nitrato, yoduro, bromuro (Merck, Darmstadt, Alemania), sulfato (Panreac, Barcelona, España) y cloruro (Sigma-Aldrich Química S.A, Madrid, España); y sales sódicas de perclorato (Panreac), tiocianato, nitrito, hidrógenocarbonato y acetato (Sigma-Aldrich).

Para la preparación de las membranas sensible a nitrato, se utilizó cloruro de polivinilo de alto peso molecular (PVC), tributilfosfato (TBP), tris-(2-etilhexil) fosfato (TEHP), dioctilftalato (DOP), bis (2-etilhexil)sebacato (DOS), 2-nitrofeniloctil éter (NPOE) y tetrahidrofurano (THF), todos ellos adquiridos a Sigma-Aldrich. El cromoióforo 1,2-benzo-7-(dietilamino)-3-(octadecanoilimino) fenoxacina³⁰ y el ionóforo 2,16,18,32,45,47-hexaetil-5,13,21,29,34,42,44,46,48-nonaazaheptaciclo [15.15.11.1^{3,31}.1^{7,11}.1^{15,19}.1^{23,27}.1^{36,40}]-octatetraconta-1,3(45),7(48),8,10,15(47),16,18,23(46),26,31,36,37,39-pentadecaeno-6,12,22,28,35,41-hexona^{15,31} fueron sintetizados, purificados y caracterizados según viene descrito en el Anexo 1. Como soporte se utilizaron láminas de poliéster tipo Mylar (Goodfellow, Cambridge, UK).

2.2. Preparación de los sensores desechables y procedimiento de medida

Las membranas se fabricaron sobre un soporte de poliéster empleando la técnica de recubrimiento giratorio. Las mezclas para la preparación de las membranas sensibles a nitrato se hicieron a partir de una disolución que contenía 29,20 mg (32,2 % p/p) de PVC, 58,80 mg (65 % p/p) de tributilfosfato, 1,50 mg (1,7 % p/p) del ionóforo HNOPH, y 1,00 mg (1,1 % p/p) del ionóforo 1,2-benzo-7-(dietilamino)-3-(octadecanoilimino) fenoxacina disueltos en 1,0 mL de tetrahidrofurano recientemente destilado. Los sensores desechables fueron preparados depositando 15 µL de esta

mezcla sobre una lámina de poliéster de 14 mm × 45 mm × 0,25 mm de espesor con ayuda de un sistema centrífugo de preparación de membranas rotando a 180 rpm³². Tras dejar girando durante 10 segundos, se extrajo la membrana del sistema centrífugo de preparación de membranas y se dejaron secar en un desecador con atmósfera saturada de tetrahidrofurano durante 10 minutos a temperatura ambiente. La zona sensora del sensor desechable es una película circular de 6 mm de diámetro, transparente, de color rojo, con un espesor calculado de 4,5 μm y una concentración de ionóforo y cromoióforo en el sensor una vez preparado de 1,71 mmol kg⁻¹ en cada uno de ellos.

También es posible preparar estos sensores desechables en soportes celulósicos o tipo tejido mediante un proceso de impregnación en dos baños para el tampón y el cóctel, con las ventajas de simplicidad y tiempo de respuesta que ello supone para su uso.

Para evaluar la respuesta del sensor desechable se toma una alícuota de 8 mL de una disolución a ensayar conteniendo nitrato en actividades comprendidas entre 0,022 y 45,15 mM (0,026 y 62,68 mM en concentración) que se coloca en un tubo de polietileno de 10 x 1,5 cm junto con 2 mL de disolución reguladora 0,1M dihidrogeno fosfato/monohidrógeno fosfato de pH 6,0. Se introduce a continuación el sensor desechable en el tubo donde se mantiene durante cinco minutos sin agitación. Tras alcanzar el equilibrio, se saca la membrana de la disolución, se sacude para eliminar las gotas de disolución que la puedan mojar y se mide su absorbancia a 660 nm en un espectrofotómetro de diodos en línea Hewlett-Packard (modelo 8453; Nortwalk, CT) provisto de un soporte metálico de 44 mm de alto y 12 de fondo, pintado en negro mate que se coloca en el compartimento de cubetas³³. Para corregir la absorbancia de fondo, las medidas fueron realizadas frente a una tira de poliéster como referencia. Todas las medidas se realizaron a temperatura ambiente y las membranas no fueron acondicionadas antes de su uso. Los valores de absorbancia máxima y mínima, correspondientes con la forma completamente protonada (A_{HC^+}) y desprotonada (A_{C}) del cromoióforo, necesarios para calcular los valores de α fueron obtenidas midiendo la absorbancia de membranas equilibradas con HNO_3 0,01M y con NaOH 0,02 M, respectivamente. Las actividades fueron calculadas de acuerdo con la ecuación de dos parámetros de Debye-Hückel³⁴.

Las constantes de coextracción K_{e1} , K_{e2} , y K_{e3} se calcularon en la zona de máxima pendiente de la curva experimental obtenida para nitrato, ya que proporciona más información y menor error³⁵.

Estas constantes se calcularon a partir de membranas que contenían ionóforo (K_{e1} y K_{e3}) y otras que no lo contenían (K_{e2}). Los coeficientes de selectividad $K_{NO_3^-,j}^{opt}$ se determinaron aplicando el método de las disoluciones separadas (SSM)^{36,37}. Los programas utilizados para el tratamiento de datos y el ajuste de datos experimentales fueron: Statgraphics Plus Versión 6.0, STSC. Inc., de Statistical Graphics Corp., USA, 1993 y GraphMatica para Win32 v1.60d, 1998 editado por K. Hertzler y adaptado por J. Garrido.

3. Resultados y discusión

El mecanismo de sensado utilizado en este sensor desechable se basa en un proceso reversible de coextracción de iones nitrato y protones entre una membrana tridimensional de PVC plastificado y una fase acuosa que contiene el analito³⁸. Aunque para un sensor de un solo uso, la reversibilidad no es estrictamente necesaria, este sistema proporciona ventajas en términos de reversibilidad y también da lugar a un amplio rango de medida y un corto tiempo de respuesta. En este mecanismo, la unión selectiva de nitrato por el ionóforo L va acompañada de la protonación del cromoióforo C para mantener la electroneutralidad de la membrana, lo que genera la señal analítica. En este caso no se requiere el uso de aditivos iónicos lipofílicos para la coextracción debido al carácter neutro tanto del ionóforo como de la forma básica del cromoióforo, como se observó experimentalmente. El siguiente equilibrio de coextracción tiene lugar, si se asume que las especies que se originan son LNO_3^- y HC^+ :



donde las especies barradas están en la fase membrana, mientras que las otras especies químicas se encuentran en disolución acuosa.

La descripción de las características de la respuesta del sensor desechable se puede conseguir mediante el grado de desprotonación α ($[C]/C_0$) medido a partir de la absorbancia de la forma protonada del cromoióforo, la cual es la especie medible en la fase membrana, como una

absorbancia normalizada³⁸. El valor de α en la muestra acuosa está relacionado con la constante de equilibrio K_{e1} , la concentración de ionóforo C_L , la de cromoióforo C_C , y la actividad de NO_3^- y H^+ a través de la siguiente función respuesta:

$$K_{e1} = \frac{(1-\alpha)^2}{\alpha \cdot \left(\frac{C_L}{C_C} - (1-\alpha) \right) \cdot a_{\text{NO}_3^-} \cdot a_{\text{H}^+}} \quad (5.2)$$

En consecuencia, el ajuste del pH con un tampón apropiado permitiría determinar ópticamente la actividad de nitrato en disolución.

En ausencia de ionóforo en la membrana, ocurre un proceso de extracción de nitrato hacia la membrana debido a otro proceso de coextracción, de nitrato y protón, que es debido a la presencia del cromoióforo básico en la membrana, de acuerdo al siguiente proceso:



Análogamente, el proceso se caracteriza por una constante de coextracción K_{e2} según:

$$K_{e2} = \frac{1-\alpha}{\alpha \cdot a_{\text{H}^+} \cdot a_{\text{NO}_3^-}} \quad (5.4)$$

El ionóforo que se ha seleccionado, HNOPH, es un ciclofano rígido bicíclico¹⁵ que ha sido propuesto por el grupo de investigación de Anslyn y col., y se obtiene por condensación de 1,3,5-tris(aminometil)-2,4,6-trietilbenceno con 3 equivalentes de dicloruro de 2,6-piridinadicarbonil que origina un receptor con simetría C_3 con seis grupos amida que convergen en el centro de una cavidad enlazante¹⁵. La disposición prismática trigonal de este ionóforo es capaz de coordinarse con el sistema de electrones π del nitrato de geometría planar dentro de la cavidad de la caja formando un complejo 1:1³(Figura 5.1).

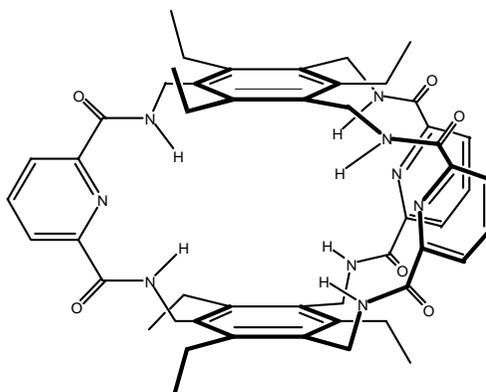


Figura 5.1. Estructura del receptor de nitrato HNOPH

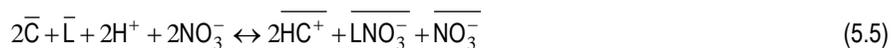
Como cromoióforo fue elegido el compuesto 1,2-benzo-7-(dietilamino)-3-(octadecanoilimino) fenoquinolina teniendo en consideración sus características de acidez y los requerimientos de pH del conjunto del proceso de reconocimiento. Para seleccionar el plastificante se llevó a cabo un estudio preliminar con diferentes plastificantes: tributilfosfato (TBP), *o*-nitrooctilfeniléter (NPOE), bis(2-etilhexil)sebacato (DOS), dioctilftalato (DOP) y tris(2-etilhexil)fosfato (TEHP), estudiando su respuesta frente a NO_3^- , Cl^- y SO_4^{2-} , así como su reversibilidad y tiempo de respuesta. Para ello, se prepararon membranas con cada uno de los plastificantes citados, manteniendo una composición fija del resto de los componentes. Todas las membranas contenían un 28% en peso de PVC, 70% en peso del plastificante correspondiente, 1,00 mg del cromoióforo y una cantidad de ionóforo de 1,50 mg, correspondientes a una relación molar 1:1 ionóforo/cromoióforo, todo ello disuelto en 1,00 mL de THF. Con 15 μL de cada cóctel se prepararon las diferentes membranas. A continuación, se puso cada una de las membranas en contacto con disoluciones 0,01 M de NO_3^- , Cl^- y SO_4^{2-} , respectivamente, a pH 4,0 y se registró la variación de absorbancia a 660 nm.

De los resultados obtenidos, se concluyó que el empleo de DOS y DOP daba lugar a respuestas pequeñas (entre un 12 % y 5% de la señal más alta) y muy similares para los tres aniones estudiados. Por el contrario, las membranas con NPOE son más selectivas, originando una respuesta mayor (75 %), que es reversible aunque lentamente. Los plastificantes que dieron lugar a sensores selectivos y totalmente reversibles y con señales altas fueron los ésteres fosfato (TBP 100% y TEHP 83%), sin

embargo, la respuesta de las membranas con TBP originaron las mayores y mas rápidas señales analíticas, por lo que TBP fue el plastificante seleccionado para los siguientes experimentos.

Como indica el esquema de coextracción, la respuesta del sensor desechable depende de la actividad protónica. Un incremento en la actividad protónica desplaza cuantitativamente la respuesta a menores actividades de nitrato (Figura 5.2.A), pero al mismo tiempo incrementa la coextracción de nitrato en membranas sin ionóforo (Figura 5.2.B), de acuerdo con lo que se predice en los dos modelos teóricos. Además, a bajos valores de pH, la respuesta de las membranas que contienen ionóforo no se desplaza cuantitativamente con el pH como predice la teoría, que indica que el producto de las actividades de nitrato e hidrogenoiones en disolución debe dar lugar a una curva respuesta teórica única. A valores de pH por debajo de 5,0, la función respuesta está desplazada a la derecha de la función respuesta teórica, lo que implica que los valores de α son menores de lo que la teoría predice, esto es, la fracción de cromoionóforo protonado es mayor de la esperada y con una mayor pendiente.

Por esta razón, concluimos que debe tener lugar un proceso de coextracción adicional sin ionóforo a actividades protónicas a partir de 10^{-5} en adelante. Este modelo de coextracción mixto en membranas conteniendo ionóforo tiene en consideración la coextracción de nitrato y protones, pero que no todo el nitrato debe ser complejado con el ionóforo, de acuerdo la siguiente ecuación:



Este proceso viene caracterizado por una constante de coextracción K_{e3} :

$$K_{e3} = \frac{(1-\alpha)^3}{\alpha^2 \cdot \left(\frac{C_L}{C_C} - (1-\alpha) \right) a_{NO_3^-}^2 \cdot a_{H^+}^2} \quad (5.6)$$

En efecto, como se puede ver en la Figura 5.2., las curvas respuesta para $pH \leq 5$ se ajustan a este modelo mixto, que da cuenta de la pendiente intermedia observada que se encuentra entre la de los modelos con y sin ionóforo.

A un valor de pH de 6 en adelante, el modelo de coextracción dado por la ec.1 funciona correctamente y el sistema sensor muestra la suficiente sensibilidad para determinar nitrato en aguas a la vez que se minimiza la coextracción sin ionóforo, ya que no se observa respuesta en membranas sin ionóforo para concentraciones de nitrato inferiores a $10^{-2}M$, en concordancia con las constantes de coextracción calculadas: K_{e1} : $9,06 \pm 0.04$ y K_{e2} : $6,90 \pm 0.08$.

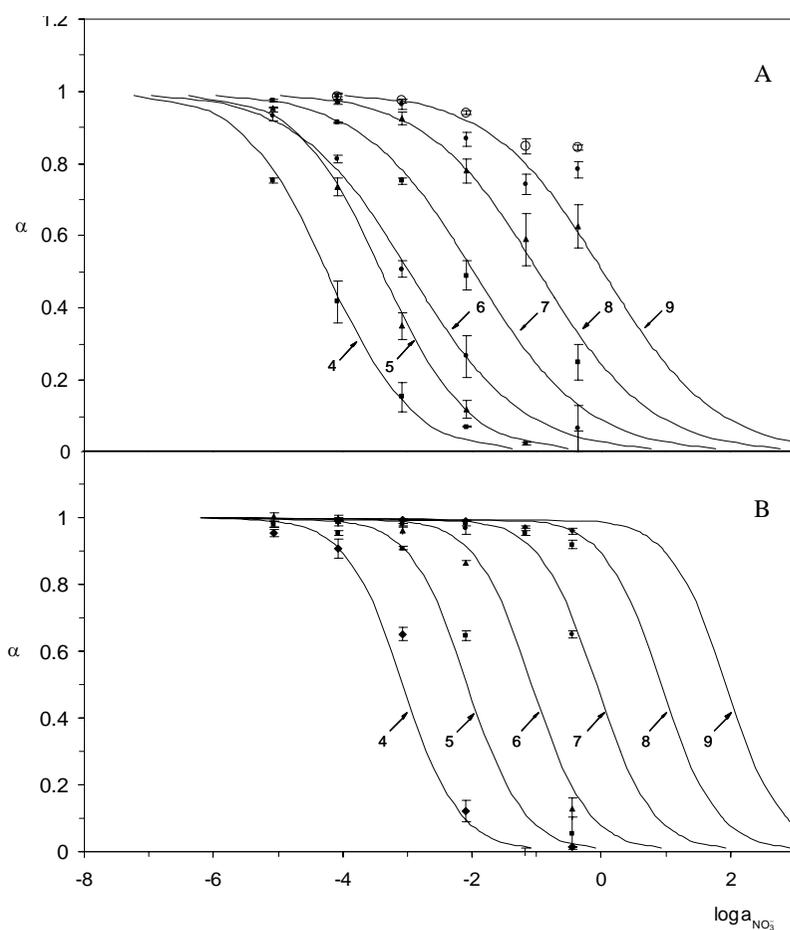


Figura 5.2. Efecto del pH en la respuesta del sensor a pH = 4,0; b: pH = 5,0; c: pH = 6,0; d: pH = 7,0; e: pH = 8,0; f: pH = 9,0. A: con ionóforo; B: sin ionóforo. La curva de círculos abiertos en la parte superior de la figura corresponde a la respuesta con nitrato de tetrametilamonio a pH 9.

Adicionalmente, la pendiente para sensores desechables conteniendo ionóforo es la mitad que para sensores que no lo contienen, tal como predicen los modelos, lo que desplaza, en este caso, el rango dinámico a menores concentraciones de nitrato. Para valores de pH mayores de 7,0, la respuesta a nitrato disminuye debido a la baja concentración protónica existente, por lo que se seleccionó un pH de 6,0 para la realización del resto de los experimentos. Además de que a ese pH se minimiza la señal debida al modelo sin ionóforo, como se ha dicho.

De la distancia horizontal de las dos curvas respuesta a media altura, mitad de protonación, obtenidas a pH 6 para membranas con y sin ionóforo, es posible estimar la constante de formación del complejo de nitrato con HNOPH dentro de la fase membrana polimérica, utilizando el procedimiento propuesto por Bakker et al³⁹. Aceptamos las suposiciones allí indicadas y suponemos que la complejación con ionóforo, formando un complejo 1:1, es el proceso que prevalece a este valor de pH. El valor encontrado ($\log \beta_{\text{LNO}_3^-} = 3.8 \pm 0.1$), aunque no es muy alto, es mayor que el comunicado para el mismo complejo en disolución con disolventes de polaridad creciente. En concreto, ha sido descrito un valor de 2,48 utilizando una valoración con ¹H NMR en CD₂Cl₂/CD₃CN (25:75 v/v) como disolvente³ (constante dieléctrica estimada: 31; constante dieléctrica del plastificante TBP: 8), como es usual considerando la diferente energía libre de solvatación del nitrato en cada disolvente.

A valores altos de pH y altas concentraciones de nitrato, se observa una fuerte desviación de la respuesta teórica predicha por el modelo para membranas con ionóforo (Fig. 5.2.A), observándose altos valores de α experimental y, por tanto, baja protonación del cromoionóforo básico. Esto se puede explicar considerando que dado que la actividad protónica a pH básico es baja, la posibilidad de protonación del cromoionóforo necesaria para contrarrestar la complejación de nitrato en la membrana es también baja, y en consecuencia, es extraído el contraión presente en disolución, en este caso el potasio. Este comportamiento permite la extracción de nitrato, pero origina una interferencia catiónica. Tal comportamiento no es muy común en optodos, pero ha sido observado en algunas ocasiones, como en el caso de un sensor para cloruro basado en un ionóforo [9]mercuracarborandano-3⁴⁰. Para comprobar esta interferencia catiónica se han llevado a cabo experimentos análogos en los que se ha sustituido el potasio como contraión de nitrato por el más lipofílico tetrametil amonio, comprobándose como la curva obtenida en esta ocasión difiere aún más

de la teórica, con lo que queda confirmada esa interferencia catiónica (ver en Figura 5.2.A la curva con puntos vacíos).

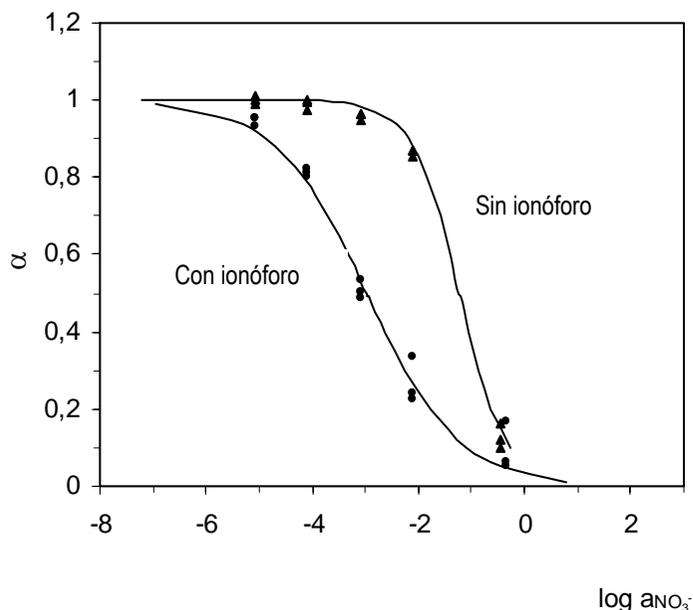


Figura 5.3. Curvas teóricas y experimentales obtenidas a pH 6, para el sensor desechable con ionóforo y sin ionóforo.

El esquema que hemos usado para el desarrollo de un sensor desechable para nitrato no necesita el uso de aniones lipofílicos cuya proporción frente al ionóforo suele influir bastante en la selectividad⁴¹. Por esta razón, la influencia del ionóforo sobre la membrana se evaluó como una relación ionóforo/cromoionóforo (C_I/C_C), manteniendo para ello una adecuada cantidad fija de cromoionóforo de manera que se minimice el error fotométrico en la medida de la absorbancia.

Para realizar este estudio se prepararon series de disoluciones de perclorato, nitrato, yoduro, bromuro, cloruro, con seis niveles de actividad diferentes en cada serie: $1 \cdot 10^{-5}$, $1 \cdot 10^{-4}$, $1 \cdot 10^{-3}$, $1 \cdot 10^{-2}$, $1 \cdot 10^{-1}$ y 1 M y con el valor de pH ajustado a 6.0 con una disolución reguladora de dihidrogeno fosfato/monohidrógeno fosfato, siendo la concentración de este tampón $2 \cdot 10^{-2}$ M en la disolución final.

Se analizó cada serie con una misma membrana, efectuando tres réplicas por serie. Cada membrana se introdujo durante 6 minutos para asegurar la consecución del equilibrio y, a continuación, se midió la absorbancia y se establecieron las funciones α vs $\log a_{\text{NO}_3^-}$, lo que permitió calcular los coeficientes de selectividad.

El coeficiente selectividad está directamente relacionado con α y gráficamente se corresponde a la distancia que separa las funciones respuesta del analito y del interferente. En esta Memoria de Doctorado se han determinado los coeficientes de selectividad de modo matemático, utilizando la ecuación:

$$K_{I^{v-}, J^-}^{\text{opt}} = \left(\frac{\alpha \cdot a_{\text{H}^+}}{1 - \alpha} \right)^{z-v} \cdot \frac{K_{J^{z-}}}{K_{X^{v-}}} \frac{\left(\frac{C_L}{C_C} - (1 - \alpha) \frac{q}{z} \right)^q \cdot z \cdot C^{q-1}}{\left(\frac{C_L}{C_C} - (1 - \alpha) \frac{p}{v} \right)^p \cdot v \cdot C^{p-1}} \quad (5.7)$$

donde v y p son la carga y la estequiometría el anión principal (i) y z y q las del anión interferente(j). Para calcular este coeficiente de selectividad fue necesario estudiar por separado el comportamiento y respuesta para cada uno de los iones, para luego extraer de esos datos experimentales los parámetros de la ecuación (5.7)

Como puede observarse en la Figura 5.5, un incremento en la relación C_L/C_C implica, como predice el anteriormente mencionado modelo, un desplazamiento de la función respuesta hacia la izquierda y un ligero incremento en la pendiente de la curva (Figura 5.5). Por esta razón, aunque los coeficientes de selectividad entre los principales iones interferentes ensayados, ClO_4^- , I^- , Br^- , Cl^- se incrementan ligeramente con la relación molar ionóforo:cromoionóforo (C_L/C_C) (Figura 5.4), se selecciona una relación 1:1 debido a la menor pendiente de la función respuesta, que hace que el rango dinámico para nitrato sea mayor. Por esta razón, y también dado que el aumento de la proporción de ionóforo implica además un mayor costo, es por lo que finalmente se decide seleccionar una relación C_L/C_C de 1:1.

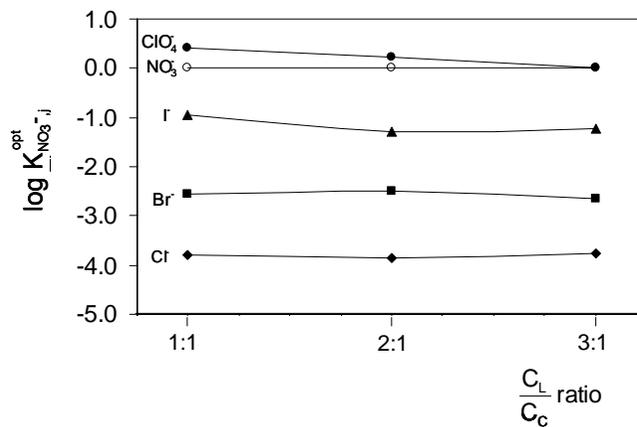


Figura 5.4. Variación de la selectividad del sensor en función de la relación molar ionóforo/cromoionóforo

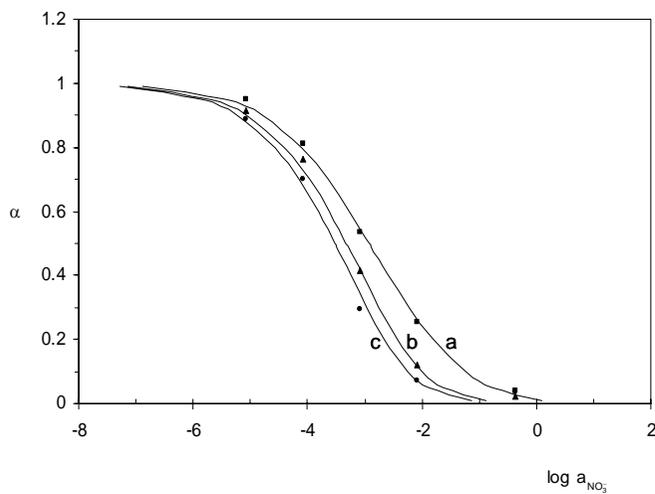


Figura 5.5. Curvas sigmoidales teoricas para diferentes relaciones molares ionóforo: cromoionóforo: a) 1:1, b) 2:1, c) 3:1.

El porcentaje de plastificante en la membrana ha mostrado tener muy poca influencia sobre la selectividad. El estudio se realiza variando el porcentaje de TBP en el cóctel, desde 50% hasta un

80%, manteniendo constante la masa final del cóctel.(45,25 mg). Esto implica el ir bajando la cantidad de PVC al ir subiendo la de TBP, al estar ambas relacionadas.

Del mismo modo que se ha hecho para optimizar la relación ionóforo:cromoionóforo, se prepararon series de disoluciones de perclorato, nitrato, yoduro, bromuro, cloruro, con seis niveles de actividad diferentes en cada serie: $1 \cdot 10^{-5}$, $1 \cdot 10^{-4}$, $1 \cdot 10^{-3}$, $1 \cdot 10^{-2}$, $1 \cdot 10^{-1}$ y 1 M y con el pH ajustado a 6.0 con una disolución reguladora dihidrogeno fosfato/monohidrógeno fosfato. Se analizó cada serie con una misma membrana, efectuando tres réplicas por serie. Para ello, cada membrana se introdujo durante 6 minutos para asegurar la consecución del equilibrio y, a continuación, se midió la absorbancia y se establecieron las funciones α vs $\log a_{\text{NO}_3^-}$, lo que permitió calcular los coeficientes de selectividad. Como se puede ver en la Figura 5.6 los coeficientes de selectividad en todos los casos son muy similares, no existiendo diferencias significativas en ningún porcentaje.

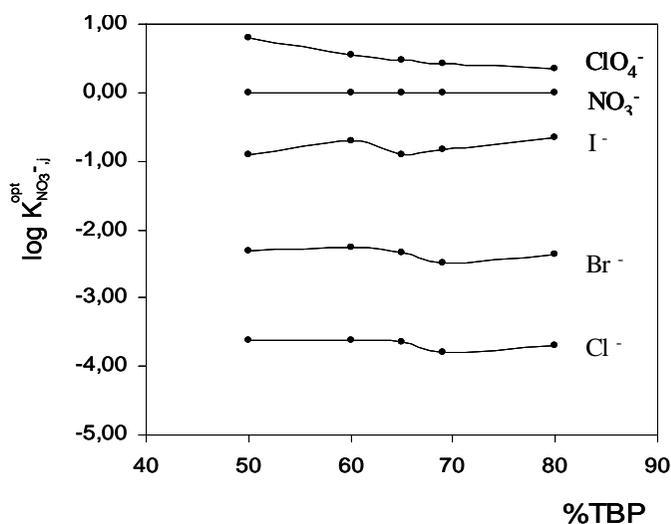


Figura 5.6. Variación de la selectividad del sensor, en función de la proporción de TBP.

Dado que no hay influencia en la selectividad, para seleccionar el porcentaje mas adecuado de plastificante, se estudio además el tiempo de respuesta y las propiedades físicas del sensor

desechable. El tiempo de respuesta en alcanzar el equilibrio ($t_{95\%}$) se midió con diferentes membranas para una concentración intermedia de nitrato de concentración, $1 \cdot 10^{-4}$ M. En la siguiente Tabla 5.1 se puede comprobar que un 65% de porcentaje de plastificante es el que permite un mayor incremento de la señal para un tiempo constante de 5 minutos.

Tabla 5.1. Porcentaje de equilibrio alcanzado en función de la proporción de TBP en la membrana.

TBP %	% Reacción a 5 min.
50	73,2
60	84,6
65	87,7
70	85,9
80	84,1

Respecto a las propiedades físicas de la membrana se observa que en los sensores que contienen un porcentaje de TBP inferior o igual al 50%, la zona activa no se adhiere al soporte plástico o bien la señal es inestable o muestra mucho ruido. Para porcentajes iguales o superiores al 70%, empeoran las propiedades físicas de la membrana, pues son menos homogéneas, de poco espesor y aumenta el tiempo de secado durante la preparación. Se eligió un valor del 65% de TBP como valor de compromiso.

Para calcular los coeficientes de selectividad del sensor desechable, se obtuvieron las curvas respuesta para diferentes aniones empleando sensores preparados tanto con ionóforo como sin ionóforo. Para ello, se han preparado tres sensores para cada serie de cada anión a estudiar, que se han introducido durante 6 minutos, en disoluciones de pH 6, de concentración comprendida entre 1 y 1×10^{-5} M del anión correspondiente. Estas disoluciones se han preparado de los siguientes 10 aniones: NO_3^- , SO_4^{2-} , HCO_3^- , I^- , Br^- , Cl^- , ClO_4^- , SCN^- , NO_2^- y CH_3COO^- .

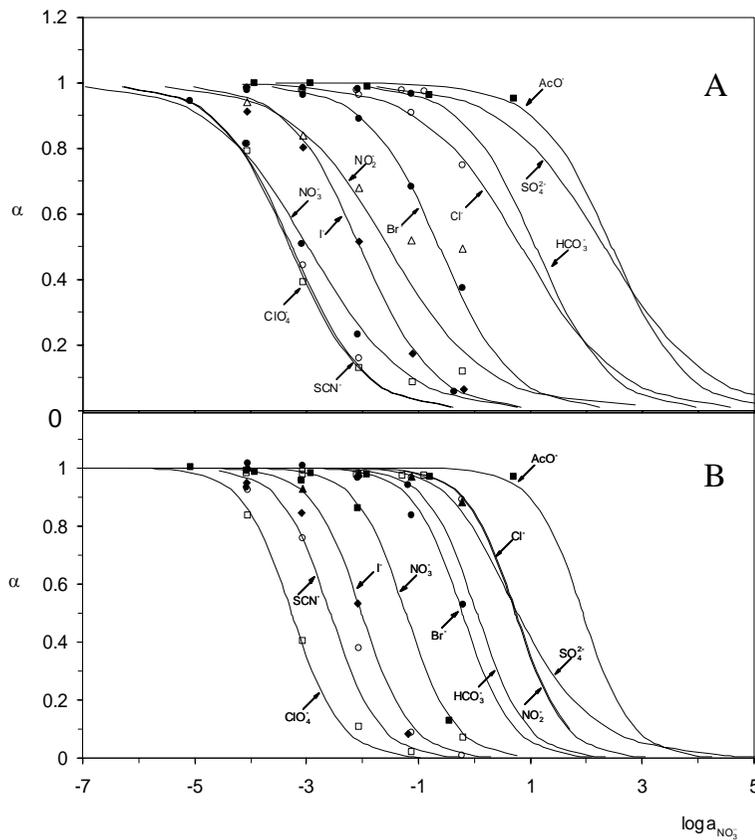


Figura 5.7. Selectividad del sensor de nitrato a pH 6,0. A: membranas con ionóforo. Las líneas continuas son las curvas respuesta teóricas predichas por la ecuación 5.2 para nitrato, nitrito y cloruro, y predichas por la ecuación 5.6 para el resto de aniones. B: Membranas sin ionóforo. Las líneas continuas se corresponden con las curvas respuesta teóricas predichas por la ecuación 5.5

Los resultados obtenidos usando membranas sin ionóforo se ajustan a la curva teórica descrita por la ecuación 5.4, pero este no es el caso para la mayoría de los aniones estudiados usando membranas con ionóforo, en los que se observa que la pendiente de las curvas es sistemáticamente mayor que la predicha por la ecuación 5.2, pero menor que la indicada por la ecuación 5.4. Nosotros suponemos que la constante de formación del complejo para la mayoría de los aniones es muy

pequeña, como puede deducirse de la posición de la curva del anión primario, nitrato, respecto de las curvas de los interferentes y del bajo valor de la constante de nitrato antes discutida. Como consecuencia, el equilibrio debido a la formación del complejo no puede estar muy desplazado por lo que una simple coextracción de aniones, gobernada por la lipofilidad de estos, podría tener lugar simultáneamente.

El uso de una ecuación como es la ec. 5.6 correspondiente al que hemos denominado anteriormente modelo mixto, permite ajustar los valores experimentales de α para la mayoría de los interferentes, excepto para cloruro y nitrito, como se puede ver en la Figura 5.7. En el caso de nitrito hay una fuerte desviación del modelo a altas concentraciones de nitrito.

La selectividad óptica para aniones de nitrato, medida por la constante de selectividad $K_{NO_3^-,j}^{opt}$, a pH 6, que se mide usando el método de disoluciones separadas (SSM), sigue la serie de Hoffmeister para las membranas que no contienen ionóforo: $ClO_4^- > SCN^- > I^- > NO_3^- > Br^- > HCO_3^- > NO_2^- \cong Cl^- \cong SO_4^{2-} > CH_3COO^-$ con un cambio en el orden usual para $Cl^- > HCO_3^- > CH_3COO^-$.

En presencia de ionóforo, el desplazamiento de la reacción es mayor, una idea apoyada por el incremento observado en la absorbancia debido a la forma protonada del cromoionóforo (ver Figura 5.7). Adicionalmente, la secuencia de selectividad con ionóforo cambia a: $ClO_4^- \cong SCN^- > NO_3^- > I^- > NO_2^- > Br^- \cong Cl^- > SO_4^{2-} > HCO_3^- > CH_3COO^-$, incrementándose la selectividad frente a nitrato, debido a la interacción selectiva entre el ciclofano y nitrato, lo cual es consistente con los datos que han sido previamente publicados en bibliografía.^{3,15}

En la Tabla 5.2. se observan los diferentes valores de $K_{NO_3^-,j}^{opt}$ encontrados. La escasa selectividad observada para acetato es particularmente sorprendente comparándola con la selectividad para acetato encontrada para el mismo ionóforo en mezclas de disolventes orgánicos (CD_2Cl_2/CD_3CN (25:75 v/v)) donde las constantes de asociación son de 770 y 300 M^{-1} para acetato y nitrato, respectivamente. Sin embargo, otros ionóforos conteniendo agrupaciones amida calix[4]areno muestran una respuesta similar, así se encuentran valores de 370 y 200 M^{-1} para los mismos iones en acetona- d_6 ⁴². En otros casos, la constante de asociación de ionóforos formadores de enlace de

hidrógeno con nitrato es mayor que para acetato, este es el caso de ionóforo complejos Pt (II) nicotinamida (K_{a1} : 230 M^{-1} ; K_{a2} : 491 M^{-1} para acetato en $\text{CD}_3\text{CN}/\text{DMSO-d}_6$ 3+1 v/v; K_{a1} : 562 M^{-1} ; K_{a2} : 132 M^{-1} para nitrato en CD_3CN)⁴³, aunque la diferencia es mucho mayor en nuestro caso.

Tabla 5.2. Coeficientes de selectividad $K_{\text{NO}_3, \text{J}}$ para diferentes aniones con ionóforo y sin ionóforo.

Anión	Con Ionóforo	Sin ionóforo
SCN ⁻	$0,3 \pm 0,08^*$	$1,4 \pm 0,07$
ClO ₄ ⁻	$0,3 \pm 0,13$	$2,04 \pm 0,02$
NO ₃ ⁻	0	0
I ⁻	$-0,97 \pm 0,01$	$0,78 \pm 0,02$
NO ₂ ⁻	$-2,4 \pm 0,13$	$-2,0 \pm 0,12$
Br ⁻	$-2,3 \pm 0,13$	$-0,98 \pm 0,05$
Cl ⁻	$-3,8 \pm 0,12$	$-1,96 \pm 0,01$
HCO ₃ ⁻	$-4,0 \pm 0,12$	$-1,26 \pm 0,01$
AcO ⁻	$-5,4 \pm 0,13$	$-3,5 \pm 0,02$
SO ₄ ²⁻	$-5,3 \pm 0,13$	$-1,99 \pm 0,02$

En la Figura 5.8 se muestra la respuesta del sensor desechable a actividades de nitrato en el rango $2,59 \cdot 10^{-1}$ y $8,37 \cdot 10^{-7}$ M en actividades ($0,5$ y $1 \cdot 10^{-6}$ M en concentraciones) para un pH de 6, junto con la función de respuesta teórica usando la ecuación 5.2 para una estequiometría ionóforo/nitrato, $p=1$ y 2.

El efecto de la estequiometría sobre la curva respuesta teórica para este caso es pequeño, dificultando una clara distinción entre diferentes estequiometrías en la membrana. Hemos supuesto, de acuerdo con los estudios de Anslyn y al.³ que tiene lugar una estequiometría 1:1 en la membrana. El ajuste por mínimos cuadrados de los puntos experimentales, en la zona lineal de máxima pendiente (para 8 niveles de concentración diferentes y 9 réplicas de cada una) nos permite calcular un valor de $\log K_{e1}$ de $9,06 \pm 0,04$.

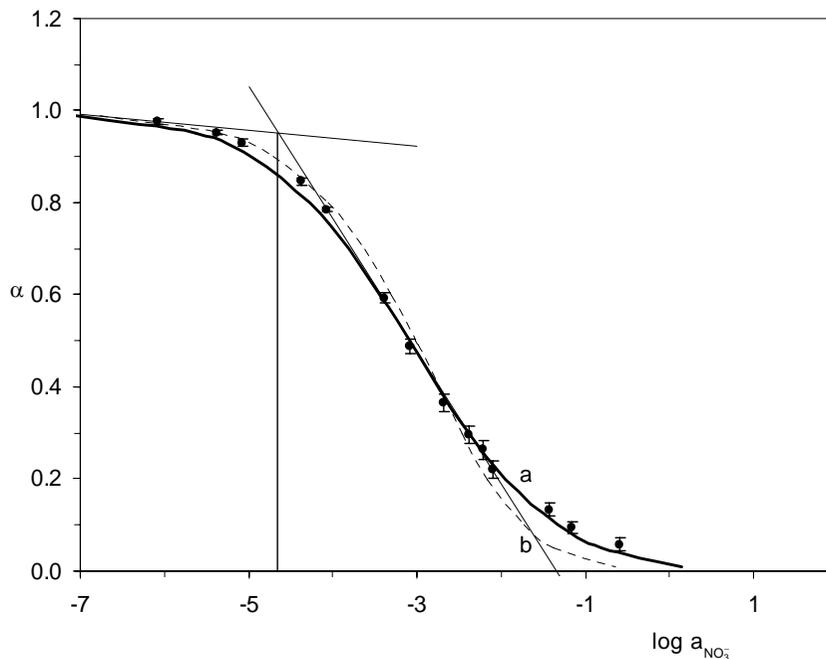


Figura 5.8. Estequiometría de la reacción de intercambio. Curvas teóricas: a : $p=1$; b: $p= 2$.

4. Caracterización analítica y aplicaciones

El rango de medida de un sensor desechable basado en optodos de membrana tridimensional que presentan una función respuesta de forma sigmoideal, ha sido definido de diferentes formas: (i) a partir de la relación lineal en el centro de la función respuesta de modo tal que la pendiente no se desvíe mas de un 1 o 0,1 % de su valor máximo⁴⁴ o que la pendiente no disminuya en menos de un factor de 2 comparado con su valor máximo³⁸. (ii) teniendo en cuenta el comportamiento no lineal de las actividades entre el límite superior e inferior del rango de medida^{32;38}, lo que depende de la definición de límite de detección^{32;37;45}. En este caso, la relación lineal en la mitad de la función respuesta sigmoideal definida por medio de un test de fallo de ajuste, se usa como rango de medida, y la intersección de la función de calibrado lineal y la función lineal ajustada en la zona de mínima pendiente se emplea como límite de detección.

Para caracterizar el comportamiento analítico del sensor desechable, se han preparado dos series de disoluciones patrón, una en la zona de máxima pendiente (8 patrones, 9 réplicas de cada uno), en un rango de concentraciones comprendido entre $2,20 \times 10^{-5}$ y $8,09 \times 10^{-3}$ M en actividades ($2,62 \times 10^{-5}$ y $1,00 \times 10^{-2}$ M en concentraciones), y otra serie de disoluciones patrón en la zona de mínima pendiente de menor actividad (3 patrones, 9 réplicas de cada), entre $8,37 \times 10^{-7}$ y $2,20 \times 10^{-5}$ M en actividades ($1,00 \times 10^{-6}$ y $2,62 \times 10^{-5}$ M en concentraciones).

La linealidad de ambas series, como se ha explicado anteriormente, fue comprobada por aplicación de un test de fallo de ajuste⁴⁶ y las funciones lineales que se obtuvieron fueron, respectivamente:

$$\alpha = -0,3868 - 0,2875 \log a_{\text{NO}_3^-} \quad (5.9)$$

$$\alpha = 0,8724 - 0,0172 \log a_{\text{NO}_3^-} \quad (5.10)$$

El límite de detección se calculó por la intersección de ambas funciones, resultando 0,022 mM en actividades (0,026 mM en concentraciones) (Figura 5.8). El límite superior del rango de medida se obtuvo por la intersección de la función de calibrado con el eje de abscisas (Figura 5.8); el valor obtenido fue 45,15 mM en actividades (62,68 mM en concentraciones) Así, el rango de medida para nitrato se encuentra entre 22 μM y 45,15 mM en actividades (26 μM y 62,68 mM en concentraciones o 1,63 y 3886 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$).

Tabla 5.3. Límites inferior y superior para el sensor de nitrato.

	Límite de detección	Límite superior
Actividades	0,022 mM	45,15 mM
Concentraciones	0,026 mM	62,68 mM

La precisión fue calculada como desviación estándar relativa (DER) para el $\log a_{\text{NO}_3^-}$, a tres niveles de actividad de nitrato 0,08, 2,07, 8,09 mM y diez réplicas de cada uno, realizándose un doble estudio. Por un lado, empleando siempre el mismo sensor, o sea un estudio intramembrana; y por otro

lado empleando siempre un sensor diferente en cada réplica, o lo que llamamos estudio intermembrana o reproducibilidad sensor a sensor. En las Tablas 5.4 y 5.5 se muestran los valores obtenidos que indican una precisión muy buena considerando que se trata de un método rápido de análisis.

Tabla 5.4. Reproducibilidad intramembrana

$a_{\text{NO}_3^-}$ (mM)	DER (%)
0,08	1,68
2,07	1,39
8,09	2,77

Tabla 5.5. Reproducibilidad intermembrana

$a_{\text{NO}_3^-}$ (mM)	DER (%)
0,08	0,79
2,07	3,68
8,09	6,25

El sensor desechable que hemos descrito trabaja de un modo reversible, lo que significa que se puede reutilizar después de acondicionarlo con NaOH 0,02 M. Se ha estudiado la reusabilidad, chequeándola a partir de una serie de membranas, que fueron medidas una vez al día con una disolución de nitrato en el medio de la función de calibrado y conservadas en sitio seco y en ausencia de luz; comprobándose que se puede reutilizar una misma tira hasta 3 semanas. El tiempo de vida del sensor desechable, ha sido comprobado de una manera similar y protegido de la luz y humedad excesiva, siendo al menos de mes y medio. La Tabla 5.6 muestra estos y otros parámetros analíticos

La eficiencia analítica del sensor desechable que hemos descrito es mejor que la de otros sensores desechables ópticos como electroquímicos, que han sido descritos hasta la fecha. Por ejemplo, los dispositivos amperométricos de capilar relleno, trabajan entre 10^{-3} y 10^{-5} M²³, mientras que los sensores desechables potenciométricos trabajan en los rangos 10^{-2} a $2,5 \cdot 10^{-5}$ M, 10^{-2} - 10^{-5} M, y 10^{-2} - 10^{-4} M²⁵. Sensores ópticos desechables comercializados funcionan en el rango $4,8 \cdot 10^{-5}$ y $3,6 \cdot 10^{-3}$ M (Reflectoquant²⁹) y $8,1 \cdot 10^{-5}$ a $8,1 \cdot 10^{-3}$ M (Nitrachek⁴⁷).

Tabla 5.6. Parámetros analíticos

Parametro analitico		Valor; S
ordenada		-0,387; 0,010
pendiente		-0,288; 0,003
Nivel de probabilidad % (test de fallo de ajuste)		5,6
Linear range (mg/L)		1,63 – 3886
Detection limit (mg/L)		1,63
DER (%) ^a Intramembrana	1,0 · 10 ⁻⁴ M	1,68
	2,5 · 10 ⁻³ M	1,39
	1,0 · 10 ⁻² M	2,77
DER (%) ^a sensor-a-sensor	1,0 · 10 ⁻⁴ M	0,79
	2,5 · 10 ⁻³ M	3,68
	1,0 · 10 ⁻² M	6,25
Parámetro analítico (nm)		Absorbancia, 660
Tiempo de respuesta (min)		5
Coste (€/tira)		0,04
Tiempo de vida (semanas)		6
Reutilización (semanas)		3

a: DSR para $\log a_{\text{NO}_3^-}$

Los valores de coeficiente de selectividad $K_{\text{NO}_3^-, \text{j}}^{\text{opt}}$ que hemos obtenido usando membranas con la composición óptima indican que el sensor desechable descrito es del orden de $6,3 \cdot 10^3$ veces más selectivo para nitrato que para cloruro, $1,0 \cdot 10^4$ veces mas selectivo que carbonato y $2,0 \cdot 10^5$ veces mas selectivo que sulfato. Aunque el concepto de coeficientes de selectividad requerida³⁶ no es manifiestamente apropiado para especies contaminantes como es el nitrato, cuyo nivel cambia dependiendo de las circunstancias, fue aplicado como un ejemplo a aguas subterráneas del área de Granada, empleando el valor promedio más alto y el más bajo de esos aniones⁴⁸ y un máximo error

tolerable del 5% para la determinación de nitrato. Los valores de selectividad obtenidos para el sensor desechable cumplen con los requerimientos de selectividad ($K_{NO_3,j}^{opt}$ requerida.: -3.5 (Cl⁻); -3.4 (SO₄²⁻); -3.7 (HCO₃⁻)) para el ensayo de nitratos en aguas del área seleccionada (447 mg L⁻¹ Cl⁻; 2.109 mg L⁻¹ SO₄²⁻; 583 mg L⁻¹ HCO₃⁻; 5 mg L⁻¹ NO₃⁻).

Para estudiar la utilidad del sensor desechable propuesto para la determinación de nitrato, fue aplicado a aguas de diversa procedencia (mineral, fuente, grifo) del área de Granada con diferentes contenidos en nitrato. Los resultados han sido validados por comparación con un método voltamperométrico de referencia basado en una onda catalítica de U (VI)⁴⁹. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 5.7 donde se muestran los resultados correspondientes al valor medio de 3 réplicas para cada muestra con cada uno de los métodos, la desviación estándar de estas medidas y el valor P del test de comparación de medias empleado. Como se observa no existe diferencia significativa entre las medias obtenidas utilizando el sensor y el método de referencia.

Tabla 5.7. Determinación de nitrato en diferentes tipos de agua, empleando como método de referencia la voltamperometría.

Tipo de muestra	Sensor desechable* (mg·L ⁻¹)	s	Método referencia* (mg·L ⁻¹)	s	Pval (%)
Agua del río Monachil (Monachil, Granada, España)	3,6	0,24	3,3	0,45	29,17
Agua del río Genil (Granada, España)	3,1	0,25	2,8	0,24	31,62
Agua de fuente (Granada, España)	27,3	0,63	29	2,0	20,42
Agua de fuente (Granada, España)	4,1	0,33	4,37	0,02	21,10
Agua de fuente (Haza Grande, Granada, España)	54	2,24	54	4,1	90,65
Agua de fuente (Zujaira, Granada, España)	62	2,78	61	3,57	59,95
Agua de fuente (La Peza, Granada, España)	2,92	1,49	2,7	17,26	39,00
Agua de pozo (Illora, Granada, España)	20,4	0,29	23	1,71	14,3
Agua de aljibe (Illora, Granada, España)	91,8	5,26	87,9	0,94	27,20
Agua de pozo (Valderrubio, Granada, España)	201	33,5	200	12,1	96,09

*tres replicas de cada muestra

5. Conclusiones

Se ha desarrollado un sensor óptico desechable empleando un sistema de reconocimiento receptor-huésped, basado en un ionóforo artificial para nitratos de simetría C_3 basado en amidas. Las múltiples interacciones de enlace de hidrógeno permiten un ajuste fino entre las energías libres de interacción nitrato-ionóforo y la de hidratación, puesto en práctica en una membrana transparente que trabaja por coextracción ofreciendo una señal analítica fácil de medir.

Hemos logrado preparar un sensor óptico de un solo uso muy simple, que por lo general son más complejos que los sensores electroquímicos, para un anión con carácter débilmente coordinante como es el nitrato. El patrón de selectividad encontrado cumple la mayoría de los requerimientos de selectividad para el análisis de nitrato en aguas naturales considerando el nitrato más que como un constituyente natural, como un contaminante con muy diferentes posibles niveles de concentración.

El sensor descrito hace posible el monitorizar nitrato *in situ* para muchas situaciones prácticas. Como ejemplos podemos señalar el control de calidad de aguas para mantener un nivel dentro de las regulaciones legales o ensayos de nitrato en savia de peciolo en plantas para determinar las necesidades de fertilización, con las ventajas de reducción de contaminación, perdidas y cambios relacionados con la recogida de muestras y reducción de costo. Es además respetuoso con el medioambiente y se ha estimado que tiene un tiempo de vida de un mes y medio cuando se protege de la luz en condiciones normales.

Las desventajas que presenta están relacionadas con el tiempo de respuesta, el cual en el formato desarrollado es aproximadamente de 5 minutos, debido a la difusión en el interior de la membrana polimérica, pero puede ser reducido con el uso de soportes porosos. La precisión puede ser mejorada con técnicas de producción en masa, la cual podría también recortar costes. El uso de diferentes técnicas de producción en masa y el desarrollo de instrumentación pequeña, portátil y operada con baterías, que podría permitir descentralizar los análisis, está ahora mismo bajo investigación.

6. Bibliografía

1. Beer, Paul D.; Gale, P. A. *Angew.Chem.Int.Ed.* 2001, 40, 486-516.
2. Gale, Philip A. *Coord.Chem.Rev.* 2003, 240, 191-221.
3. Bisson, Adrian P.; Lynch, Vincent M.; Monahan, Mary Katherine; Anslyn, Eric V. *Angew.Chem.Int.Ed.* 1997, 36, 2340-42.
4. Herges, Rainer; Dikmans, Anton; Jana, Umasish; Köhler, Felix; Jones, Peter G.; Dix, Ina; Fricke, Tom; König, Burkhard *Eur.J.Org.Chem.* 2002, 3004-14.
5. Bondy, Chantelle R.; Loeb, Stephen J. *Coord.Chem.Rev.* 2003, 240, 77-99.
6. Mason, Susan; Clifford, Thomas; Seib, Larry; Kuczera, Krzysztof; Bowman-James, Kristin *J.Am.Chem.Soc.* 1998, 120, 8899-900.
7. Hauser, P. C.; Litten, J. C. *Anal.Chim.Acta* 1994, 294, 49-56.
8. Mohr, G. J.; Lehmann, F.; Östereich, R.; Murkovic, I.; Wolfbeis, O. S. *Fresenius J.Anal.Chem.* 1997, 357, 284-91.
9. Koncki, R.; Glab, Stanislaw; Dziwulska, Joanna; Palchetti, I.; Mascini, M. *Anal.Chim.Acta* 1999, 385, 451-59.
10. Högg, G.; Steiner, G.; Cammann, K. *Sens.Actuators B* 1994, 19, 376-79.
11. Lumpp, R.; Reichert, J.; Ache, H. J. *Sens.Actuators B* 1992, 7, 473-75.
12. Hofmeister, F. *Arch.Exp.Pathol.Pharmakol.* 1888, 24, 247.

-
13. Schnebeck, Ralf-Dieter; Freisinger, Eva; Lippert, Bernhard *Angew.Chem.Int.Ed.* **1999**, *38*, 168-71.
 14. Dillip, K. Chand; Kumar, Biradha; Makoto, Fujita *Chem.Comm.* **2001**, *2001*, 1652-53.
 15. Niikura, Kenichi; Bisson, A. P.; Anslyn, E. V. *J.Chem.Soc.,Perkin Trans.2* **1999**, 1111-14.
 16. Benniston, A. C. *Encyclopedia of Supramolecular Chemistry*, Atwood, J. L.; Steed, J. W., Eds.; Bekker: 2004.
 17. United Nations Environment Programme (UNEP) Millennium. Report on the Environment, Global Environmental Outlook. 1999. London, Earthscan Publications.
 18. Bruning-Fann, C. S.; Kaneene, J. B. *Vet.Human.Toxicol.* **1993**, *35*, 521.
 19. EPA. National Primary Drinking Water Regulations. Internet . 2004.
 20. European Communities *Off.J.Eur.Comm.* **1998**, *L330*, 32-54.
 21. European Communities *Off.J.Eur.Comm.* **1991**, *L375*, 1-8.
 22. Moorcroft, M. J.; Davis, J.; Compton, R. G. *Talanta* **2001**, *54*, 785-803.
 23. Birch, B. J. and Burns, Ian William Patente WO 8804048 (1988)
 24. Fogg, A. G.; Scullion, S. Paul; Edmonds, Tony E.; Birch, Brian J. *Analyst* **1991**, *116*, 573-79.
 25. Knoll, M.; Cammann, K.; Dumschat, C.; Eshold, J.; Sundermeier, C. *Sens.Actuators B* **1994**, *21*, 71-76.

26. Lange, H., Rittersdorf, W., Rey, H. G., Werner, W., Rieckmann, P. Patente US 4,061,468(1977)
27. Amelin, V. G.; Kolodkin, I. S. *J.Anal.Chem.* 2001, 56, 182-87.
28. Jain, A. V.; Ross, P. F.; Carlson, M. P. *J.AOAC* 1999, 82, 9-15.
29. Merck. Reflectoquant™ Liquid Analysis System. 2004.
30. Morf, W. E.; Seiler, K.; Rusterholz, B.; Simon, W. *Anal.Chem.* 1990, 62, 738-42.
31. Metzger, Axel; Lynch, Vincent M.; Anslyn, Eric V. *Angew.Chem.Int.Ed.* 1997, 36, 862-65.
32. Seiler, K.; Simon, W. *Anal.Chim.Acta* 1992, 266, 73-87.
33. Capitán-Vallvey, L. F.; Fernández-Ramos, M. D.; Alvarez de Cienfuegos, P.; Santoyo-Gonzalez, F. *Anal.Chim.Acta* 2003, 481, 139-48.
34. Meier, P. C. *Anal.Chim.Acta* 1982, 136, 363-68.
35. Capitán-Vallvey, L. F.; Fernández-Ramos, M. D.; Alvarez de Cienfuegos, P. *Anal.Chim.Acta* 2002, 451, 231-41.
36. Bakker, E.; Simon, W. *Anal.Chem.* 1992, 64, 1805-12.
37. Lerchi, M.; Bakker, E.; Rusterholz, B.; Simon, W. *Anal.Chem.* 1992, 64, 1534-40.
38. Bakker, E.; Bühlmann, P.; Pretsch, E. *Chemical Rev.* 1997, 97, 3083-132.
39. Bakker, E.; Willer, M.; Lerchi, M.; Seiler, K.; Pretsch, E. *Anal.Chem.* 1994, 66, 516-21.

-
40. Ceresa, A.; Quin, Y; Peper, S.; Bakker, E. *Anal.Chem.* **2003**, *75*, 133-40.
 41. Zhang, W.; Jenny, L.; Spichiger-Keller, U. E. *Anal.Sci.* **2000**, *16*, 11-18.
 42. Sansone, Francesco; Baldini, Laura; Casnati, Alessandro; Lazzarotto, Marcio; Ugozzoli, Franco; Ungaro, Rocco *PNAS* **2002**, *99*, 4842-47.
 43. Chantelle, R. Bondy; Stephen, J. Loeb; Philip, A. Gale *Chem.Comm.* **2001**, *2001*, 729-30.
 44. Seiler, K.; Simon, W. *Sens.Actuators B* **1992**, *6*, 295-98.
 45. Bakker, E.; Willer, M.; Pretsch, E. *Anal.Chim.Acta* **1993**, *282*, 265-71.
 46. Analytical Methods Committee *Analyst* **1994**, *119*, 2363-66.
 47. Ijkelkamp. *Soil Analysis*. 2004.
 48. Castillo, A. *Estudio hidroquímico del acuífero de la vega de Granada*, 1 ed.; University of Granada-IGME: Granada, 1986.
 49. Hemmi, Hirotoishi; Hasebe, Kiyoshi; Ohzeki, Kunio; Kambara, Tomihito *Talanta* **1984**, *31*, 319-23.

CAPITULO 5

DESARROLLO DE UN SENSOR ÓPTICO DESECHABLE PARA CITRATO BASADO EN UN RECEPTOR SINTÉTICO TIPO GUANIDINIO

DESARROLLO DE UN SENSOR ÓPTICO DESECHABLE PARA CITRATO BASADO EN UN RECEPTOR SINTÉTICO TIPO GUANIDINIO

1. Introducción

Los sensores desechables pueden ser considerados como un tipo de métodos de ensayo para la obtención de información química de forma rápida, simple y económica. Existen muy diferentes aproximaciones para este tipo de dispositivos provenientes de diferentes campos, pero todos comparten la necesidad de sistemas analíticos rápidos que sean independientes de los requerimientos analíticos usuales. Los sensores desechables o de un solo uso son dispositivos miniaturizados autocontenidos con los reactivos incorporados en un formato seco que responden semicuantitativamente (tiras reactivas, varillas de ensayo y papeles de ensayo) o cuantitativamente al analito en una amplia variedad de situaciones, incluidos diagnósticos clínicos, medioambientales, diagnosis en el punto de cuidado médico (point-of-care) y terrorismo.

El ácido cítrico (ácido 2-hidroxi- 1,2,3-propanotricarboxílico) es un componente natural de diversas frutas como los cítricos y piñas y también se usa como un aditivo multifuncional en procesos de producción de diferentes alimentos debido a su poder acidificante y antibacteriano, además de su acción sinérgica con antioxidantes y su potencial como intensificador del sabor en zumos, refrescos y siropes. Además, el ácido cítrico se determina, junto con otros ácidos orgánicos, en bebidas, principalmente en vinos, por diferentes razones como son consistencia del producto, monitorización de la fermentación, autenticación de producto y determinación de calidad, control de procesos y detección de putrefacción¹. También es comúnmente usado el ácido cítrico en la industria farmacéutica debido a sus propiedades anticoagulantes y para la prevención del cálculo de riñón.

La determinación rutinaria de ácido cítrico se lleva a cabo por cromatografía líquida en fase inversa con detección UV o detección refractométrica², por cromatografía iónica³, electroforesis capilar⁴ o por técnicas FIA⁵.

Otro método muy común para la determinación de ácido cítrico en bioanálisis y análisis de alimentos es mediante ensayos enzimáticos⁶. Uno de los más usados está basado en la enzima citrato liasa la cual cataliza la transformación de citrato a oxalacetato y acetato, midiéndose espectrofotométricamente NADH. Estos ensayos enzimáticos son comercializados por diferentes compañías como R-Biopharm y su subsidiaria Enzytec y están reconocidos por diferentes autoridades internacionales de estandarización y regulación (ISO, AOAC, OIV, IFU, IDF, EN, DIN). Estos ensayos han sido puestos a punto en formato de placas de 96 micropocillos⁷. También ha sido empleado un esquema no enzimático para el sensado de citrato, basado en la fluorescencia de complejos ternarios de tetraciclina y europio con citrato e imagen (*imaging*) de tiempos de vida de fluorescencia⁸.

El reconocimiento molecular de analitos aniónicos mediante receptores neutros deficientes de electrones, o cargados positivamente, es un área interesante en química supramolecular que ha recibido una considerable atención⁹⁻¹¹. El ácido carboxílico, y por tanto el carboxilato, es un grupo funcional muy común en moléculas biológicas y orgánicas sintéticas, y han sido diseñados diversos enfoques para su reconocimiento basados en diferentes interacciones no covalentes, principalmente interacciones por enlace de hidrógeno e interacciones electrostáticas. Entre los receptores cargados se incluyen sales de amonio y sales de guanidinio, mientras que entre los receptores neutros se

encuentran ureas, tioureas, amidopiridinas, amidas y también existen receptores que incorporan centros metálicos¹².

Las sales de guanidinio son especialmente atractivas para reconocimiento de aniones en forma de Y como son los carboxilatos, debido a su peculiar forma de unión que se caracteriza por dos enlaces de hidrógeno paralelos además de la atracción electrostática¹¹. El grupo de investigación de Anslyn ha descrito un compuesto receptor trisguanidinio para el reconocimiento de citrato a través de una interacción complementaria tanto en geometría como en carga¹³. Este receptor ha sido usado para preparar dos ensayos de tipo competitivo para citrato¹⁴, fluorimétrico y espectrofotométrico, respectivamente, empleando en un caso la 5-carboxifluoresceína como sistema fluorescente para bebidas^{15;16} y naranja de xilenol y azul de metiltimol en el segundo caso¹⁷. Una ulterior modificación de este receptor guanidinio –la sustitución de un aminoimidazolio que lleva un grupo guanidinio por un complejo de Cu (II) de la 1,10-fenantrolina- ha sido utilizado para conseguir la preparación de un fluoróforo para citrato¹⁸.

En lo que conocemos, no se han descrito ni comercializado sensores desechables para la determinación de citrato. Nuestro objetivo fue desarrollar membranas hidrofóbicas que incorporasen estas sales de guanidinio para el reconocimiento selectivo de citrato en muestras acuosas utilizando el formato de sensor desechable. Con esta estrategia no es necesaria la adición de ningún disolvente orgánico como lo es en los ensayos homogéneos competitivos descritos^{15;17;18}.

2. Experimental

2.1. Reactivos

Disoluciones patrón (1M) fueron preparadas en agua a partir de sales sódicas de citrato, cloruro, (Sigma-Aldrich Química S.A., Madrid, España), benzoato (Merck, Darmstadt, Alemania) y sales potásicas de tartrato y fosfato (Sigma-Aldrich). La disolución tampón 0,1 M de pH 4,0 fue obtenida a partir de acetato sódico y ácido acético suministrados por Sigma (Sigma-Aldrich Química S. A., Madrid). Hidroioduro de 2-metiltio-2-imidazolina, trietilamina, metilcloroformiato, 1,3,5-trietilbenceno,

paraformaldehído, bromuro de hidrógeno al 30% en ácido acético, azida sódica y catalizador de paladio sobre carbón activo (calidad síntesis), fueron suministrados por Sigma todos ellos. Para la preparación de las membranas sensibles a citrato se utilizó cloruro de polivinilo de alto peso molecular (PVC), tributilfosfato (TBP), tris-(2-etilhexil) fosfato (TEHP), dioctilftalato (DOP), bis (2-etilhexil) sebacato (DOS), 2-nitrofeniloxiléter (NPOE) y tetrahidrofurano (THF), todos ellos adquiridos a Sigma-Aldrich. El cromoiónico 1,2-benzo-7-(dietilamino)-3-(octadecanoilimino) fenoxacina¹⁹ y el ionóforo 1,3,5-bencenotrimetanamina N,N',N''-tris(4,5-dihidro-1H-imidazol-2-il) 2,4,6-trietil trihidrocloruro¹³ (RCT) fueron sintetizados, purificados y caracterizados según viene descrito en el Anexo 1. Los soportes usados para preparar los sensores de un solo uso fueron láminas de poliéster tipo Mylar (Goodfellow, Cambridge, UK). Todos los reactivos empleados fueron de grado reactivo analítico, excepto aquellos empleados para síntesis, y todas las disoluciones acuosas se prepararon usando agua procedente de un sistema de purificación de osmosis reversa Milli-Ro 12 plus Milli-Q (Millipore, Bedford, MA).

2.2. Preparación de membranas desechables

Las membranas se fabricaron sobre un sustrato de poliéster empleando una técnica de recubrimiento giratorio. Para la fabricación de las membranas se prepara una mezcla pesando 35,83 mg (39,1 % p/p) de PVC, 53,75 mg (59 % p/p) de tributilfosfato, 0,963 mg (1,05 % p/p) de ionóforo RCT y 1,00 mg (1,09 % p/p) de cromoiónico en un vial de vidrio y disolviéndolos en 1,0 mL de una mezcla de tetrahidrofurano recientemente destilado y etanol (80/20 v/v). Los sensores desechables fueron preparados depositando 15 μ L de esta disolución sobre una lámina de poliéster de 14 mm \times 45 mm \times 0,5 mm de espesor con ayuda de un sistema centrífugo de preparación de membranas²⁰ rotando a 180 rpm. Tras dejar girando durante 10 segundos, se extrajo la membrana del sistema centrífugo de preparación de membranas y se dejaron secar en un desecador con atmósfera saturada de tetrahidrofurano durante 60 minutos a temperatura ambiente. La zona activa del sensor desechable es una película circular de 6 mm de diámetro, transparente, de color rojo, con un espesor calculado de 4,5 μ m aproximadamente y una concentración de ionóforo y cromoiónico en el sensor una vez preparado de 18,7 mmol kg^{-1} , respectivamente.

2.3. Sistema de medida

La respuesta del sensor desechable preparado se evaluó por adición de 8 mL de la disolución problema en un tubo de plástico de polietileno de 10 x 1,5 cm junto con 2 mL de una disolución reguladora 0,1M de ácido acético /acetato sódico de pH 4,0. A continuación se introduce en el tubo el sensor desechable para citrato durante cuarenta segundos y sin agitación. Después de esto, la membrana se saca de la disolución y se sacude para eliminar las gotas de disolución que la puedan mojar; tras lo cual se mide la absorbancia a 660 nm en un espectrofotómetro Hewlett Packard de diodos en fila (modelo 8543; Nortwalk, CT, USA) empleando un soporte metálico de 44 mm de alto y 12 de fondo, pintado en negro mate que se coloca en el compartimento de cubetas²⁰. Para corregir la absorbancia de fondo, las medidas se realizaron frente a una tira de poliéster tipo Mylar. Todas las medidas se realizan a temperatura ambiente y las membranas desechables no fueron acondicionadas antes de su uso. Los valores de absorbancia máxima y mínima, correspondientes con la forma completamente protonada (A_{HC+}) y desprotonada (A_C) del cromoióforo que son necesarias para calcular los valores de α , fueron medidas condicionando un sensor desechable en HNO_3 10^{-2} M y $NaOH$ $2 \cdot 10^{-2}$ M, respectivamente. Las actividades se calcularon de acuerdo con la ecuación de dos parámetros de Debye-Hückel²¹. La constante de coextracción fue calculada de acuerdo a lo dicho en un trabajo previo²¹, empleando los valores en la zona de máxima pendiente de la función respuesta experimental para citrato, la cual nos da más información y menor error. Los coeficientes de selectividad $K_{cit,i}^{opt}$ fueron determinados con el método de las disoluciones separadas de iones interferentes (SSM) como la distancia horizontal entre la curva respuesta obtenida separadamente para un valor dado de $\alpha = 0,5$ ²². Los programas de software empleados para el tratamiento de los datos y el ajuste de los datos experimentales a la función respuesta teórica han sido: Statgraphics Plus Versión 6.0, STSC. Inc., de Statistical Graphics Corp., USA, 1993 y GraphMatica para Win32 v1.60d, 1998 editado por K. Hertzler y adaptado por J. Garrido.

2.4. Procedimiento para la curva de calibrado y muestras

Se toma una alícuota de 8 mL de una disolución patrón conteniendo citrato en actividades comprendidas entre $4,17 \cdot 10^{-4}$ y $1,77 \cdot 10^{-2}$ M se coloca en un tubo de polietileno de 10x1,5 cm de polietileno junto con 2,0 mL de una disolución reguladora 0,1M ácido acético /acetato sódico de pH 4.0. A continuación, se introduce en el tubo el sensor desechable durante cuarenta segundos y sin agitación, procediendo como hemos descrito en el apartado anterior.

Para el análisis de citrato en refrescos, un volumen de 100 mL de la bebida carbonatada se desgasifica a vacío y agitación magnética, si es necesario, aplicando a continuación el procedimiento general descrito. Para el caso de fármacos, se pesa una adecuada cantidad del producto (habitualmente entre 0,02 y 7 g), se disuelve en agua con agitación durante 10 minutos, sometiendo a la muestra al procedimiento normal. En ningún caso fue necesario realizar ninguna filtración previa de la muestra. Para el procedimiento de referencia, fue necesario realizar una filtración de la muestra a través de un filtro Millipore de 0,45 μ m previamente al análisis.

3. Resultados y discusión

El receptor o ionóforo para citrato utilizado aquí es el 1,3,5-bencenotrimetanamina N,N',N''-tris(4,5-dihidro-1H-imidazol-2-il) 2,4,6-trietil trihidrocloruro, RCT, un receptor preorganizado propuesto por el grupo de investigación de Anslyn. Consiste en un núcleo central que es el 2,4,6-trietilbenceno, que está sustituido en las posiciones 1, 3, y 5 por grupos guanidinio insertos en grupos amidodihidroimidazolio. La orientación estérica dada por la alternancia de los grupos etilo en las posiciones 2, 4 y 6, asegura que la sal de guanidinio esté preorganizada en una misma cara del anillo bencénico. Esta conformación origina una cavidad de fijación con varios enlaces de hidrógeno y tres interacciones de apareamiento de carga en el complejo huésped-receptor con citrato^{13;15}. El receptor catiónico esta en forma de cloruro y como todo cloruro, es muy soluble en agua. Ha sido empleado para la determinación de citrato en refrescos empleando un ensayo competitivo con indicadores coloreados^{16;17} y también con indicadores fluorescentes¹⁵.

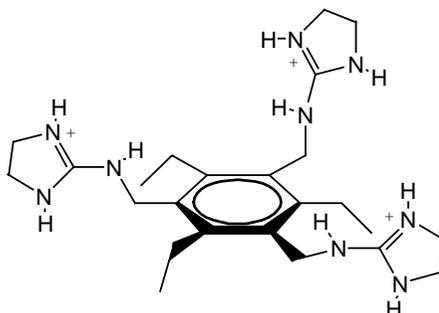


Figura 6.1. Estructura del receptor de citrato.

Con el propósito de desarrollar un sensor desechable para citratos en medio acuoso, hemos estudiado diferentes tipos de membranas empleando polímeros hidrofílicos tales como celulosa, hidrogeles de poliuretano y polímeros hidrofóbicos como el PVC, PVA, etilcelulosa y Nafión, y diferentes formatos de ensayo como son los basados en coextracción y ensayos competitivos empleando indicadores que contenían grupos carboxilato como azul de metiltimol, azul de calceína, naranja de xilenol, 4,5-dibromofluoresceína y 5-carboxifluoresceína. Los dos problemas principales que surgieron fueron los relativos a la falta de solubilidad de alguno de los componentes, por una parte y a la ausencia de una respuesta por parte del sensor al introducirlo en una disolución de citrato, por otra.

El uso de membranas hidrofóbicas que funcionan por coextracción fueron las que dieron mejores resultados, aunque el problema de la falta de solubilidad del receptor en el disolvente habitual, tetrahidrofurano, nos forzó a usar como disolvente una mezcla 80:20 % (v/v) de THF/ etanol. El seleccionar esta proporción se debió a que se intentó añadir la mínima cantidad de etanol necesaria para que el receptor fuera soluble, circunstancia que se logró al emplear la relación de disolventes dicha.

El mecanismo de este sensor desechable se basa en un proceso de coextracción de ácido cítrico entre una membrana orgánica de PVC plastificado y una fase acuosa que contiene el analito²²⁻²⁵. La unión selectiva de citrato al receptor guanidinio L es acompañada por la protonación del cromofóforo C para mantener la electroneutralidad de la membrana, lo cual genera la señal analítica. Dado que el cromofóforo utilizado, 1,2-benzo-7-(diethylamino)-3-(octadecanoylimino)

fenoxacina, es neutro en su forma básica, y el receptor catiónico está como cloruro, no es necesario incluir ningún aditivo en la formulación de la membrana, lo cual se corroboró experimentalmente.

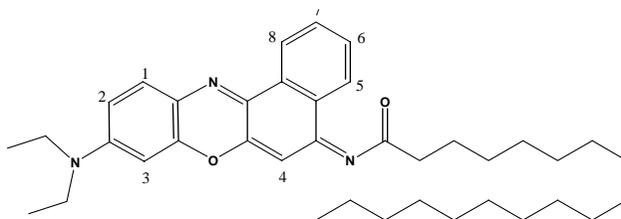
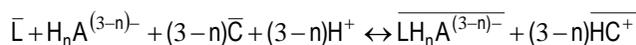


Figura. 6.2. Estructura del cromofóforo 1,2-benzo-7-(dietilamino)-3-(octadecanoilimino) fenoxacina (azul Nilo lipofilizado)

Suponiendo que se forma una especie 1:1 citrato:receptor y el cromofóforo es monobásico, el siguiente equilibrio de coextracción tiene lugar:

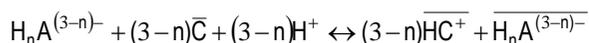


donde las especies barradas, están en la fase membrana, mientras que el resto de compuestos está en disolución acuosa y $H_n A^{(3-n)-}$ ($0 \leq n \leq 3$) son las posibles especies de citrato que pueden existir en disolución dependiendo del pH. La descripción de las características de la respuesta del sensor desechable se puede lograr a partir del grado de desprotonación α , definido como $[C]/C_C$ que se mide a partir de la absorbancia de la forma protonada del cromofóforo, que es la especie óptica medible en la fase membrana, como una absorbancia normalizada^{22,23}. Este valor de α está relacionado con la constante de coextracción del proceso K_{e1} , la concentración analítica de receptor C_L y cromofóforo C_C y las actividades de citrato y protones en la fase acuosa a través de la función respuesta:

$$K_{e1} = \frac{(1-\alpha)^{4-n}}{\left(\frac{C_L}{C_C} - \frac{1}{(3-n)} \cdot (1-\alpha) \right) \cdot (3-n) \cdot \alpha^{3-n} \cdot a_{H^+}^{3-n} \cdot a_{H_n A^{(3-n)-}}} \quad (6.1)$$

Ajustando el pH con una disolución tampón adecuada, es posible determinar ópticamente la actividad en citrato en disolución.

Adicionalmente, en ausencia de receptor en la membrana, también ocurre una extracción de citrato debida a una coextracción con el propio cromoióforo, de acuerdo con la siguiente ecuación:



Este proceso es caracterizado por una constante de coextracción K_{e2} de acuerdo con:

$$K_{e2} = \frac{(3-n) \cdot (1-\alpha)}{\alpha^{3-n} \cdot C_C^{2-n} \cdot a_{H^+}^{3-n} \cdot a_{H_nA^{(3-n)-}}} \quad (6.2)$$

Se comprobó que el plastificante presente tenía una fuerte influencia en la respuesta de la membrana a citrato, además de sobre la velocidad de reacción y la reversibilidad del proceso en el siguiente orden: ésteres fosfato > ésteres carboxílicos > éteres; en concreto TBP>>TEHP>NPOE>DOP>>DOS. Con DOS la membrana no es reversible y reacciona muy lentamente. TBP es el que produce una rápida respuesta y reversible, por lo que fue seleccionado para experimentos posteriores.

Como indica el esquema de coextracción, la respuesta del sensor depende de la actividad protónica²². Un incremento en la actividad protónica desplaza cuantitativamente la respuesta a menores actividades de citrato (Figura 6.3.B) pero al mismo tiempo incrementa la coextracción de citrato en membranas sin ionóforo (Figura 6.3.A), lo cual afecta a la selectividad.

Las especies de citrato que se extraen a la membrana sensora conteniendo receptor en el intervalo de pH estudiado (3,5-5,0) parece ser que es la especie doblemente cargada (HA^{2-}), de acuerdo a la concordancia de los resultados experimentales con la curva teórica (Figura 6.3.B) y las constantes de acidez del ácido cítrico (pKa: 3,13; 4,76; 6,40). Para el caso de membranas sin

receptor, las especies que se extraen se ajustan a la forma monohidrogenocitrato también (Figura 6.3.A).

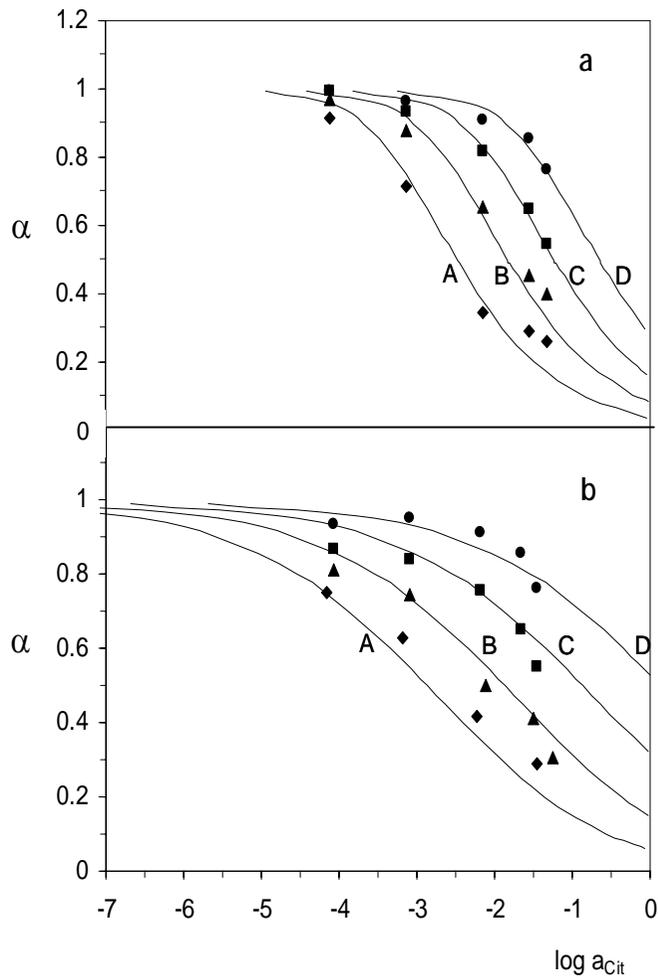


Figura 6.3. Efecto del pH en la respuesta del sensor. a: pH = 3,5; b: pH = 4,0; c: pH = 4,5; d: pH = 5,0. A: sin ionóforo; B: con ionóforo.

A valores de pH mayores de 5,0, la respuesta de la membrana a citrato disminuye drásticamente debido a la menor concentración protónica. Un valor de pH de 4,0 fue el seleccionado como compromiso que origina el mayor reconocimiento de citrato por el receptor y una mínima extracción de citrato como par iónico con el cromoionóforo protonado.

Se han realizado experimentos previos que demuestran que la selectividad para membranas que no contienen receptor de citrato, siguen la serie de Hoffmeister de acuerdo con: $\text{ClO}_4^- > \text{NO}_3^- > \text{Cl}^- > \text{PO}_4^{3-} > \text{SO}_4^{2-} > \text{citrato} > \text{benzoato} > \text{tartrato} > \text{CH}_3\text{COO}^-$. En presencia del receptor de citrato, el desplazamiento de la reacción es mayor a pH 4,0, idea apoyada por el aumento de la absorbancia debida a la forma protonada del cromoforo, además, la secuencia de selectividad cambia a: $\text{ClO}_4^- > \text{NO}_3^- > \text{citrato} > \text{benzoato} > \text{tartrato} > \text{Cl}^- > \text{PO}_4^{3-} > \text{CH}_3\text{COO}^- > \text{SO}_4^{2-}$, incrementándose considerablemente la selectividad para citrato debido a la interacción selectiva entre el receptor guanidinio y el citrato, lo que está en concordancia con los datos previamente publicados^{13,15}.

Se probaron varios tampones con el fin de seleccionar el más adecuado como tampón de trabajo, entre los que se encuentran fosfato, cloracetato, propionato y acetato. De ellos, se seleccionó como tampón el acetato 0,1M debido a los buenos resultados obtenidos y a que presenta una menor interferencia con respecto a los otros. Una interferencia similar debida al tampón de fosfato ha sido descrita por Metzger¹³ trabajando a pH 7,4 con el mismo receptor en disolución acuosa.

Para seleccionar la proporción óptima de plastificante, se realizó un estudio variando el porcentaje de TBP en el cóctel, desde un 50% hasta un 70%, pues porcentajes mayores del 70% empeoran las propiedades físicas de la membrana que es menos homogénea y aumenta su tiempo de secado.

El tiempo de respuesta del sensor desechable se midió preparando diferentes membranas y midiéndolas frente a una concentración de 10^{-4} M de citrato. Se observa que la absorbancia decrece rápidamente debido al proceso de reconocimiento, pero llega un momento en que la membrana se vuelve opaca debido a que capta agua, independientemente del contenido en plastificante, provocando un aparente incremento en la absorbancia (Figura 6.4). Se ha seleccionado 40 segundos como tiempo de reacción adecuado para que diferentes concentraciones de citrato alcancen la máxima reacción y que la membrana se mantenga transparente. Aunque la membrana responde de forma reversible, el nivel de respuesta decrece con sucesivas medidas de un mismo sensor, por lo que los sensores solo son usados una vez en cada medida.

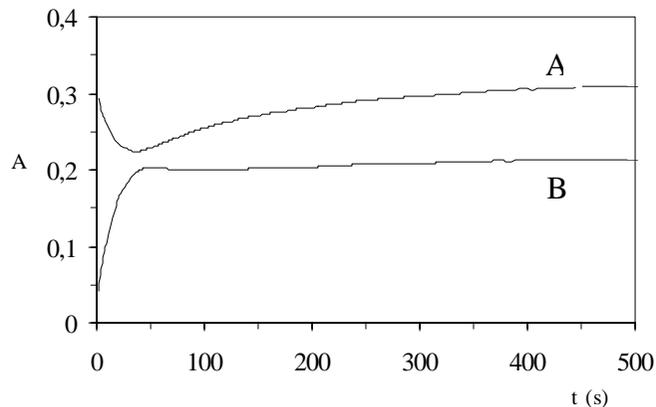


Figura 6.4. Evolución de la respuesta (absorbancia) del sensor desechable en función del tiempo. A: forma desprotonada del cromoinóforo (545 nm); B: forma protonada del cromoinóforo (660 nm).

Además se ha demostrado, como se puede ver en la Figura 6.5, que el porcentaje de plastificante empleado en la membrana influye en la selectividad, por lo que decidimos el emplear un porcentaje de TBP de un 60%, pues es el que permite obtener unos mejores resultados.

La influencia del ionóforo en la membrana se comprobó realizando un estudio de la relación ionóforo/cromoinóforo (C_L/C_C), manteniendo para ello una cantidad adecuada de cromoinóforo para minimizar el error fotométrico en las medidas de la absorbancia. Se ha comprobado que un aumento en la relación C_L/C_C provoca una leve modificación en los coeficientes de selectividad, siendo seleccionada una relación 1:1 debido a que de esta forma se obtiene una menor pendiente de la función respuesta, obteniendo así un mayor rango dinámico para citrato.

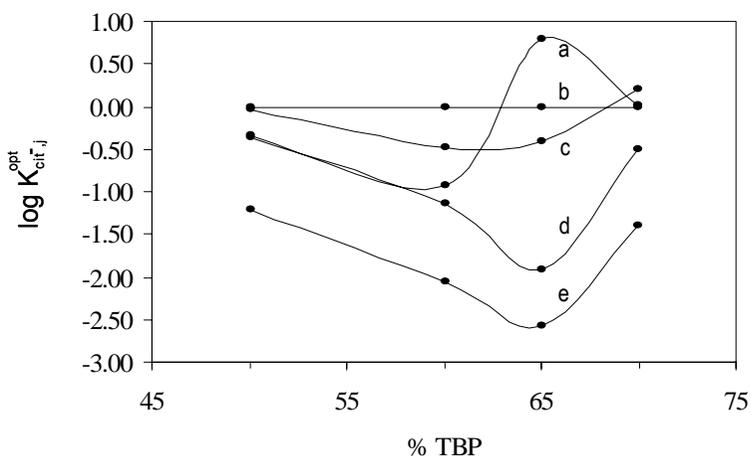


Figura 6.5. Variación de la selectividad del sensor desechable en función de la proporción de TBP. a) tartrato; b) citrato; c) benzoato; d) cloruro; e) fosfato.

Para estudiar la influencia de la actividad de citrato sobre la respuesta del sensor desechable se preparan membranas que presentan la composición antes señalada como óptima. Dichas membranas se ponen en contacto con disoluciones de citrato, a pH 4,0, en un rango de actividades que van desde $0,166M$ a $8,39 \cdot 10^{-7} M$ ($0,5 M$ y $10^{-6} M$ en concentraciones). En la Figura 6.6 se representan dichos resultados, junto con la función respuesta teórica dada por la ecuación 6.1, considerándose que tiene lugar una estequiometría entre el ionóforo y citrato ($p=1$), suponiendo que la especie extraída de citrato es la doblemente cargada. El ajuste por mínimos cuadrados de los puntos experimentales en la zona lineal de máxima pendiente (8 niveles de concentración y 9 réplicas de cada uno) de la curva respuesta al modelo teórico indicado por la ecuación. 6.1, nos permite calcular un valor de $\log K_{e1}$ de $9,96 \pm 0,08$.

El complejo observado en este caso entre el receptor guanidinio y el citrato como monohidrogenocitrato, difiere del que ha sido estudiado por el grupo de Anslyn, dado que ellos trabajan en medio acuoso a pH neutro, por lo que el citrato se encuentre totalmente desprotonado. En este caso, la reacción de reconocimiento ocurre en un medio de baja constante dieléctrica (el tributil fosfato tiene una constante dieléctrica $\epsilon \sim 8^{26}$) y con las especies de citrato que son extraídas de solución acuosa a pH 4,0 (donde existen tanto especies H_2A^- y HA^{2-}). Nosotros suponemos que la

especie HA^{2-} es la coextraída a la membrana junto con un protón, teniendo lugar el reconocimiento no solo por apareamiento de cargas, sino también por enlace de hidrógeno con el receptor preorganizado¹³, dando lugar a un complejo (citrato:receptor) 1:1 dentro de la membrana²⁶.

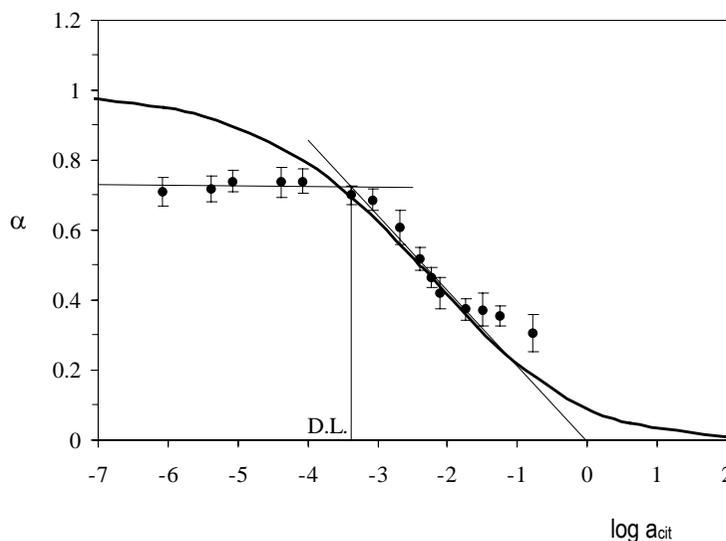


Figura 6.6. Curva respuesta. La curva teórica es la de trazo continuo

Se puede observar en la función respuesta a bajas concentraciones de citrato se aleja de la función teórica, lo que puede ser debido a la unión no selectiva con acetato que está en gran exceso debido al tampón. También se observa que a actividades de citrato mayores de $3 \cdot 10^{-2}$, tiene lugar una lixiviación de los componentes de la membrana, lo que origina una desviación del modelo como se ve en la Figura 6.6.

4. Caracterización analítica y aplicaciones

El rango de medida y el límite de detección para un sensor óptico desechable basado en un optodo de membrana tridimensional que exhibe una función respuesta sigmoidal, se ha definido de diversas formas²⁷⁻³⁰. En este caso, se emplea como rango de medida la relación lineal en el centro de la función respuesta sigmoidal que se define por medio de un test de fallo de ajuste, siendo el límite de

detección la intersección de la función lineal de calibrado y una función lineal ajustada en la zona de mínima pendiente (ruido de fondo).

Para caracterizar la función analítica de este sensor desechable, se han preparado dos series de disoluciones patrón, una en la zona de máxima pendiente de la respuesta sigmoideal (7 patrones, 9 réplicas de cada uno), en un rango de concentraciones comprendido entre $4,17 \cdot 10^{-4}$ y $1,77 \cdot 10^{-2}$ en actividades ($5,0 \cdot 10^{-4}$ y $2,5 \cdot 10^{-2}$ M en concentraciones) y otra serie de disoluciones patrón en la zona de mínima pendiente del sigmoide (3 patrones, 9 réplicas de cada), entre $8,39 \cdot 10^{-7}$ y $8,38 \cdot 10^{-5}$ en actividades ($1 \cdot 10^{-6}$ y $1 \cdot 10^{-4}$ M en concentraciones). La linealidad de ambas series, como se ha explicado anteriormente, fue comprobada por aplicación de un test de fallo de ajuste³¹. Las funciones lineales que se obtuvieron fueron, respectivamente:

$$\alpha = -0,00379 - 0,2149 \log a_{\text{cit}} \quad (6.3)$$

$$\alpha = 0,71572 - 0,00235 \log a_{\text{cit}} \quad (6.4)$$

El límite de detección calculado por la intersección de ambas funciones es 0,412 mM en actividades (0,483 mM en concentración; $91,3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) (Figura 6.6). Como límite superior del rango de medida se usó la mayor concentración del rango de medida (la cual se ajusta estadísticamente a la función lineal); esta fue 17,7 mM (25,0 mM en concentraciones). De esta manera el rango de concentraciones para la determinación de citrato es entre 0,483 y 25,0 mM.

Tabla 6.1. Límites inferior y superior para el sensor de citrato.

	Límite de detección	Límite superior
(actividades)	0,412 mM	17,7 mM
(concentraciones)	0,483 mM	25,0 mM

La precisión expresada como repetibilidad sensor a sensor para diferentes sensores desechables, expresada con desviación estándar relativa, fue calculada para tres niveles de actividad de citrato $8,3 \cdot 10^{-4}$, $4 \cdot 10^{-3}$ y $7,7 \cdot 10^{-3}$ M ($1 \cdot 10^{-3}$, $5 \cdot 10^{-3}$ y $1 \cdot 10^{-2}$ M en concentraciones) y diez réplicas de cada uno empleando siempre un sensor diferente en cada réplica.

Tabla 6.2. Reproducibilidad de los sensores desechables para citrato expresada como $\log a_{\text{citrato}}$

a_{citrato}	DER (%)
$8,3 \times 10^{-4}$	4,2
$4,0 \times 10^{-3}$	5,7
$7,7 \times 10^{-2}$	8,6

La Tabla 6.3 muestra estos y otros parámetros analíticos. El tiempo de vida del sensor desechable desarrollado se ha establecido ensayando de forma periódica su capacidad de respuesta. Para ello se preparó un conjunto de sensores con las que se procedió de la forma siguiente: se conservó cada sensor en un tubo de plástico cerrado, alejado de la luz para evitar la fotodescomposición de los componentes de la membrana y evitando posible humedad. Se comprobó diariamente midiendo un sensor en una disolución de citrato de una concentración intermedia del rango lineal. Tras el estudio se pudo concluir que los sensores desechables tienen una duración máxima de tres semanas.

El precio de cada sensor ha sido estimado utilizando el coste de cada uno de los componentes del sensor cuyos precios han sido obtenidos de los respectivos catálogos actualizados. Así pues, el precio es una estimación para el prototipo desarrollado que en ningún caso coincidiría con el costo estándar de una fabricación en serie. Como vemos en la tabla dicho precio es aproximadamente de 3 céntimos de euro.

Para estudiar la utilidad del sensor desechable propuesto para la determinación de citrato, ha sido aplicado a refrescos y fármacos. Los resultados han sido validados por comparación con un método enzimático comercializado por Boehringer Mannheim utilizado como método de referencia. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 6.4 donde se muestran los resultados correspondientes al valor medio de tres réplicas para cada muestra con cada uno de los métodos, la desviación estándar de estas medidas y el valor P del test de comparación de medias empleado. Como se observa en dicha tabla no existe diferencia significativa entre las medias obtenidas utilizando el sensor desechable estudiado y el método de referencia.

Tabla 6.3. Parámetros analíticos

Parámetro	Valor; S
Ordenada en origen	-0,0038; 0,0179
Pendiente	-0,2149; 0,0069
Nivel de probabilidad % (test fallo de ajuste)	6,2
Rango lineal (mg · L ⁻¹)	91,29 – 4725
Limite de detección (mg · L ⁻¹)	91,29
DER (%) ^a	1,0 · 10 ⁻³ M
	5,0 · 10 ⁻³ M
Sensor a sensor	1,0 · 10 ⁻² M
	8,6
Tiempo de respuesta (s)	40
Costo (€/sensor) ^b	0,03
Tiempo de vida (semanas)	3

a: DER for $\log(a_{\text{cit}})$; b: considerando solo el coste de materiales.

Tabla 6.4. Determinación de citrato en refrescos y fármacos usando como método de referencia un test enzimático.

Tipo de muestra	Sensor desechable*	s	Método de referencia*	s	Pval (%)
Refresco de naranja	3,3 g · L ⁻¹	0,455	3,59 g · L ⁻¹	0,066	32,2
Sal de frutas Eno	0,51 g · g ⁻¹	0,056	0,47 g · g ⁻¹	0,005	27,6
Uralyt-Urato	0,74 g · g ⁻¹	0,017	0,71 g · g ⁻¹	0,017	14,1
Citrocil	0,52 g · g ⁻¹	0,019	0,50 g · g ⁻¹	0,033	42,0
Micalax	0,057 g · g ⁻¹	0,005	0,051 g · g ⁻¹	0,002	14,0

*tres réplicas de cada muestra

5. Conclusiones

En este Capítulo se ha presentado un sensor óptico desechable para citrato. Está basado en un sistema de reconocimiento anfitrión-huesped por parte de un receptor artificial de tipo guanidinio y se ha puesto en práctica en una membrana transparente que actúa por coextracción, ofreciendo una señal analítica fácil de medir.

Este sensor permite llevar a cabo la determinación de citrato en refrescos y fármacos, con la ventaja de una reducción en contaminación, pérdidas y cambios relacionados con la toma de muestra, reducción de coste y bajo tiempo de respuesta. Es respetuoso con el medioambiente y tiene un tiempo de vida estimado de tres semanas cuando se protege de la luz. El uso de diferentes técnicas de producción en masa y el desarrollo de instrumentación pequeña, portátil y de funcionamiento con baterías que permita hacer análisis descentralizados está ahora bajo investigación.

6. Bibliografía

1. Fung, Ying Sing; Lau, Kap Man *Electrophoresis* 2003, 24, 3224-32.
2. Escobal, A.; Gonzalez, J.; Iriondo, C.; Laborra, C. *Food Chem.* 1996, 58, 381-84.
3. Shirakawa, Navette; Saini, Charanjit; de Borba, Brian; Kiser, Ruthann *LC-GC Europe* 2004, September, 19-20.
4. Izco, J. M.; Tormo, M.; Harris, A.; Tong, P. S.; Jimenez-Flores, R. *J.Dairy Sci.* 2003, 86, 86-95.
5. Moreno-Cid, A.; Yebra, M. C.; Santos, X. *Talanta* 2004, 63, 509-14.

6. Möllering, H. *Methods in Enzymatic Analysis*, Bergmeyer, H. U., Ed.; Verlag Chemie: Weinheim/Academic Press: New York, 1985.
7. Velterop, Joyce S.; Vos, Femke *Phytochem.Anal.* **2001**, *12*, 299-304.
8. Lin, Zhihong; Wu, Meng; Schäferling, Michael; Wolfbeis, Otto S. *Angew.Chem.Int.Ed.* **2004**, *43*, 1735-38.
9. Beer, Paul D.; Gale, P. A. *Angew.Chem.Int.Ed.* **2001**, *40*, 486-516.
10. Gale, P. A. *Coord.Chem.Rev.* **2000**, *199*, 181-233.
11. Schmidtchen, F. P.; Berger, M. *Chem.Rev.* **1997**, *97*, 1909-646.
12. Fitzmaurice, Richard J.; Kyne, Graham M.; Douheret, David; Kilburn, Jeremy D. *J.Chem.Soc.Perkin Trans.1* **2002**, 841-64.
13. Metzger, Axel; Lynch, Vincent M.; Anslyn, Eric V. *Angew.Chem.Int.Ed.* **1997**, *36*, 862-65.
14. Snowden, T. S.; Anslyn, E. V. *Curr.Op.Chem.Biol.* **1999**, *3*, 740-46.
15. Metzger, A.; Anslyn, E. V. *Angew.Chem.Int.Ed.* **1998**, *37*, 649-52.
16. Anslyn, E. V. and Metzger, A. Patente US 6,048,732 (2001).
17. McCleskey, Shawn C.; Metzger, A.; Simmons, Chris S.; Anslyn, E. V. *Tetrahedron* **2002**, *58*, 621-28.
18. Cabell, Larry A.; Best, Michael D.; Lavigne, John J.; Schneider, Stephen E.; Perreault, Denise M.; Monahan, Mary Katherine; Anslyn, E. V. *J.Chem.Soc.,Perkin Trans.2* **2001**, 315-23.

-
19. Morf, W. E.; Seiler, K.; Rusterholz, B.; Simon, W. *Anal.Chem.* **1990**, *62*, 738-42.
 20. Capitán-Vallvey, L. F.; Fernández-Ramos, M. D.; Alvarez de Cienfuegos, P.; Santoyo-Gonzalez, F. *Anal.Chim.Acta* **2003**, *481*, 139-48.
 21. Capitán-Vallvey, L. F.; Fernández-Ramos, M. D.; Alvarez de Cienfuegos, P. *Anal.Chim.Acta* **2002**, *451*, 231-41.
 22. Bühlmann, P.; Pretsch, E.; Bakker, E. *Chem.Rev.* **1998**, *98*, 1953-687.
 23. He, H.; Li, H.; Uray, G.; Wolfbeis, O. S. *Talanta* **1992**, *40*, 453-57.
 24. He, Huarui; Uray, Georg; Wolfbeis, Otto S. *Fresenius J.Anal.Chem.* **1992**, *343*, 313-18.
 25. Negishi, Takayuki; Nakatani, Kiyoharu *Phys.Chem.Chem.Phys.* **2003**, *5*, 594-98.
 26. Bisson, Adrian P.; Lynch, Vincent M.; Monahan, Mary Katherine; Anslyn, Eric V. *Angew.Chem.Int.Ed.* **1997**, *36*, 2340-42.
 27. Seiler, K.; Simon, W. *Anal.Chim.Acta* **1992**, *266*, 73-87.
 28. Bakker, E.; Bühlmann, P.; Pretsch, E. *Chemical Rev.* **1997**, *97*, 3083-132.
 29. Bakker, E.; Willer, M.; Pretsch, E. *Anal.Chim.Acta* **1993**, *282*, 265-71.
 30. Lerchi, M.; Bakker, E.; Rusterholz, B.; Simon, W. *Anal.Chem.* **1992**, *64*, 1534-40.
 31. Analytical Methods Committee *Analyst* **1994**, *119*, 2363-66.

CAPÍTULO 6

LINEALIZACIÓN DE CURVAS DE RESPUESTA EN SENSORES ÓPTICOS DESECHABLES BASADOS EN COEXTRACCION PARA ANIONES MONOVALENTES

LINEALIZACIÓN DE CURVAS DE RESPUESTA EN SENSORES ÓPTICOS DESECHABLES BASADOS EN COEXTRACCION PARA ANIONES MONOVALENTES

1. Introducción

Los optodos selectivos de iones tridimensionales (*bulk optodes*) son tanto conceptualmente como en composición similares a los electrodos selectivos de iones basados en portador, aunque tienen diferente mecanismo. Con optodos basados en un segundo componente, también conocidos como optodos tridimensionales¹ el hecho del reconocimiento del analito logrado por el empleo de ionóforos se pone de manifiesto mediante un compuesto distinto a este ionóforo presente también en la membrana y denominado cromoionóforo, a través de una reacción acoplada que da lugar a una transducción óptica. Una membrana polimérica plastificada contiene todos los compuestos necesarios

para la extracción y el reconocimiento del analito y para la transducción del evento de reconocimiento en una señal óptica.

En el caso de membranas de segundo componente para aniones, el proceso de sensado se basa en la coextracción del analito aniónico, debido al ionóforo presente en la membrana, junto a un catión de referencia, normalmente el ión hidrógeno, que es reconocido por un indicador ácido-base también presente en la membrana lipofílica. Dado que estas membranas responden al producto de actividades del anión y catión coextraído (ión hidrógeno), la medida o la fijación del pH permite la determinación de la actividad o concentración de analito trabajando a una fuerza iónica constante. Se han caracterizado y diseñado diferentes sensores químicos para aniones relevantes, como cloruro²⁻⁷, nitrato⁸, nitrito^{9,10}, tiocianato¹¹, sulfito¹² o carbonato¹³.

El elemento sensor puede ser llevado a la práctica de diferentes modos, por ejemplo, como sondas de fibra óptica², sensores de flujo¹¹, tiras reactivas o sensores desechables^{8,14} o sensores ópticos basados en microesferas⁴, los cuales son ejemplos de realizaciones prácticas. No obstante, aunque los aspectos técnicos son diferentes, los principios de funcionamiento son los mismos a pesar de que los modos de realización práctica son extremadamente diferentes.

La función respuesta característica de dichos sensores –el parámetro analítico frente al logaritmo de la actividad de analito- tienen una forma sigmoideal¹⁵. Esto supone un problema para la calibración, pues solo la zona central del sigmoide, la cual puede ser asimilada a una línea recta, es empleada como función de calibrado, perdiéndose de esta forma parte de la información analítica que la dependencia sigmoideal completa contiene.

La transformación de una relación no lineal en una lineal se ha llevado a cabo usualmente mediante una regresión logística, que es una clase de modelo lineal generalizado, lo que hace posible predecir un resultado discreto a partir de una serie de variables que pueden ser continuas, discretas, dicotómicas, o una combinación de alguna de ellas.

En el modelo de regresión logit, los valores predichos para la variable respuesta nunca pueden ser ≤ 0 o ≥ 1 , independientemente de los valores de las variables independientes. Esto se logra aplicando la ecuación de regresión 7.1, la cual siempre da los valores predichos en el rango de 0 a 1.

$$y = \exp(b_0 + b_1 \cdot x_1 + \dots + b_n \cdot n_n) / (1 + \exp(b_0 + b_1 \cdot x_1 + \dots + b_n \cdot n_n)) \quad (7.1)$$

Si considerásemos una variable dependiente y que fluctúa desde 0 a 1 (por ejemplo, una probabilidad), podremos transformar (transformación logit o logística) la variable y como:

$$y' = \ln(y/(1-y)) \quad (7.2)$$

Esta variable transformada y' puede asumir teóricamente cualquier valor entre menos y más infinito. Dado que la transformada logit resuelve el tema de los límites 0/1 para la variable dependiente original, podemos usar esos valores transformados de logit en una ecuación de regresión lineal ordinaria. Concretamente, si desarrollamos la transformación logit a ambos lados de la ecuación de regresión logit, obtendremos el modelo de regresión múltiple lineal estándar de la ecuación 7.3:

$$y' = (b_0 + b_1 \cdot x_1 + \dots + b_n \cdot x_n) \quad (7.3)$$

Este tipo de transformación ha sido usada en Química Analítica con propósitos muy diferentes, así para linealizar la forma sigmoideal de la respuesta en inmunoensayos, tanto radioinmunoensayos¹⁶ como ELISA¹⁷. También para evaluación de ensayos rápidos¹⁸ y también de ensayos con varillas indicadoras¹⁹ de respuesta dicotómica. Adicionalmente, la transformación logística ha sido aplicada a otras situaciones analíticas, así para modelar factores de capacidad en función del pH en la optimización de procedimientos HPLC²⁰ y para modelar la movilidad como una función del pH en electroforesis capilar de zona²¹.

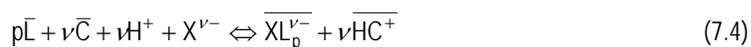
El empleo de una linealización logística puede mejorar el uso de optodos de diferentes maneras: 1) incrementando notablemente el rango dinámico y 2) permitiendo la cuantificación directa de muestras sin la necesidad de dilución o preconcentración, si ello es posible. En esta Memoria se aplica esta nueva metodología a sensores ópticos para aniones, concretamente a sensores ópticos

previamente desarrollados por nosotros para la determinación de cloruros⁷ y nitratos⁸ en diferentes tipos de aguas. Para validar la metodología, se han analizado diferentes muestras reales de agua de diversa procedencia y con una concentración de analito en las zonas extremas de las nuevas funciones de calibrado, comparándose los resultados con un método de referencia basado en cromatografía iónica.

2. Teoría

2.1. Modelo general

El mecanismo de trabajo de membranas de coextracción, tanto en formato sonda, como en flujo o en formato de un solo uso, se basa en los cambios de concentración en el interior de una fase separada hidrofóbica y teóricamente se conoce bien^{15,22:23}. El reconocimiento de aniones se debe al ionóforo presente en la membrana y la transducción óptica se lleva a cabo normalmente por el acoplamiento de un cromoióforo que posee grupos auxocrómicos, como puede ser un indicador lipofílico ácido-base. La condición de electroneutralidad en la membrana hidrofóbica supone el equilibrio de transferencia de fase de dos iones, el analito X^{V-} y el ión de referencia M^{Z+} , normalmente un protón, como un equilibrio de coextracción mediado por el ionóforo que permite la respuesta óptica, de acuerdo con la ecuación 7.4 donde las especies barradas están en fase membrana:



La carga del ionóforo L o del cromoióforo C presente en la membrana, determina en algunos casos la necesidad de una sal lipofílica voluminosa catiónica R^+ o aniónica R^- para proporcionar las propiedades de cambio iónico requeridas por la membrana^{15,24}.

La descripción de la respuesta característica del sensor desechable se puede conseguir por cambios en la absorbancia o luminiscencia de la especie protonada del ionóforo selectivo a protón o cromoióforo, que es la especie óptica medible en la fase membrana, y expresada como un parámetro normalizado α ^{15;25}.

$$\alpha = \frac{A - A_{HC}}{A_C - A_{HC}} \quad (7.5)$$

El valor de α , que se define como grado de desprotonación del cromoióforo, se obtiene a partir de la absorbancia, o luminiscencia, de la especie completamente protonada (A_{HC}), y desprotonada (A_C) del cromoióforo y del problema (A) de acuerdo con la ecuación 7.6 y está relacionado con la constante global de coextracción K_{coext} ; las concentraciones analíticas de ionóforo C_L y cromoióforo C_C y las actividades de analito X^{v-} y H^+ en la fase acuosa, a través de la siguiente función respuesta que es intrínsecamente sigmoideal:

$$K_{coext} \cdot (a_{H^+})^v \cdot (a_{X^{v-}}) = \frac{(1 - \alpha)^{1+v}}{\alpha^v \cdot \left[\left(\frac{C_L}{C_C} - (1 - \alpha) \cdot \frac{p}{v} \right)^p \cdot v \cdot C_C^{p-1} \right]} \quad (7.6)$$

Función derivada de una reacción en equilibrio termodinámico aunque implica algunas suposiciones no termodinámicas, como es suponer que los coeficientes de actividad en la fase membrana son constantes, entre otros²³.

Estas ecuaciones muestran la dependencia entre la actividad del anión analito, $a_{X^{v-}}$ y el grado de desprotonación del cromoióforo, α , siendo todos los otros términos constantes para cada sistema analítico. Utilizando la ecuación 7.6, escrita en forma logarítmica (ec. 7.7) y representando α vs $\log a_{X^{v-}}$, se obtiene una curva sigmoideal (Figura 7.1).

$$\log a_{X^{v-}} = \log \frac{(1-\alpha)^{1+v}}{\alpha^v \cdot \left(\frac{C_L}{C_C} - (1-\alpha) \cdot \frac{p}{v} \right)^p \cdot v \cdot C_C^{p-1} \cdot 10^{-v \text{pH}} \cdot K_{\text{coext}}} \quad (7.7)$$

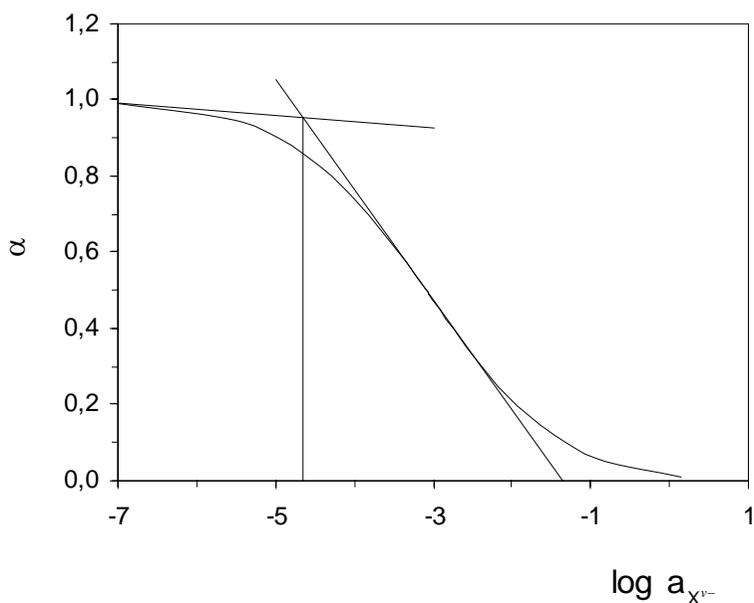


Figura 7.1. Rango dinámico lineal en respuestas tipo sigmoideal usando la anterior metodología.

Para optodos de membrana, la parte central de la curva sigmoideal es prácticamente lineal y es usada habitualmente como curva de calibrado lineal con propósitos analíticos. El rango de medida útil suele cubrir habitualmente de 2 a 4 órdenes de magnitud de la concentración de analito y depende, a un valor de pH constante, de la composición de la membrana, la carga del anión analito y la estequiometría del complejo formado en la membrana polimérica; pudiéndose incrementar el rango de trabajo para analitos de mayor carga y/o mayores estequiometrías del complejo^{15,23}.

Este intervalo lineal está definido entre un límite inferior y límite superior²⁶. El límite inferior se puede calcular haciendo uso de diferentes aproximaciones que se basan en: i) la pérdida de sensibilidad debido a la forma sigmoideal de la función respuesta a bajas concentraciones del anión y ii)

por la interferencia de otros aniones¹⁵. La primera de las aproximaciones, por pérdida de sensibilidad, puede ser definida de tres formas: a) de la desviación estandar de la señal de fondo²⁷; b) por la variación en una fracción dada de la pendiente máxima de la función respuesta²⁷ y c) por el punto de corte de dos funciones lineales en la parte de máxima y mínima pendiente del sigmoide, esta última en la zona de mínima concentración²⁸ (Figura 7.1).

Dado que la sensibilidad disminuye continuamente con el aumento de la actividad de analito, se puede describir el límite superior de modo análogo a las definiciones del apartado b y c. En este último caso, se hace necesario el poder definir una función lineal en la parte de mínima pendiente de la zona de alta actividad. Si esto no es posible, como suele ocurrir debido a algunos problemas como la falta de solubilidad de la sal correspondiente, se obtiene un límite superior práctico a partir de la intersección de la función de calibrado lineal con el eje de abscisas²⁹. Esta manera de definir el rango de medida en los optodos de membrana supone una pérdida de información analítica potencial, ya que el rango de medida de analito es varios órdenes de magnitud más corto que todo el rango dinámico completo del sigmoide. Sin embargo, como puede verse en la Figura 7.1, la respuesta analítica (α) es una función logística que tiene valores en el rango (0,1), razón por la cual puede ser linealizada por una transformación logit.

El propósito de este trabajo es estudiar el uso de la función sigmoideal completa para extraer la información analítica mediante su transformación en una función lineal y así obtener un rango de aplicación más amplio que haga posible medir muestras con una mucho más amplia concentración de analito sin tener que diluir o concentrar la muestra de antemano.

Para encontrar una función analítica del tipo $Y = A + B \cdot X$ a partir del modelo teórico sigmoideal, la ecuación 7.7 se reescribe como:

$$\log \frac{(1-\alpha)^{1+v}}{\alpha^v \left(\frac{C_L}{C_C} - (1-\alpha) \cdot \frac{p}{v} \right)^p} = \log \left(v \cdot C_C^{p-1} \cdot 10^{-v \cdot pH} \cdot K_{coext} \right) + \log a_{X^{v-}} \quad (7.8)$$

y se reagrupa de la siguiente forma:

$$\log\left(\frac{1-\alpha}{\alpha}\right)^{1+\nu} + \log\left[\frac{\alpha}{\left(\frac{C_L}{C_C} - (1-\alpha) \cdot \frac{p}{\nu}\right)^p}\right] = \log\left(\nu \cdot C_C^{p-1} \cdot 10^{-\nu \cdot pH} \cdot K_{\text{coext}}\right) + \log a_{X^{\nu-}} \quad (7.9)$$

Para el caso de aniones monovalentes ($\nu = 1$), se obtiene la siguiente ecuación:

$$\log\left(\frac{1-\alpha}{\alpha}\right) + \frac{1}{2} \log\left[\frac{\alpha}{\left(\frac{C_L}{C_C} - (1-\alpha) \cdot p\right)^p}\right] = \frac{1}{2} \log\left(C_C^{p-1} \cdot 10^{-pH} \cdot K_{\text{coext}}\right) + \frac{1}{2} \log a_{X^{\nu-}} \quad (7.10)$$

Esta última ecuación puede reescribirse de una manera simplificada como:

$$Y(\alpha) + D(\alpha) = A + B \cdot X \quad (7.11)$$

donde $Y(\alpha)$ es la inversa del logit decimal de α ; X es el logaritmo decimal de la actividad del anión considerado; A es un término independiente que permanece constante para cada sistema analítico y B es el coeficiente lineal o pendiente:

$$Y(\alpha) = \log\left(\frac{1-\alpha}{\alpha}\right) \quad (7.12)$$

$$X = \log a_{X^{\nu-}} \quad (7.13)$$

$$A = \frac{1}{2} \log\left(C_C^{p-1} \cdot 10^{-pH} \cdot K_{\text{coext}}\right) = \frac{p-1}{2} \log C_C + \frac{1}{2} (\log K_{\text{coext}} - pH) \quad (7.14)$$

Utilizamos el logaritmo decimal en lugar del logaritmo neperiano para así mantener el formalismo usual en las ecuaciones analíticas que implican constantes de equilibrio y concentraciones. Además, usamos la inversa del logaritmo decimal para evitar una pendiente negativa. La ecuación 7.11 es similar a la ecuación de una línea recta ($Y(\alpha)$ vs X), excepto por la introducción de un término disturbador $D(\alpha)$, definido como:

$$D(\alpha) = \frac{1}{2} \log \left[\alpha \left(\frac{C_L}{C_C} - (1 - \alpha) \cdot p \right)^{-p} \right] \quad (7.15)$$

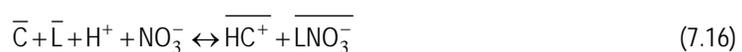
Cuando $Y(\alpha)$ se representa frente a X , si $D(\alpha)$ es cero o constante, nos encontraremos con una línea recta con pendiente $B = 0,5$, mientras que si $D(\alpha)$ es una función lineal de α , se obtendrá una línea recta con una pendiente diferente de $0,5$. En cualquier otro caso, se obtendrá una curva para la función $D(\alpha)$.

Una transformación logit similar, llamada por Rodbard³⁰ como modelo log-logit completamente especificado ha sido previamente aplicada para describir una expresión algebraica equivalente para la función logística, la cual es linealizada eficazmente por la ecuación: $\text{logit } Z = a + b \cdot \log(\text{concentración})$, siendo el logit de Z completamente especificado igual a: $\text{logit } Z = \log[(Z - Z_{\min}) / (Z_{\max} - Z)]$.

Para verificar la validez de esta proposición, hemos seleccionado dos sensores desechables de los ya descritos en capítulos anteriores, uno para cloruro⁷ y otro para nitrato⁸. La ecuación general fue ajustada para cada caso particular y se ha comprobado experimentalmente.

2.2. Modelo para el sensor de nitrato

En este caso, el equilibrio de coextracción que tiene lugar es el siguiente:



en el que la forma ácida del cromoióforo está cargada positivamente. Dado que, como se ha visto en el Capítulo 5, $C_i/C_c=1^p$, la ecuación 7.10 se puede escribir en la siguiente forma:

$$\log\left(\frac{1-\alpha}{\alpha}\right) + \frac{1}{2}\log\left[\frac{\alpha}{(1-p(1-\alpha))^p}\right] = A + \frac{1}{2}\log a_{X^-} \quad (7.17)$$

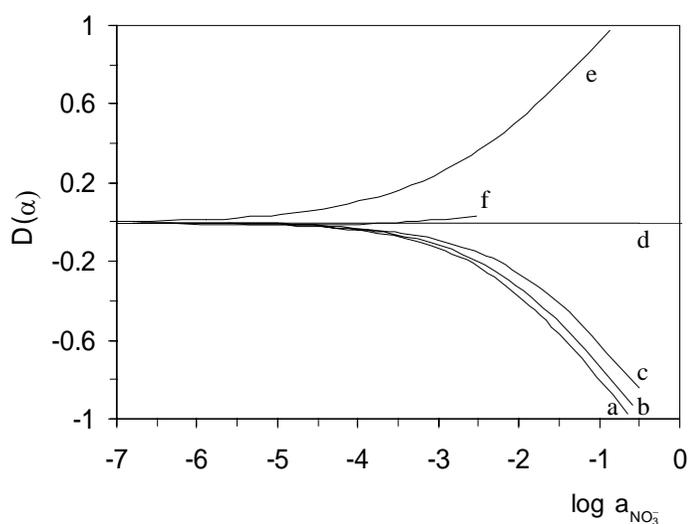


Figura 7.2. Influencia de la estequiometría en el término D para el sensor desechable de nitrato. a: $p = 0,33$; b: $p = 0,5$; c: $p = 0,66$; d: $p = 1$; e: $p = 1,5$; f: $p = 2$.

Con el propósito de conocer como varía $D(\alpha)$ con X sabiendo que $Y(\alpha)$ es una función lineal de X , se ha representado la función $D(\alpha)$ frente a X para diferentes valores del factor estequiométrico p . La Figura 7.2 muestra que solo cuando el factor estequiométrico p es 1, el factor disturbador $D(\alpha)$ vale cero. $D(\alpha)$ depende también de la actividad del analito, pero para $\log a_{\text{NO}_3^-}$ inferiores a -4 esa dependencia es cercana a cero, mientras que si la concentración en el anión aumenta, el término $D(\alpha)$ aumenta considerablemente de valor. Por tanto, $Y(\alpha)$ es una función lineal del $\log a_{\text{NO}_3^-}$ para sistemas de coextracción donde $p=1$, o cuando el $\log a_{\text{NO}_3^-}$ sea menor a -4 para cualquier valor de p .

2.3. Modelo para el sensor de cloruro

Al poner en contacto el sensor con una disolución acuosa que contiene cloruro, se da el siguiente equilibrio de coextracción en la membrana:



Dado que como se explicó en el Capítulo 4 relativo a este sensor de cloruro, el cromoiónico, cuya forma ácida es neutra, no puede estar completamente protonado al pH de trabajo (2,0), se hace difícil determinar la absorbancia para $\alpha = 1$. El problema se resuelve empleando un valor de α efectivo, donde el valor de A_c se obtiene midiendo la membrana equilibrada en la disolución tampón como se explica en la Sección Experimental. Además, para este sistema analítico, vimos que $C_i/C_c = 2^7$, con lo que la ecuación a emplear queda como:

$$\log\left(\frac{1-\alpha_{\text{ef}}}{\alpha_{\text{ef}}}\right) + \frac{1}{2}\log\left[\frac{\alpha_{\text{ef}}}{(2-p(1-\alpha_{\text{ef}}))^p}\right] = A + \frac{1}{2}\log a_{\text{X}^-} \quad (7.19)$$

Al igual que en el caso anterior, la representación correspondiente de $D(\alpha)$ frente a X para varios valores de p , muestran (Figura 7.3) que el término $D(\alpha)$ varía con la actividad de analito independientemente del valor del factor de estequiometría p , de tal manera que para valores de $\log a_{\text{Cl}^-}$ menores que -3 , el término $D(\alpha)$ es constante y próximo a cero. En estas condiciones $Y(\alpha)$ siempre varía linealmente con $\log a_{\text{Cl}^-}$. Para valores de $\log a_{\text{Cl}^-}$ mayores de -3 , el término $D(\alpha)$ deja de ser constante y la curva se desvía de la linealidad. No obstante, $D(\alpha)$ varía solo entre 0 y -1 , mientras que $Y(\alpha)$ puede aceptar valores de $+2$ a -2 , lo cual significa que las desviaciones de la linealidad introducidas, en este caso, no son excesivamente grandes pudiéndose aplicar el modelo lineal de manera aproximada.

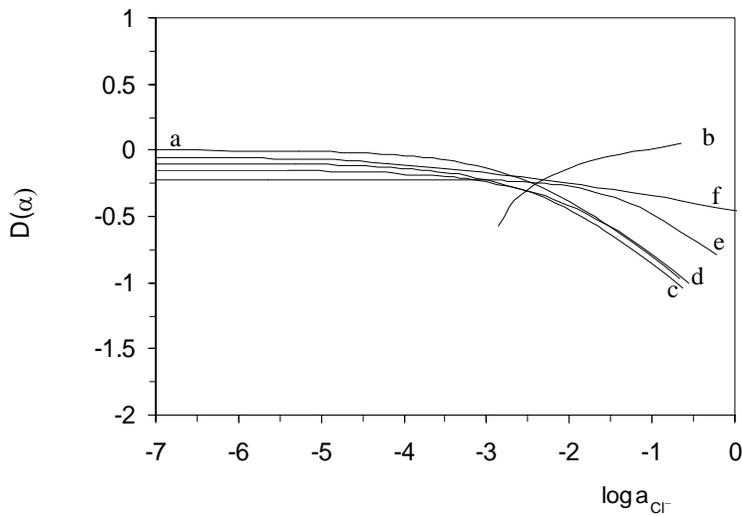


Figura 7.3. Influencia de la estequiometría en el término D para el sensor desechable de cloruro. a: $p = 0,33$; b: $p = 0,5$; c: $p = 0,66$; d: $p = 1$; e: $p = 1,5$; f: $p = 2$.

2.4. Estimación de la constante de coextracción global

La constante de equilibrio global para optodos de membrana se calcula normalmente por un ajuste de los datos experimentales al modelo teórico por un simple ajuste²⁶ o empleando una aproximación de mínimos cuadrados a los puntos centrales del sigmoide²⁹ o bien por cálculo iterativo³¹. Con la transformación de datos que aquí se propone, se puede calcular la constante de coextracción global K_{coext} a partir de la ordenada en origen de la ecuación linealizada 7.11. Solo es necesario conocer el valor de pH y las concentraciones analíticas de los componentes en la membrana.

3. Experimental

3.1. Reactivos

Los reactivos químicos empleados son de grado reactivo analítico y todas las disoluciones acuosas se prepararon empleando agua procedente de un sistema de purificación de osmosis reversa Milli-Ro 12 plus Milli-Q (Millipore, Bedford, MA).

Las disoluciones patrón de cloruro y nitrato (1,000 M) se prepararon en agua, por pesada de cloruro potásico seco (Sigma-Aldrich Química S.A., España) y nitrato potásico seco (Merck, Darmstad, Alemania), respectivamente. Disoluciones de menor concentración se prepararon por dilución con agua. Tampones: 0,02 M de pH 6,0 a partir de dihidrógeno fosfato sódico y monohidrógeno fosfato sódico y tampón 0,1 M de pH 2,0 a partir de ácido ortofosfórico / dihidrogenofosfato sódico (todos de Sigma-Aldrich).

Para la preparación de las membranas sensoras, se utilizó cloruro de polivinilo de alto peso molecular (PVC), tributil fosfato (TBP), tris-(2-etilhexil)fosfato (TEHP), dioctilftalato (DOP), bis (2-etilhexil) sebacato (DOS), 2-nitrofeniloctiléter (NPOE) y tetrahidrofurano (THF), todos ellos adquiridos a Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich Química S.A., Madrid, España) y cloruro de trioctil estaño que fue suministrado por Fluka (Fluka, Madrid, España). El resto de cromoióforos (dibromofluoresceína octadecil ester, 1,2-benzo-7-(dietilamino)-3-(octadecanoilimino)fenoxacina) y el ionóforo (2,16,18,32,45,47-hexaetil-5,13,21,29,34,42,44,46,48-nonaazaheptaciclo[15.15.11.1^{3,31}.17.11.1^{15,19}.1^{23,27}.1^{36,40}]-octatetraconta-1,3(45),7(48),8,10,15(47),16,18,23(46),26,31,36,37,39-pentadecaeno-6,12,22,28,35,41-hexona) se sintetizaron, purificaron y identificaron por nosotros de acuerdo a lo descrito en el Anexo 1. Como soporte se utilizaron láminas de poliéster tipo Mylar (Goodfellow, Cambridge, UK).

3.2. Preparación de las membranas de un solo uso y procedimiento de medida

Las membranas se prepararon con ayuda de un dispositivo giratorio sobre un soporte de poliéster³². Las mezclas para la preparación de las membranas sensibles a cloruro se prepararon a partir de una disolución conteniendo 40,0 mg (32,7 p/p %) de PVC, 80,0 mg (65,4 p/p %) de DOS, 1,33 mg (1,08 p/p %) de TOT y 1,0 mg (0,82 p/p %) de BFE y para las membranas sensibles a nitrato se partió de una disolución de 29,20 mg (32,2 p/p %) de PVC, 58,80 mg (65,0 p/p %) de TBP, 1,50 mg (1,7 p/p %) de HNOPH y 1,00 mg (1,1 p/p %) de 1,2-benzo-7-(dietilamino)-3-(octadecanoilimino)fenoxacina, en ambos casos disueltos en 1 mL de THF recientemente destilado. Los sensores desechables se prepararon por deposición de 15 y 20 μL , para cloruro y nitrato, respectivamente, sobre una lámina de poliéster de 14 mm \times 45 mm \times 0,25 mm de espesor con la ayuda de un sistema centrífugo de preparación de membranas y se almacenaron en un desecador a vacío a temperatura ambiente para permitir una evaporación lenta del disolvente.

La respuesta del sensor desechable para nitrato fue evaluada por adición de 8 mL de la disolución a ensayar en un tubo de plástico de polietileno junto con 2 mL de disolución tampón de pH 6,0. A continuación, se introduce el sensor desechable en el tubo durante 5 minutos sin agitación. En el caso de cloruros, 8 mL de la disolución a ensayar se añadió a un tubo de plástico junto con 2 mL de disolución tampón de pH 2,0. En este caso, el sensor desechable se introdujo en el tubo durante 6 minutos y sin agitación. Después de alcanzado el equilibrio, la absorbancia de las membranas se midió a 660 nm y 534 nm para nitratos y cloruros, respectivamente, en un espectrofotómetro de diodos en fila Hewlett-Packard HP-8453 (Nortwalk, CT, USA) provisto de un soporte de cubeta para el sensor desechable fabricado en hierro y pintado de negro mate³³. Los valores de absorbancia, correspondientes a la especie completamente protonada (A_{HC}) y desprotonada (A_{C}) del cromoforo necesarios para calcular los valores de α , se midieron acondicionando los sensores desechables en HNO_3 10^{-2} M y NaOH $2 \cdot 10^{-2}$ M, respectivamente, para los sensores de nitrato y en HCl 10^{-2} M y en tampón 10^{-2} M, respectivamente, para los sensores de cloruro. Las actividades se calcularon de acuerdo con el formalismo de Debye-Hückel³⁴. Para corregir la absorbancia del fondo,

las medidas se realizaron frente a una tira de poliéster tipo Mylar. Todas las medidas fueron llevadas a cabo a temperatura ambiente y las membranas no necesitaron ser acondicionadas antes de su uso.

4. Resultados y discusión

4.1. Verificación del modelo teórico: establecimiento de la curva de calibrado lineal

Para verificar la fiabilidad de los modelos teóricos (ecuaciones 7.17 y 7.19), se prepararon independientemente dos series de 15 disoluciones patrón de nitrato y cloruro conteniendo entre $8,37 \cdot 10^{-4}$ y $2,59 \cdot 10^2$ mM en actividades ($1 \cdot 10^{-3}$ y $5 \cdot 10^2$ mM en concentraciones) de nitrato y $8,59 \cdot 10^{-4}$ y $3,25 \cdot 10^2$ mM en actividades ($1 \cdot 10^{-3}$ y $5 \cdot 10^2$ mM en concentraciones) de cloruro, respectivamente. Se analizaron 9 réplicas de cada disolución patrón usando para ello un sensor desechable nuevo cada vez, de acuerdo con el procedimiento indicado antes en la Sección Experimental obteniéndose los correspondientes valores de α (ec. 7.5)

Además, la precisión del parámetro logit (α) fue estudiada en todo el rango de aplicación, observándose como la varianza se incrementa hacia los extremos del rango analítico. La Figura 7.4 muestra las curvas de varianza obtenidas, las cuales siguen un perfil parabólico para los dos casos estudiados. Los valores experimentales están ajustados por una regresión curvilínea parabólica corriente.

A continuación, los datos experimentales se ajustaron al modelo lineal teórico usando dos tipos de regresiones: i) una regresión lineal ordinaria de mínimos cuadrados (OLS, ordinary least squares), y ii) una regresión ponderada de mínimos cuadrados (WLS, linear weighted least squares). Para esta última regresión, se empleó como factores de ponderación la inversa de las varianzas correspondientes. Estas varianzas se obtuvieron a partir de los valores predichos para las curvas de varianza citadas en el párrafo anterior.

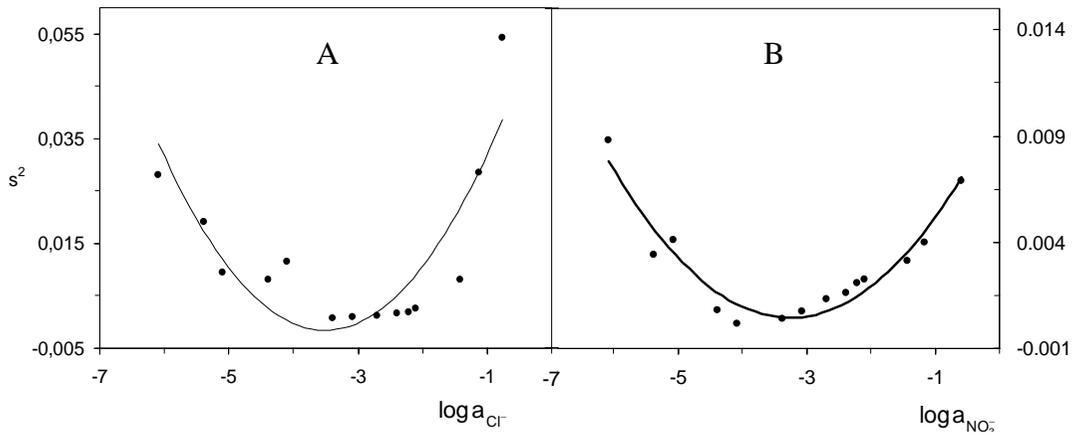


Figura 7.4. Curvas de varianza del logit decimal de α como una función del logaritmo decimal de las actividades de cloruro (A) y nitrato (B).

Además, se obtuvo una función de calibración teórica partiendo de las ecuaciones 7.17 y 7.19, para nitrato y cloruro, respectivamente, empleando para ello los mismos datos de actividad ensayados experimentalmente. A partir de estos datos se calculó los valores de y y teóricos y se ajustaron por medio de una calibración OLS. Las Figuras 7.5 y 7.6 muestran las curvas de calibrado con la metodología clásica y la propuesta para nitrato y cloruro, respectivamente, y la Tabla 7.1 muestra los resultados obtenidos al comparar las características de calibrado entre el modelo teórico y los datos experimentales para cada sensor desechable.

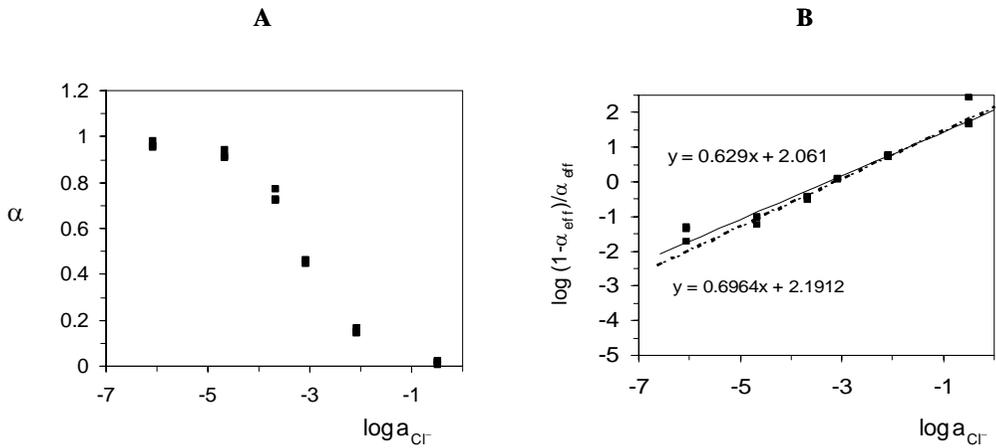


Figura 7.5. Comparación entre las curvas de calibrado para cloruro: A: puntos de calibrado tradicional (previo a linealización); B: Puntos de la calibración propuesta. (linealización logit). Las línea continua es regresión OLS y la línea punteada es la regresión WLS.

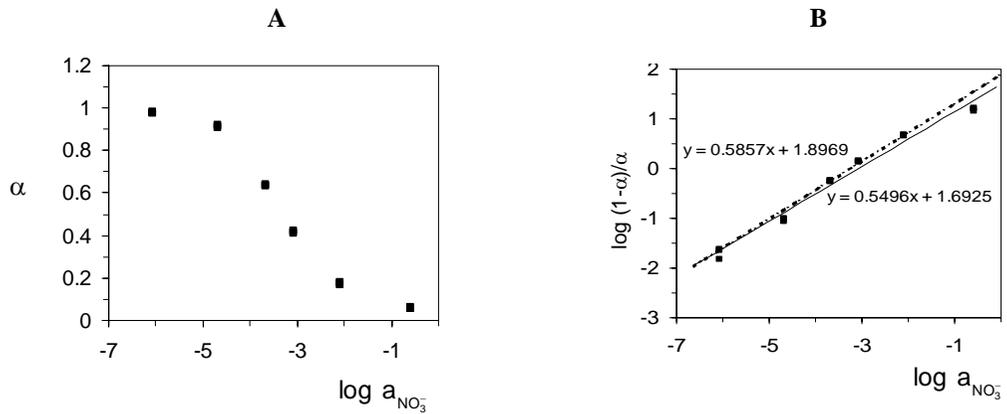


Figura 7.6. Comparación entre las curvas de calibrado para nitrato: A: puntos de calibrado tradicional (previo a linealización); B: Puntos de la calibración propuesta. (linealización logit). Las línea continua es: regresión OLS; y la línea punteada es la regresión WLS

Tabla 7.1. Comparación entre las calibraciones teórica, experimental OLS, y experimental WLS, para sensores de nitrato y cloruro.

		cloruro	nitrato
Calibración teórica	ordenada	1,939	1,530
	pendiente	0,613	0,500
	Coefficiente de correlación	0,990	1,000
Calibración OLS	ordenada	1,946	1,648
	pendiente	0,650	0,552
	Coefficiente de correlación	0,980	0,995
Calibración WLS	ordenada	1,939	1,723
	pendiente	0,683	0,563
	Coefficiente de correlación	0,978	0,994

Como se puede ver, no hay diferencias significativas entre las características de las curvas de calibrado cuando se aplica WLS y OLS con respecto a la calibración teórica.

Además, la Tabla 7.2 define el intervalo de concentración analítica aplicable para cada sensor desechable comparado con la metodología tradicional con la que aquí se propone. El rango dinámico lineal para nitratos si empleamos la metodología previa era desde 1,6 a 620 mg·L⁻¹ (2 órdenes de magnitud) y ahora es desde 0,06 a 31.000 mg·L⁻¹ (6 órdenes). Para el caso de cloruros la metodología previa daba un rango analítico desde 6,2 a 360 mg·L⁻¹ (2 órdenes), cambiando con esta nueva metodología a un nuevo rango que comprende desde 0,2 a 17.800 mg·L⁻¹ (5 órdenes). Este considerable incremento en el rango dinámico lineal obtenido es la ventaja principal de la metodología propuesta.

Una posible desventaja de esta metodología es el hecho de que la precisión de las medidas disminuye con el perfil parabólico hacia los extremos del rango dinámico lineal, aunque estos valores son aceptables para sensores de tipo desechable.

Tabla 7.2. Comparación entre los intervalos de concentración aplicables para sensores de un solo uso cuando la calibración se lleva a cabo: a) empleando la parte central de la curva α vs log (actividad) (metodología previa); y b) toda la curva representada por el logit decimal (α) frente al log (actividad) (metodología propuesta).

Sensor	Metodología anterior	Metodología propuesta
Nitrato (mg·L ⁻¹)	1,6 - 620 ⁽¹⁾	0,06 - 31000
Cloruro (mg·L ⁻¹)	6,2 - 360 ⁽²⁾	0,2 - 17800

(1) de la referencia [8]; (2) de la referencia [5]. En la referencia 5 el rango está expresado de forma diferente pues se da en actividades y además se seleccionó en esa referencia como límite superior el punto de corte con el eje de abscisas. Aquí para unificar criterios con nitratos, hemos seleccionado como límite superior el último punto estudiado que pertenece al intervalo lineal.

Las constantes de coextracción global, $\log K_{\text{coextr}}$, calculadas a partir de la ordenada de las ecuaciones linealizadas 7.17 y 7.19 fueron de 9,3 para nitratos y 5,9 para cloruros. Los valores calculados empleando la aproximación de mínimos cuadrados para los puntos centrales del sigmoide²⁹ fueron de 9,06 y 4,41 respectivamente. La diferencia entre los valores encontrados en el caso de cloruro puede ser atribuida al valor del parámetro disturbador que en ese caso fue diferente de cero, produciendo una función que no es estrictamente lineal.

4.2. Aplicaciones analíticas

Con el propósito de evaluar la utilidad del método de linealización que se propone para sensores ópticos de aniones, se ha aplicado el método a dos sensores de un solo uso que ya han sido caracterizados y estudiados por nosotros previamente para la determinación de cloruro y nitrato. Para hacer esto, se seleccionaron muestras de aguas de diferente procedencia (grifo, pozo, río, nieve, mar) cuya concentración de cloruro y nitrato está en las nuevas zonas del rango dinámico lineal obtenido en el método de linealización propuesto. En la Tabla 7.3 se muestran los resultados obtenidos empleando el procedimiento descrito aquí para sensores desechables para cloruro y nitrato, comparados con un método de cromatografía iónica^{35,36} como método de referencia. La Tabla 7.3 incluye también los

valores medios para tres determinaciones de cada muestra y la desviación estandar de estas medidas.

Tabla 3. Determinacion de cloruro y nitrato en diferentes tipos de aguas, empleando la cromatografía iónica como método de referencia. Los resultados se obtuvieron a partir de tres réplicas del analisis.

Muestra	Sensor desechable (mg·L ⁻¹ Cl ⁻)	s	Método de referencia (mg·L ⁻¹ Cl ⁻)	s
Agua de grifo (Granada)	1,52	0,51	3,14	0,02
nieve (Sierra Nevada, Granada)	0,52	0,13	0,49	0,00
Agua de río (Chauchina, Granada,)	333,52	149,70	436,44	1,01
Agua de río (Láchar, Granada)	118,33	16,45	157,26	0,41
Agua de mar (Almuñecar, Granada)	23313	4322,20	21585,20	85,19
Agua de mar (Almería)	15639	7069	22735,82	105,41
Agua de río (Malahá, Granada)	1820	334	1484,75	4,95
Agua de lluvia (Granada)	0,34	0,11	1,00	0,01

Muestra	Sensor desechable (mg·L ⁻¹ NO ₃ ⁻)	s	Método de referencia (mg·L ⁻¹ NO ₃ ⁻)	s
Agua de grifo (Granada)	1,16	0,18	1,41	0,02
Nieve (Sierra Nevada, Granada)	0,14	0,04	0,14	0,03
Agua de pozo (Valderrubio, Granada)	207,76	24,23	154,08	0,50
Agua de pozo (Illora, Granada)	115,51	47,64	77,77	0,91
Agua de pozo (Otura, Granada)	27,86	3,72	30,89	0,06

Dado el amplio intervalo de concentraciones estudiado en la validación, se ha empleado el error relativo cuadrático medio (RMSRE) como característica para evaluar la capacidad de predicción de la calibración propuesta en relación con las concentraciones de referencia. El RMSRE fue calculado de mediante la expresión:

$$\text{RMSRE} = \sqrt{\frac{1}{N} \sum \left(\frac{\text{conc}_{\text{estimada}} - \text{conc}_{\text{referencia}}}{\text{conc}_{\text{referencia}}} \right)^2} \quad (7.21)$$

donde N es el número de referencias (número de muestras que se utilizan en la validación) en el conjunto del ensayo. Los valores que se obtuvieron para el conjunto de datos de la Tabla 3 son 0,35 y 0,28 para el sistema analítico de nitrato y cloruro, respectivamente. En conclusión, los resultados obtenidos para ambos métodos coinciden, lo que corrobora la validez de las suposiciones hechas en esta metodología de linealización.

5. Conclusión

Hemos establecido un simple modelo matemático lineal que se ha aplicado a membranas sensoras de aniones que se basan en el empleo de química ionóforo-cromoionóforo y trabajan por un mecanismo de coextracción. Esta metodología permite una determinación de las muestras directa y rápidamente sin la necesidad de operaciones preliminares, haciendo que el rango de aplicación se incremente hasta seis órdenes de magnitud en la concentración analítica, permitiendo la medida directa de muestras con contenidos de analito extremos. En los dos ejemplos que hemos estudiado, sensores desechables para nitrato y cloruro, ha sido posible el análisis de muestras de nieve y agua de mar. Esta nueva linealización de la curva respuesta para sensores ópticos desechables incrementa la viabilidad de este tipo de sensores ópticos. Además, esta metodología de linealización puede ser de interés para todos los formatos de sensado que se basen en mecanismos tipo ionóforo-cromoionóforo como son los sensores tipo sonda o flujo.

6. Bibliografía

1. Spichiger-Keller, U. E. *Chemical Sensors and Biosensors for Medical and Biological Applications*, 1 ed.; Wiley-VCH: Weinheim, 1998; Capítulo 6.

-
2. Spichiger-Keller, U. E.; Freiner, D.; Bakker, E.; Rosatzin, T.; Simon, W. *Sens.Actuators B* **1993**, *11*, 263-71.
 3. Tan, S. S. S.; Hauser, P. C.; Wang, K.; Fluri, K.; Seiler, K.; Rusterholz, B.; Suter, G.; Krüttli, M.; Spichiger-Keller, U. E.; Simon, W. *Anal.Chim.Acta* **1991**, *255*, 35-44.
 4. Ceresa, A.; Quin, Y.; Peper, S.; Bakker, E. *Anal.Chem.* **2003**, *75*, 133-40.
 5. Tan, S. S. S.; Hauser, P. C.; Chaniotakis, N. A.; Suter, G.; Simon, W. *Chimia* **1989**, *43*, 257-61.
 6. Lump, R.; Reichert, J.; Ache, H. J. *Sens.Actuators B* **1992**, *7*, 473-75.
 7. Capitán-Vallvey, L. F.; Guerrero, E. A.; Merelo, C. B.; Ramos, M. D. F. *Anal.Bioanal.Chem.* **2004**, *380*, 563-69.
 8. Capitán-Vallvey, Luis Fermin; Arroyo-Guerrero, Eduardo; Fernandez-Ramos, Maria Dolores; Santoyo-Gonzalez, F. *Anal.Chem.* **2005**, *77*, 4459-66.
 9. Demuth, C.; Spichiger-Keller, U. E. *Anal.Chim.Acta* **1997**, *355*, 259-68.
 10. Nezel, T.; Zhylyak, G.; Mohr, G. J.; Spichiger-Keller, U. E. *Anal.Sci.* **2003**, *19*, 551-56.
 11. Hong, Y. K.; Cha, G. S.; Shin, D. S.; Nam, H. *Bull.Korean Chem.Soc.* **1994**, *15*, 836-41.
 12. Kuratli, Matthias; Badertscher, Martin; Rusterholz, Bruno; Simon, Wilhelm *Anal.Chem.* **1993**, *65*, 3473-79.
 13. Behringer, C. *Anal.Chim.Acta* **1990**, *233*, 41-47.

14. Hisamoto, H.; Miyashita, N.; Watanabe, K.; Nakagawa, E.; Yamamoto, N.; Suzuki, K. *Sens.Actuators B* **1995**, *29*, 378-85.
15. Bakker, E.; Bühlmann, P.; Pretsch, E. *Chemical Rev.* **1997**, *97*, 3083-132.
16. Laba, C.; Haas, H.; Jodkowski, J.; Lange, A. *Arch.Immun. Ther.Exper.* **1986**, *34*, 111-27.
17. Plikaytis, B. D.; Turner, S. H.; Gheesling, L. L.; Carlone, G. M. *J.Clin.Microbiol.* **1991**, *29*, 1439-46.
18. Clark, James A.; El Shaarawi, Abdul *Appl.Environ.Microbiol.* **1993**, *59*, 380-88.
19. Hurlbut, T. A., III; Littenberg, B. *Am.J.Clin.Pathol.* **1991**, *96*, 582-88.
20. de Aguiar, P. F.; Bourguignon, B.; Khots, M. S.; Penninckx, W.; Massart, D. L. *Quim.Anal.* **1993**, *12*, 177-82.
21. de Aguiar, P. F.; Jimidar, M.; Massart, D. L. *Acta Chromatogr.* **1997**, *7*, 35-48.
22. Bühlmann, P.; Pretsch, E.; Bakker, E. *Chem.Rev.* **1998**, *98*, 1953-687.
23. Spichiger-Keller, U. E. *Chemical Sensors and Biosensors for Medical and Biological Applications*, 1 ed.; Wiley-VCH: Weinheim, 1998.
24. Barker, S. L. R.; Shortreed, M. R.; Kopelman, R. *Anal.Chem.* **1997**, *69*, 990-95.
25. Bühlmann, P. *Chem.Rev.* **1998**, *98*.
26. Seiler, K.; Wang, K.; Bakker, E.; Morf, W. E.; Rusterholz, B.; Spichiger-Keller, U. E.; Simon, W. *Clin.Chem.* **1991**, *37*, 1350-55.

-
27. Lerchi, M.; Bakker, E.; Rusterholz, B.; Simon, W. *Anal.Chem.* **1992**, *64*, 1534-40.
 28. Bakker, E.; Willer, M.; Pretsch, E. *Anal.Chim.Acta* **1993**, *282*, 265-71.
 29. Capitán-Vallvey, L. F.; Fernández-Ramos, M. D.; Alvarez de Cienfuegos, P. *Anal.Chim.Acta* **2002**, *451*, 231-41.
 30. Rodbard, D.; Hutt, D. M. Radioimmunoassay and related procedures in medicine. Proceedings of the Symposium, Istanbul, 1973. 1974, 165-92.
 31. O'Neill, S.; Conway, S.; Twelmeyer, J.; Egan, O.; Nolan, K.; Diamond, D. *Anal.Chim.Acta* **1999**, *398*, 1-11.
 32. Seiler, K.; Simon, W. *Anal.Chim.Acta* **1992**, *266*, 73-87.
 33. Capitán-Vallvey, L. F.; Fernández-Ramos, M. D.; Alvarez de Cienfuegos, P.; Santoyo-Gonzalez, F. *Anal.Chim.Acta* **2003**, *481*, 139-48.
 34. Meier, P. C. *Anal.Chim.Acta* **1982**, *136*, 363-68.
 35. Tabatabai, M. A.; Dick, W. A. *J.Environ.Qual.* **1983**, *12*, 209-13.
 36. Lessig, Uwe *Lebensmittel.Gericht.Chem.* **1985**, *39*, 135-38.

CAPÍTULO 7

DISCUSION DE RESULTADOS

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En esta Tesis Doctoral se han estudiado diferentes estrategias para el desarrollo de sensores ópticos desechables para la determinación de aniones, principalmente en aguas naturales. Estos sensores se han basado en la medida de una propiedad óptica fácil de medir, como es un cambio de color, que cuantificamos midiendo la absorción de radiación visible mediante el empleo de un simple espectrofotómetro.

Previamente al trabajo presentado en esta Tesis Doctoral, se han puesto las bases para la preparación de membranas y la metodología de medida, habiéndose desarrollado por este grupo de investigación sensores desechables para la determinación de diferentes cationes, en diversos tipos de muestras, consiguiendo sensores con buenas prestaciones y características analíticas.

Este estudio para el desarrollo de sensores para aniones, supone un reto mayor en el desarrollo de sistemas rápidos de análisis, dada la dificultad que surge debido a que las interacciones que se

dan en el reconocimiento de aniones son mucho más débiles e inespecíficas que las interacciones para el reconocimiento de cationes, debido a la propia naturaleza del anión y a sus características especiales. Dificultad que aumenta cuando se pasa de un anión monoatómico como es el cloruro, a uno tetra-atómico como puede ser el nitrato, o incluso un anión orgánico poliatómico de mucho mayor volumen y que posee una disposición geométrica más complicada aún, como es el caso del citrato, lo que hace más difícil el reconocimiento de la misma por una molécula receptora de aniones. Todas estas dificultades son las que justifican que la química de reconocimiento de aniones este actualmente menos desarrollada que la de cationes, existiendo en la actualidad pocos receptores artificiales para aniones que se hayan demostrado efectivos en la práctica.

Entre las características especiales de los aniones encontramos: 1) su carga negativa; 2) el tamaño del anión, que es mucho mayor que el de un catión isoelectrónico, lo que supone una menor relación carga/radio y, por tanto, que las interacciones electrostáticas sean mas débiles (estas disminuyen con el cuadrado de la distancia), originando constantes de estabilidad menores; 3) su alta polarizabilidad; 4) el que son habitualmente sensibles al pH, perdiendo su carga negativa al disminuir el pH, lo que supone que los receptores deberán trabajar entre unos márgenes de pH dados; 5) las energías de hidratación son muy fuertes, y como consecuencia de ello, van a interactuar mucho con disolventes polares. Esto se traduce en que un receptor para aniones va competir difícilmente con el agua, si se encuentra en un medio acuoso; 6) los aniones poseen un amplio rango de geometrías, por lo que son necesarios requerimientos geométricos grandes, necesitándose receptores que tengan una disposición geométrica adecuada para poder interactuar complementariamente con los grupos funcionales del anión.

En este Capítulo se va a tratar de forma conjunta y esquemática los principales aspectos relacionados con los diferentes sensores estudiados y presentados pormenorizadamente en los capítulos anteriores, los analitos que se han determinado, las características analíticas de cada sensor, el tratamiento de datos y los resultados obtenidos. Por último, se expondrán las conclusiones obtenidas en esta Memoria de Doctorado.

1. Estrategias de sensado usadas

Se han utilizado en esta Memoria de Doctorado cuatro estrategias diferentes y de complejidad creciente para el diseño de los sensores desechables presentados. La primera de ellas se basa en el uso de una reacción específica como es la de diazotación y copulación para nitritos. Este u otro tipo de reacción específica suele presentarse con poca frecuencia en aniones. Suelen ser reacciones bien conocidas y utilizadas como la que aquí se propone para nitrito, que aquí se formula en un formato de membrana desechable.

Una segunda estrategia se basa en el empleo de receptores de tipo ácido Lewis. La presencia de centros tipo ácido Lewis, deficientes en electrones, en una molécula receptora hace que pueda enlazar aniones debido a un solapamiento de orbitales que da lugar a una interacción enlazante. Como caso para estudio se ha seleccionado un derivado organoestánnico como receptor para cloruro.

Una tercera estrategia emplea receptores basados en interacciones por enlace de hidrógeno. Al ser los enlaces de hidrógeno direccionales, se pueden utilizar para diseñar receptores con configuraciones específicas capaces de diferenciar entre analitos huéspedes con diferente geometría o lo que es lo mismo con diferentes requerimientos de enlace de hidrógeno en disolventes no polares. Se ha estudiado como ejemplo, el empleo de un receptor tipo amida capaz de coordinarse con el sistema de electrones π del nitrato.

Como última estrategia, se ha combinado la interacción por enlace de hidrógeno con las interacciones electrostáticas, de forma que se produzcan unas interacciones muy selectivas que permitan el reconocimiento de aniones poliatómicos complejos como es el caso de los carboxilatos. Un caso característico es el empleo de sales de guanidinio para reconocimiento de aniones en forma de Y como son los carboxilatos, debido a su peculiar forma de unión que se caracteriza por dos enlaces de hidrógeno paralelos además de la atracción electrostática. Hemos empleado un receptor trisguanidinio para el reconocimiento de citrato a través de una interacción complementaria tanto en geometría como en carga.

1.1. Sensor basado en el uso de reacciones específicas. Sensor desechable para la determinación de nitrito

En este tipo de sensores desechables, el analito sufre una reacción mediante la cual queda incorporado o transformado en un nuevo compuesto que deberá quedar retenido sobre la membrana sensora produciéndose una modificación de sus propiedades ópticas, lo que permitirá su determinación directa sobre la membrana.

En este caso, el nitrito actúa como grupo nitrosante permitiendo que se origine un azo derivado, $R-N=N-R'$, en el que R y R' son grupos aromáticos, lo que estabiliza al grupo azo al hacerlo formar parte de un sistema deslocalizado extenso y a la vez hace que tenga color al absorber radiación en la zona del visible. En este caso se formará un azo derivado aromático mediante una reacción de sustitución electrofílica en un compuesto aromático, la N-1-(naftil)etilendiamina, por una sal de diazonio que se obtiene a su vez por reacción de una amina, la sulfanilamida, con el analito en medio ácido, esto es el ácido nitroso. La retención del azoderivado de color violáceo formado en la membrana se consigue por cambio iónico, pues se utiliza un material de membrana con carga negativa fija como es el Nafión y el azoderivado presenta carga positiva por protonación al pH de trabajo.

Entre las características generales del sensor para la determinación de nitrito en aguas, destacan las siguientes: Es un sensor de tipo irreversible, debido a la estabilidad del azoderivado formado. El tiempo necesario para alcanzar el equilibrio es elevado y oscila entre 45 y 90 minutos. Se trata de un sensor de preconcentración, tipo dosímetro, lo que va a permitir determinar concentraciones muy bajas de analito, llegando a tener un límite de detección de sólo $0,8 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, aunque ello implica un aumento en el tiempo de contacto entre el sensor desechable y la disolución problema, que es de 90 minutos. Se ajusta a un modelo de respuesta lineal con la concentración, y tiene un rango dinámico lineal pequeño (2 órdenes de magnitud) si se compara con los sensores basados en ionóforos, que pueden variar entre 3 y 6 órdenes de magnitud como se ha visto en los capítulos previos. El parámetro analítico empleado es la absorbancia, medida en un espectrofotómetro convencional.

1.2. Sensores basados en receptores

Antes hemos comentado que las tres estrategias restantes se basan en el empleo de diferentes receptores para aniones (basados en interacciones ácido Lewis, enlace de hidrógeno y enlace de hidrógeno más interacciones electrostáticas). Para el desarrollo de sensores desechables los receptores se han situado en una membrana hidrófoba. Es por ello por se les ha denominado habitualmente ionóforos a los receptores utilizados en esta Memoria de Doctorado, pues la reacción de interacción con el analito aniónico es la que permite que atraviesen la membrana y originen la respuesta óptica a través de la reacción en el seno de la membrana tridimensional.

La interacción de los analitos con los ionóforos no genera ninguna respuesta óptica por lo que se recurre al acoplamiento de un indicador ácido-base lipofilizado, denominado cromoionóforo, que pone de manifiesto el proceso de reconocimiento del analito mediante un mecanismo de coextracción.

Este mecanismo de coextracción es más complejo que el basado en reacciones específicas estudiado para nitrito y se puede modelar como se ha indicado en los capítulos correspondientes, demostrándose que responden a actividad en analito, y no a concentración, es decir, responden a la cantidad de analito que esta disponible para interactuar con otras especies, no a la cantidad total de analito en la disolución. Todo ello siempre que la actividad protónica se mantenga constante, pues realmente responden al producto de actividades de analito y protones.

El parámetro analítico que utilizamos en este tipo de sensores desechables no es la absorbancia, sino el grado de desprotonación (α) del cromoionóforo:

$$\alpha = \frac{A - A_{\text{acido}}}{A_{\text{base}} - A_{\text{acido}}}$$

Para obtener el grado de desprotonación, será necesario introducir durante unos minutos, menos de cinco, un sensor desechable en un tubo de poliéster que contiene NaOH, de forma que todo el cromoionóforo pase a forma básica (A_{base}). A continuación, sacamos el sensor del tubo y lo introducimos durante unos minutos en otro tubo conteniendo analito en presencia de una disolución

reguladora de pH. Conforme crezca la concentración de analito, el color de la zona sensora irá cambiando progresivamente al color de la forma ácida (A). Por último, se introduce el sensor en un tubo que contiene una disolución de ácido fuerte con lo que la membrana presenta el color de la forma totalmente protonada ($A_{\text{ácido}}$) al estar completamente desplazado el equilibrio. Con estos valores de absorbancia se calcula el parámetro analítico α que representado frente $\log a_{\text{analito}}$ permite obtener la función de calibrado que es de tipo sigmoideal.

Atendiendo a este modelo de sensor basado en el empleo de ionóforos, hemos desarrollado sensores para la determinación de cloruro y nitrato en aguas y citrato en refrescos y fármacos.

2. Composición de los sensores

Los sensores desarrollados en este estudio están constituidos por una lámina de un material polimérico transparente que presenta una zona reactiva que contiene todos los reactivos necesarios para que por simple inmersión o deposición de la muestra se produzca una respuesta de tipo óptico la cual se puede medir con un espectrofotómetro convencional y relacionarla con su concentración.

La zona reactiva del sensor de nitrito que está basado en reacciones específicas, está formada por una membrana de Nafión que incluye como reactivos un compuesto nitrosante, la sulfanilamida y un reactivo copulante, la N-1-(naftil)etilendiamina.

Para los sensores basados en sistemas ionóforo-cromoionóforo, la zona activa del sensor se compone de una matriz polimérica de PVC, un plastificante que actúa regulando la permeabilidad y movilidad dentro de la matriz polimérica, un ionóforo selectivo del anión y un cromoionóforo encargado de facilitar una respuesta óptica susceptible de ser medida, como es la absorbancia a una longitud de onda dada.

En la Tabla 8.1 se recogen los diferentes componentes de la zona activa de los sensores estudiados y en la Tabla 8.2 se indican las estructuras de los distintos ionóforos, cromoionóforos y reactivos utilizados.

Tabla 8.1. Reactivos utilizados en la preparación de los diferentes sensores estudiados.

Nombre del reactivo	Tipo de reactivo	Sensor
Cloruro de trioctil estaño	Ionóforo	cloruro
2,16,18,32,45,47-hexaetil-5,13,21,29,34,42,44,46,48-nonaazaheptaciclo[15.15.11.13,31.17,11.115,19.123,27.136,40]-octatetraconta-1,3(45),7(48),8,10,15(47),16,18,23(46),26,31,36,37,39-pentadecaeno-6,12,22,28,35,41-hexona (HNOPH)	Ionóforo	nitrato
1,3,5-bencenotrimetanamina N,N',N''-tris(4,5-dihidro-1H-imidazol-2-il) 2.4.6-trietil trihidrocloruro (RCT)	Ionóforo	citrato
Sulfanilamida	Compuesto nitrosante	nitrito
N-(1-naftil)-etilendiamina	Reactivo copulante	nitrito
4,5, dibromofluoresceina octadecil ester	Cromoionóforo	cloruro
1,2-Benzo-7-(dietilamino)-3-(octadecanoilimino)fenoxacina (Azul Nilo lipifilizado)	Cromoionóforo	nitrato, citrato
Tributilfosfato (TBP)	Plastificante	nitrato, citrato
Bis(2-etilhexil)sebacato (DOS)	Plastificante	cloruro
Cloruro de polivinilo (PVC) de alto peso molecular	Polímero formador de membrana	cloruro, nitrato, citrato
Nafión 5% p/p	Polímero formador de membrana	nitrito

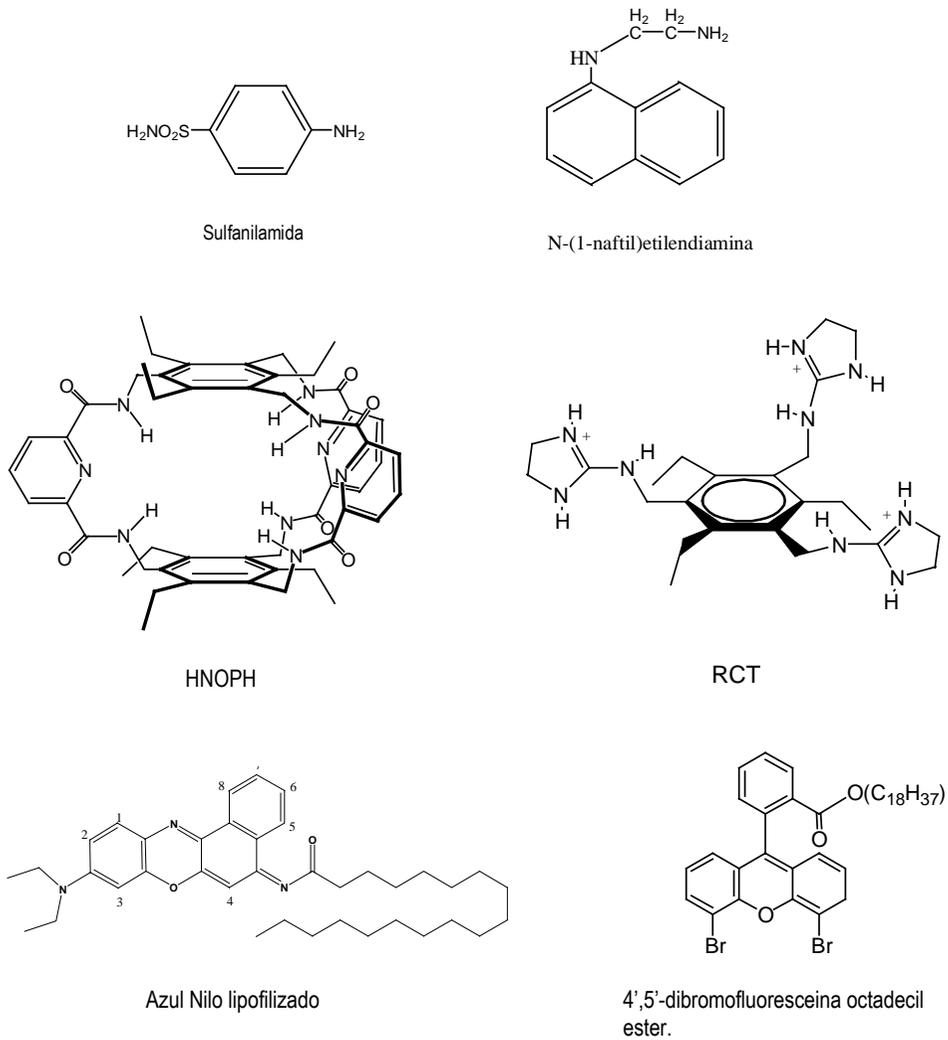


Figura 8.1. Estructura de los diferentes ionóforos, cromoionóforos y reactivos empleados en los sensores desechables estudiados.

3. Resultados analíticos

3.1. Verificación y calibración de instrumentación y equipos (aseguramiento de la calidad)

En la presente Memoria se ha llevado a cabo el control de aquellos equipos cuyo mal estado o funcionamiento pudiera ser fuente de un error sistemático que pudiera afectar a los resultados y consecuentemente a la inferencia que de ellos se pudiera llevar a cabo. De entre los varios equipos susceptibles de ser sometidos a un control de este tipo se seleccionaron aquellos que a nuestro juicio son más importantes; estos son: a) balanza analítica, b) micropipetas c). pHmetro y d) espectrofotómetro de diodos en fila.

La balanza analítica, como instrumentación fundamental en la trazabilidad de cualquier magnitud mensurable en un laboratorio de análisis químico, fue uno de los equipos sometido a un programa de control periódico de verificación. Para ello, se ha utilizado como patrón, un juego de pesas certificadas de 1, 10 y 200 mg y se ha verificado periódicamente tomando diez medidas del patrón de referencia y realizándose los correspondientes diagramas de Shewhart que me han permitido en todo momento tener la balanza bajo control estadístico.

Las micropipetas empleadas para la dispensación de los volúmenes con los que habitualmente se ha trabajado en la presente Memoria, han sido sometidas a un control periódico bimensual con objeto de garantizar los resultados que de su uso se pudieran obtener. Dicho control se ha efectuado de forma interna en el laboratorio. Para la calibración de las micropipetas se han realizado determinaciones gravimétricas con agua desionizada a temperatura controlada. La verificación efectuada a cada una de las micropipetas consideradas estuvo en todo momento bajo control estadístico, no detectándose en ningún momento la existencia de un mal funcionamiento de las mismas que pudiera traducirse en errores en el posterior uso que de ellas se hizo.

El pHmetro se verificó previo a su primer uso del día y se calibró con tampones de pH 4,0 y 7,0 una vez a la semana o en caso de fallo en la verificación diaria.

El espectrofotómetro de diodos en fila, HP 8453 ChemStation fue sometido cada seis meses a los diferentes test de verificación propuestos por el fabricante. Estos test fueron los siguientes:

1. Autotest del sistema para comprobar si se superan las intensidades mínimas establecidas en el sistema para determinados rangos de longitud de onda.
2. Precisión de la longitud de onda (test de líneas de deuterio), para comprobar la exactitud de las longitudes de onda.
3. Test de estabilidad. (En este test el sistema comprueba que la absorbancia a una longitud de onda fija no varía con el tiempo en más de 0.001 A.U.)
4. test de ruido fotométrico y de línea base.

En caso de que no se superase algún test, se procedió a seguir las instrucciones recomendadas por el fabricante (cambio de lámparas, limpieza de lentes, etc...).

3.2. Optimización de la respuesta del sensor

Se han realizado diferentes estudios para conocer como influyen los distintos factores que pueden afectar a la señal analítica. Estos parámetros experimentales se pueden clasificar en dos grupos: parámetros relacionados con el diseño y composición de la membrana y parámetros relacionados con el proceso de equilibración entre la disolución de la muestra y el sensor. En las Tablas 8.2 y 8.3 se indican algunos de estos factores y sus valores óptimos.

Tabla 8.2. Parámetros relacionados con el diseño y composición de la membrana

	NITRITO	CLORURO	NITRATO	CITRATO
volumen de cóctel	30 μ L	20 μ L	15 μ L	15 μ L
velocidad de giro	300 rpm	180 rpm	180 rpm	180 rpm
tiempo de secado	20 min	10 min	1 min	60 min
forma de secado	al aire en lugar oscuro	desecador a T ^a ambiente	desecador en atmósfera de THF a T ^a ambiente	desecador en atmósfera de THF a T ^a ambiente
color de la zona sensora	incolora	roja	roja	roja
espesor de la zona sensora	20 μ m	9,5 μ m	4,5 μ m	4,5 μ m
diámetro de la zona sensora	6 mm	6 mm	6 mm	6 mm

Tabla 8.3. Parámetros relacionados con el proceso de equilibración entre la disolución de la muestra y el sensor.

	NITRITO			CLORURO	NITRATO	CITRATO
Tipo de tira reactiva	irreversible			reversible	reversible	reversible
tiempo de contacto en disolución	45 min	60 min	90 min	6 minutos	5 minutos	40 s
agitación de muestra	agitación magnética			sin agitación	sin agitación	sin agitación
pH de trabajo	2			2	6	4
color desarrollado al reaccionar con el analito	incolore a violáceo			rojo a amarillo - anaranjado	rojo a azul	rojo a azul

Otro factor estudiado en relación con el proceso de equilibración entre la disolución de la muestra y el sensor es el estudio de interferentes o el estudio de la selectividad, dependiendo del modelo de sensor empleado.

Para el sensor de nitrito ha consistido en un estudio de interferentes, comprobándose como inflúa la presencia de diferentes aniones y cationes a varios niveles de concentración para una disolución de nitrito de $0,1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. Se han encontrado tolerancias para NO_3^- , SO_4^{2-} , CO_3^{2-} , HCO_3^- , Cl^- , PO_4^{3-} , $\text{Ca}(\text{II})$, $\text{Mg}(\text{II})$, $\text{Na}(\text{I})$, $\text{K}(\text{I})$, $\text{Pb}(\text{II})$, $\text{Zn}(\text{II})$, $\text{Cd}(\text{II})$, $\text{Hg}(\text{II})$, $\text{Cu}(\text{II})$, $\text{Ni}(\text{II})$, $\text{Co}(\text{II})$, $\text{Mn}(\text{II})$, $\text{Al}(\text{III})$, $\text{Cr}(\text{III})$ y (VI) , y $\text{Fe}(\text{III})$ mayores de $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, que es la máxima cantidad ensayada. La única interferencia que se presentó fue del hipoclorito y el cromato, con una tolerancia para ambos iones de $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, ya que estos oxidan las aminas presentes en la membrana.

Para los sensores basados en sistemas ionóforo-cromoionóforo, la selectividad se puede definir como la capacidad de un sensor desechable para extraer a la membrana exclusivamente el analito y para discriminar especies interferentes que respondan originando el mismo tipo de señal. La selectividad se define mediante el coeficiente de selectividad K_{ij}^{opt} de forma análoga a los sensores de tipo electroquímico (ISE).

Para establecer la selectividad en este tipo de sensores se utiliza el método de las disoluciones separadas^{1,2}, dicho método consiste en establecer la respuesta del interferente frente al mismo sensor, para así conocer el valor de la constante de equilibrio $K_e^{\text{JL-P}}$ y, despejando de su correspondiente ecuación, obtener el valor de la constante de selectividad K_{ij}^{opt} . En el caso de que el interferente presente la misma carga y estequiometría que el analito, se puede calcular gráficamente el coeficiente de selectividad como la distancia entre la curva respuesta del analito y la curva del interferente, siempre y por convenio, a un grado de protonación de 0,5.

A continuación se recogen de modo global en la Tabla 8.4 las diferentes constantes de selectividad encontrados para los sensores en estudio en esta Tesis Doctoral.

Para el sensor desechable de cloruro, los valores de coeficiente de selectividad $K_{\text{Cl}^-, j^{z-}}^{\text{opt}}$, que se obtienen supone alguna mejora respecto a los resultados publicados previamente para un sensor de membrana para cloruros en suero, el cual utiliza ese mismo ionóforo, pero emplea bis(1-butilpentil)adipato como plastificante, y obtiene unos coeficientes de selectividad de I^- (1,0), Br^- (0,3), NO_3^- (-1,8) y SO_4^{2-} (-2,8)³. Además, el uso de un ionóforo similar, el cloruro de triclohexil estaño,

combinado con el plastificante bis(2-etilhexil)sebacato, da lugar a una membrana con coeficientes de selectividad mas bajos: I⁻ (1,0), Br⁻ (0,5), NO₃⁻ (<-2,0)⁴.

Tabla 8.4. Coeficientes de selectividad $\log K_{i,j}$ para los sensores para diferentes aniones.

Anion	Sensor cloruro	Sensor nitrato	Sensor citrato
SCN ⁻	-	0,3 ± 0,08	-
ClO ₄ ⁻	-	0,3 ± 0,13	-
NO ₃ ⁻	-3,21	0	-
I ⁻	0,82	-0,97 ± 0,01	-
NO ₂ ⁻	-	-2,4 ± 0,13	-
Br ⁻	0,19	-2,3 ± 0,13	-
Cl ⁻	0	-3,8 ± 0,12	-1,1
HCO ₃ ⁻	-	-4,0 ± 0,12	-
AcO ⁻	-	-5,4 ± 0,13	-
SO ₄ ²⁻	-3,26	-5,3 ± 0,13	-
Tartrato	-	-	-0,93
PO ₄ ³⁻	-	-	-2,34
Benzoato	-	-	-0,74
Citrato	-	-	0

En el sensor de nitrato, llama la atención la baja selectividad para acetato comparándola con la selectividad de acetato encontrada para este mismo ionóforo en disolventes orgánicos con mezclas de CD₂Cl₂/CD₃CN (25:75 v/v) donde las constantes de asociación son 770 y 300 M⁻¹ para acetato y nitrato, respectivamente. En la misma línea, otros ionóforos con grupos amida calix[4]areno muestran una respuesta similar, así se encuentran valores de 370 y 200 M⁻¹ para los mismos iones en acetona-d₆⁵. En otros casos, la constante de asociación de ionóforos formadores de enlace de hidrógeno con nitrato es mayor que para acetato, así ocurre en el caso del ionóforo nicotinamida Pt (II) (K_{a1}: 230 M⁻¹; K_{a2}: 491 M⁻¹ para acetato en CD₃CN/DMSO-d₆ 3+1 v/v; K_{a1}: 562 M⁻¹; K_{a2}: 132 M⁻¹ para nitrato en CD₃CN)⁶, aunque la diferencia es mucho mayor en nuestro caso.

En el sensor desechable de citrato, la secuencia de selectividad con respecto a una tira reactiva sin receptor de citrato (serie de Hofmeister), cambia a: $\text{ClO}_4^- > \text{NO}_3^- > \text{citrato} > \text{benzoato} > \text{tartrato} > \text{Cl}^- > \text{PO}_4^{3-} > \text{CH}_3\text{COO}^- > \text{SO}_4^{2-}$ obteniéndose un considerable incremento de selectividad para citrato, debido a la interacción selectiva entre el receptor y el citrato, que está en concordancia con los datos que están publicados en bibliografía^{7,8}.

3.3. Parámetros de calidad

En este apartado hemos recogido los diferentes parámetros de calidad obtenidos en los sensores descritos en esta Memoria (Tabla 8.5).

Tabla 8.5. Parámetros de calidad.

Parámetro analítico	NITRITO			CLORURO	NITRATO	CITRATO
	absorbancia a 536 nm			absorbancia a 534 nm	absorbancia a 660 nm	absorbancia a 660 nm
Reproducibilidad intermembrana (% DER)	6,9	8,8	7,8	4,4	3,68	-
Reproducibilidad intramembrana (% DER)		-		6,4	1,39	5,7
Límite de detección	^a 2,7 $\mu\text{g L}^{-1}$	^b 1,4 $\mu\text{g L}^{-1}$	^c 0,8 $\mu\text{g L}^{-1}$	0,15 mM	0,022 mM	0,412 mM
Límite de cuantificación	^a 8,9 $\mu\text{g L}^{-1}$	^b 4,7 $\mu\text{g L}^{-1}$	^c 2,6 $\mu\text{g L}^{-1}$			
Rango dinámico lineal	^a 8,9-500 $\mu\text{g L}^{-1}$	^b 4,7-200 $\mu\text{g L}^{-1}$	^c 2,6-100 $\mu\text{g L}^{-1}$	0,15-24,68 mM	0,022-45,15 mM	0,412-17,7mM
Sensibilidad (b)	0,0034	0,0055	0,0105	-0,407	-0,288	-0,2149
Tiempo de vida		1 mes		1 mes	1 mes	3 semanas
Coste de un sensor (euros/sensor)		0,10		0,01	0,04	0,03

a. método de 45 minutos; b. método de 60 minutos; c. método de 90 minutos

El caso del sensor de nitrito, como se ha comentado anteriormente, es de preconcentración, lo que significa que la extensión de la reacción va aumentando con el tiempo de contacto y concomitantemente la señal analítica hasta llegar a un valor de saturación determinado por la cantidad

de reactivos en membrana. Debido a esta dependencia del tiempo de contacto entre membrana y problema se han caracterizado tres métodos analíticos para tres tiempos de contacto diferentes (45, 60 y 90 minutos). Conforme aumenta el tiempo de contacto se reduce tanto el límite de detección como el límite superior del rango dinámico lineal, manteniéndose la precisión en valores entre el 7 y el 9%. Esto supone que el método a utilizar se puede ajustar en función del contenido esperado en analito.

El sensor de cloruro esta basado en una química ionóforo-cromoionoforo, opera por equilibrio y presenta una respuesta de tipo sigmoideal. Como rango de medida hemos usado la relación lineal en el centro de la función sigmoideal de respuesta, la cual ha sido establecida como una recta mediante un ajuste por medio de mínimos cuadrados y como límite de detección se ha utilizado la intersección de la función de calibrado lineal anteriormente definida y una función lineal ajustada en la zona de mínima pendiente. El límite de detección se calculó por la intersección de ambas funciones, lo que dio un valor de 0,15 mM y el límite superior se obtuvo por la intersección de la función de calibrado con el eje de abscisas, resultando un valor de 24,7 mM. De esta manera, el rango de medida del sensor desechable propuesto para cloruro está comprendido entre 0,15 y 24,7 mM en actividades, lo que suponen dos órdenes de magnitud, aún cuando la zona de respuesta dinámica se extiende desde $8,1 \times 10^{-7}$ a 0,32 M en actividades. La precisión intramembrana del sensor oscila entre el 2 y el 5% mientras que usando cada vez un sensor diferente sube hasta un 6%; valores que consideramos aceptables al incluir la preparación de la membrana.

El sensor para nitrato se basa en el uso de un ionóforo más complejo que el de cloruro como se ha comentado más arriba, pero se ha utilizado analíticamente en un esquema ionóforo-cromoionóforo. No es igual, sin embargo, el esquema usado, pues en este caso el cromoionóforo es neutro y su forma ácida tiene carga positiva, mientras que en el de cloruro el cromoionóforo tiene carga negativa y su forma ácida es neutra, lo que comporta un distinto proceso de respuesta. La precisión intramembrana de este sensor desechable varía entre el 1,5 y el 3% mientras que la precisión intermembrana dependiendo de la concentración de nitrato determinada oscila entre un 1 y un 6%.

El sensor desechable desarrollado para citrato se basa en un ionóforo que opera por interacciones electrostáticas y enlace de hidrógeno y emplea un esquema analítico similar al de nitrato. En este caso, el rango lineal cubre tres órdenes de magnitud (entre 0,483 y 25,0 mM) en la

zona central de la función respuesta sigmoideal que se extiende desde 0,5 M hasta 10^{-6} M en concentraciones. En este caso, el sensor no se puede utilizar mas de una sola vez, pues aunque la membrana responde de forma reversible, el nivel de respuesta decrece con sucesivas medidas de un mismo sensor. La precisión expresada como repetibilidad sensor a sensor varia entre un 4 y un 8% dependiendo de la concentración de citrato analizada.

3.4. Validación del método analítico

La validación de un método analítico se ha llevado a cabo realizando una verificación de la exactitud del método mediante el estudio de sus dos componentes: estimación de la precisión y comprobación de la veracidad. La estimación de la precisión, se realiza como se ha descrito en puntos anteriores, calculando la desviación estándar relativa.

En esta Memoria, para los sensores desechables basados en ionóforos (cloruro, nitrato, citrato) la comprobación de la veracidad de los resultados obtenidos con los métodos propuestos se ha realizado mediante la comparación con los resultados obtenidos con un método de referencia aplicado a esas mismas muestras. Para el caso de la tira reactiva basada en el uso de reacciones específicas (nitrito) la validación se ha realizado, debido a la inexistencia de nitrito en las aguas ensayadas, haciendo uso de la metodología de adición de patrón.

3.5. Aplicaciones

Estos sensores desechables se han aplicado principalmente en aguas naturales de diversa procedencia (fuente, grifo, agua mineral, pozo, mar). Además, el sensor desechable para citrato se ha aplicado a su determinación en refrescos y algunos fármacos que lo contienen.

3.5.1. Resultados

Los resultados que se han obtenido para los diferentes sensores desechables, en las distintas muestras estudiadas se recogen en las siguientes Tablas 8.6, 8.7 y 8.8:

Tabla 8.6. Determinación de nitrato en diferentes muestras de agua (se añadieron 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ a todas las muestras)

Muestras de agua	Concentración obtenida del calibrado SC ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Concentración obtenida del calibrado AC ($\mu\text{g L}^{-1}$)	P-value (%)	$\bar{C} \pm s_{n-1}$
Fuente (Granada)	15,04	18,93	34,65	53,12 \pm 0,006
Mar (Almería)	21,76	21,56	93,91	57,11 \pm 0,017
Mineral (Benzoya)	14,75	15,98	65,10	53,38 \pm 0,036
Mineral (Lanjaron)	21,29	26,07	15,60	50,46 \pm 0,008
Grifo (Granada)	16,81	19,46	33,62	50,89 \pm 0,023
Grifo (Illora, Granada)	15,02	16,67	54,21	48,51 \pm 0,019
Pozo (Illora, Granada)	18,89	20,50	54,28	50,36 \pm 0,017

Los datos son el promedio de 3 calibrados independientes: SC calibrado estándar; AC adición estándar y YC (P-value). $\bar{C} \pm s_{n-1}$: concentración media para 3 \pm desviación estándar.

En el estudio del sensor para nitrato, se ha aplicado el método a muestras reales de agua de diferente procedencia (fuente, grifo, agua mineral, pozo y mar). Como las muestras no contenían nitrato, se les añadió una cantidad de este de 50 $\mu\text{g L}^{-1}$. En muchas muestras el contenido en nitrato se ha determinado directamente, mientras que en otras, como el agua de grifo, fue necesario previamente eliminar el hipoclorito presente mediante la adición de 2 g de carbón activo por litro de agua. Para la validación del método hemos utilizado el método de calibrado por adición de patrón.

Tabla 8.7. Determinación de cloruro en diferentes tipos de agua, empleando como método de referencia un método potenciométrico.

Muestra	Sensor desechable (mM Cl)	s	Metodo referencia (mM Cl)	s	P _{val} (%)
Agua de mar (Almuñecar, Granada)	498	12,73	479	20,41	34,5
Agua de mar (Almería)	555	76,59	493	12,04	11,0
Agua de grifo (Balanegra, Almería)	6,8	0,98	6,1	0,15	30,8
Agua de grifo (Almería)	0,8	0,32	0,83	0,02	72,0
Agua de pozo (Rebeque, Almería)	7,7	0,58	7,2	0,18	20,6
Agua de arroyo (Chauchina, Granada)	22,5	0,58	23,6	0,59	12,2

Tabla 8.8. Determinación de nitrato en diferentes tipos de agua, empleando como método de referencia uno voltamperométrico.

Tipo de muestra	Sensor desechable (mg/L)	s	Método referencia* (mg/L)	s	Pval (%)
Agua del rio Monachil (Monachil, Granada, España)	3,6	0,24	3,3	0,45	29,17
Agua del rio Genil (Granada, España)	3,1	0,25	2,8	0,24	31,62
Agua de fuente (Granada, España)	27,3	0,63	29	2,0	20,42
Agua de fuente (Granada, España)	4,1	0,33	4,37	0,02	21,10
Agua de fuente (Haza Grande, Granada, España)	54	2,24	54	4,1	90,65
Agua de fuente (Zujaira, Granada, España)	62	2,78	61	3,57	59,95
Agua de fuente (La Peza, Granada, España)	2,92	1,49	2,7	17,26	39,00
Agua de pozo (Illora, Granada, España)	20,4	0,29	23	1,71	14,3
Agua de aljibe (Illora, Granada, España)	91,8	5,26	87,9	0,94	27,20
Agua de pozo (Valderrubio, Granada, España)	201	33,5	200	12,1	96,09

Tabla 8.9. Determinación de citrato en refrescos y fármacos usando como método de referencia un test enzimático.

Tipo de muestra	Tira reactiva	s	Método referencia	s	P.val (%)
Refresco naranja	3,3 g/L	0,455	3,59 g/L	0,066	32,2
Eno Sal de frutas	0,51 g/g	0,056	0,47 g/g	0,005	27,6
Uralyt-Urato	0,74 g/g	0,017	0,71 g/g	0,017	14,1
Citrocil	0,52 g/g	0,019	0,50 g/g	0,033	42,0
Micalax	0,057 g/g	0,005	0,051 g/g	0,002	14,0

4. Linealización de curvas de respuesta analítica en sensores ópticos

Hemos visto como la función respuesta de los sensores basados en sistemas ionóforo-cromoionóforo, en las que se representa el parámetro analítico frente al logaritmo de la actividad de analito, tienen una forma sigmoide. Esto supone un problema para la calibración, pues solo la zona central del sigmoide puede ser asimilada a una línea recta y por ello es empleada como función de calibrado. De esta manera se pierde parte de la información analítica que la curva sigmoide contiene.

Para solucionar este inconveniente, se ha estudiado una linealización del sigmoide empleando una regresión logística, tal como se ha descrito en el Capítulo 7 de esta Tesis Doctoral. De esta manera conseguimos obtener una función del tipo $Y = A + B \cdot X$.

Las ventajas que presenta esta metodología de linealización respecto a la metodología sigmoideal previa, son principalmente:

- Se logra incrementar el rango de trabajo en varios órdenes de magnitud.
- Como consecuencia se logra mejorar el límite de detección pudiendo detectar analitos en cantidades mucho menores.
- Poder determinar muestras de modo directo evitando el uso de operaciones preliminares, (dilución, preconcentración, etc). Así por ejemplo, en la determinación de cloruros en aguas, se puede determinar el contenido en cloruro de un agua de lluvia y un agua de mar, utilizando el mismo calibrado y sin necesidad de diluir el agua de mar ni preconcentrar el agua de lluvia.

Se ha realizado el tratamiento matemático necesario para conseguir obtener la función logit que permite esta linealización, comprobándose que se ajusta a dicho modelo lineal, y se ha aplicado al caso concreto de dos sensores desechables para aniones, que hemos estudiado previamente por la metodología convencional; que son los sensores desechables para cloruro y para nitrato.

En la siguiente Tabla 8.10 se comparan los resultados obtenidos para ambos sensores empleando la metodología previa de respuesta sigmoideal y la metodología lineal propuesta. Se ha conseguido ampliar los rangos lineales de trabajo hasta en 6 órdenes de magnitud, como se puede ver en la Tabla comparativa.

Tabla 8.10. Comparación de resultados obtenidos empleando ambas metodologías.

	sensor nitrato		sensor cloruro	
	metod. sigmoidal	metod. logit	metod. sigmoidal	metod. logit
Ordenada en origen	-0,387	1,648	-0,654	1,946
Pendiente	-0,288	0,552	-0,407	0,650
Limite deteccion (mg/L)	1,63	0,06	6,2	0,2
Rango lineal (mg/L)	1,63 – 620	0,06-31000	6,2-360	0,2-17800

Para comprobar la validez de los resultados obtenidos en la nueva calibración lineal, se ha aplicado el método a nuevas muestras de aguas cuyos niveles en el analito a determinar estén en las nuevas zonas del rango. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 8.11

Tabla 8.11. Determinación de cloruro y nitrato en diferentes tipos de aguas aplicando la metodología de linealización, y empleando la cromatografía iónica como método de referencia.

Muestra	Sensor desechable (mg·L ⁻¹ Cl ⁻)	s	Método de referencia (mg·L ⁻¹ Cl ⁻)	s
Agua de grifo (Granada)	1,52	0,51	3,14	0,02
Nieve (Sierra Nevada, Granada)	0,52	0,13	0,49	0,00
Agua de río (Chauchina, Granada,)	333,52	149,70	436,44	1,01
Agua de río (Láchar, Granada)	118,33	16,45	157,26	0,41
Agua de mar (Almuñecar, Granada)	23313	4322,20	21585,20	85,19
Agua de mar (Almería)	15639	7069	22735,82	105,41
Agua de río (Malahá, Granada)	1820	334	1484,75	4,95
Agua de lluvia (Granada)	0,34	0,11	1,00	0,01

Muestra	Sensor desechable ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{NO}_3^-$)	s	Método de referencia ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{NO}_3^-$)	s
Agua de grifo (Granada),	1,16	0,18	1,41	0,02
Nieve (Sierra Nevada, Granada)	0,14	0,04	0,14	0,03
Agua de pozo (Valderrubio, Granada)	207,76	24,23	154,08	0,50
Agua de pozo (Illora, Granada)	115,51	47,64	77,77	0,91
Agua de pozo (Otura, Granada)	27,86	3,72	30,89	0,06

En las siguientes Figuras 8.1 y 8.2 se ilustra como han aumentado los rangos lineales de trabajo y en que zonas de ese rango se encuentran las aplicaciones ensayadas.

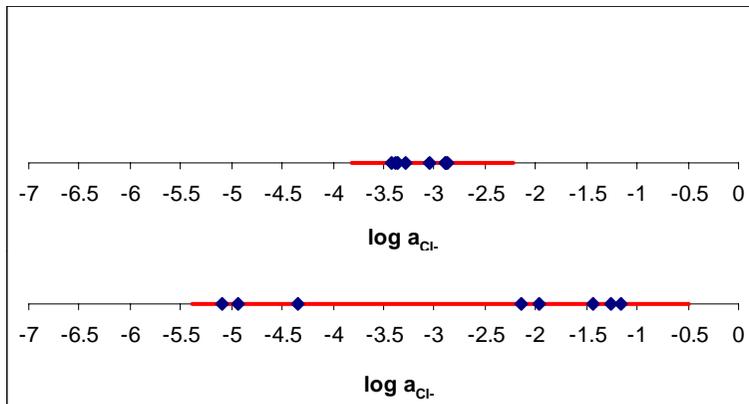


Figura 8.1. Rangos lineales de trabajo para la tira reactiva de cloruros. Arriba: rango con metodología previa. Abajo: rango con metodología de linealización propuesta. Los puntos azules señalan las muestras analizadas.

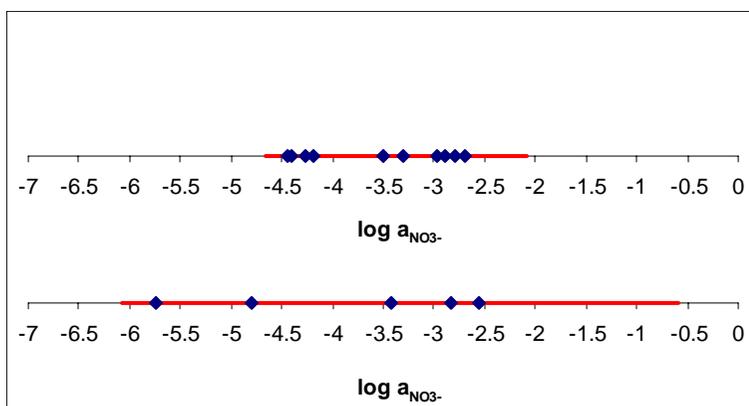


Figura 8.2. Rangos lineales de trabajo para la tira reactiva de nitrato. Arriba: rango con metodología previa. Abajo: rango con metodología de linealización propuesta. Los puntos azules señalan las muestras analizadas.

5. Bibliografía

1. IUPAC *Pure Appl.Chem.* **1976**, *48*, 127.
2. Spichiger-Keller, U. E. *Chemical Sensors and Biosensors for Medical and Biological Applications*, 1 ed.; Wiley-VCH: Weinheim, 1998.
3. Tan, S. S. S.; Hauser, P. C.; Wang, K.; Fluri, K.; Seiler, K.; Rusterholz, B.; Suter, G.; Krüttli, M.; Spichiger-Keller, U. E.; Simon, W. *Anal.Chim.Acta* **1991**, *255*, 35-44.
4. Hisamoto, H.; Miyashita, N.; Watanabe, K.; Nakagawa, E.; Yamamoto, N.; Suzuki, K. *Sens.Actuators B* **1995**, *29*, 378-85.

-
5. Sansone, Francesco; Baldini, Laura; Casnati, Alessandro; Lazzarotto, Marcio; Ugozzoli, Franco; Ungaro, Rocco *PNAS* 2002, 99, 4842-47.
 6. Chantelle, R. Bondy; Stephen, J. Loeb; Philip, A. Gale *Chem.Comm.* 2001, 2001, 729-30.
 7. Metzger, Axel; Lynch, Vincent M.; Anslyn, Eric V. *Angew.Chem.Int.Ed.* 1997, 36, 862-65.
 8. Metzger, A.; Anslyn, E. V. *Angew.Chem.Int.Ed.* 1998, 37, 649-52.

CONCLUSIONES

Conclusiones

Como resultado del trabajo realizado en esta Tesis Doctoral, se han obtenido las siguientes conclusiones:

1. Se han diseñado y optimizado diferentes sensores desechables de tipo óptico para determinar la concentración o actividad de diversos aniones. Estos sensores desechables se basan en la medida de absorción de radiación en el visible por transmisión y ofrecen buena reproducibilidad, en la mayoría con un tiempo de respuesta corto y se pueden considerar como una alternativa económica para obtener información analítica.
2. Se ha propuesto un sensor desechable irreversible para la determinación de nitrito en aguas, haciendo uso de una membrana de Nafión y empleando como reactivos los que se emplean en la reacción clásica de diazotación de la sulfanilamida y posterior copulación con

N-(1-naftil)etilendiamina. La medida del color que se produce en la zona sensora debido a la formación de un azoderivado permite cuantificar nitrito por medidas directa de absorción de radiación. Ajustando el tiempo de equilibración de la tira en la disolución problema se puede lograr una sensibilidad adecuada al tipo de problema que se presente, llegando a los niveles requeridos para aguas.

3. Se ha desarrollado un sensor desechable óptico reversible para la determinación de cloruro en aguas naturales de diversa procedencia basado en el empleo de un receptor de tipo ácido Lewis. El esquema analítico emplea un sistema de coextracción de cloruro e iones hidrógeno en la zona sensora, que se compone de una membrana plastificada de cloruro de polivinilo e incorpora como ionóforo cloruro de trioctil estaño y como cromoionóforo la 4',5'-dibromofluoresceína octadecil ester. Presenta un rango dinámico lineal de 0,15 - 24,68 mM y una desviación estándar relativa para un nivel de concentración medio de 4,4 % y 6,4% utilizando la misma membrana o bien membranas diferentes, respectivamente. La membrana tiene suficiente selectividad para la determinación de cloruro en aguas naturales y puede ser aplicada satisfactoriamente a la determinación de este ión en aguas de diferente procedencia.
4. Usando un sistema ionóforo-cromoionóforo, se ha desarrollado un sensor óptico reversible para la determinación de nitrato empleando un ionóforo artificial basado en un sistema de reconocimiento receptor-huésped, basado en interacciones por enlace de hidrógeno, de simetría C_3 basado en amidas. Como cromoionóforo se empleó el 1,2-benzo-7-(dietilamino)-3-(octadecanoilimino)fenoxacina. La membrana sensora trabaja por coextracción ofreciendo una señal analítica fácil de medir. Este sensor desechable, responde a nitratos de forma rápida, con un tiempo de respuesta típico de 5 minutos y que es reversible sobre un amplio rango dinámico (26 μ M - 63 mM), obteniéndose una reproducibilidad sensor a sensor de 3,68% como desviación estándar relativa, expresada como $\log a_{NO_3^-}$ y del 1,39% para medidas repetidas con el mismo sensor. La utilidad del sensor óptico fue comprobado para el análisis de nitrato en diferentes tipos de aguas naturales (río, pozo, fuente), validándose los resultados frente a un método de referencia. El método propuesto es rápido, económico, selectivo y sensible y emplea instrumentación convencional.
5. Se ha caracterizado un sensor óptico desechable para la determinación de citrato, basado en un sistema de reconocimiento anfitrión-huésped, por parte de un receptor artificial tipo

guanidinio donde se combinan la interacción por enlace de hidrógeno con las interacciones electrostáticas. Se ha puesto en práctica en una membrana transparente que actúa por coextracción, ofreciendo una señal analítica fácil de medir. Como cromóforo se ha empleado el 1,2-benzo-7-(dietilamino)-3-(octadecanoilimino)fenoxacina. Este sensor desechable responde de forma rápida, en 40 s, y reversible a citrato en un rango dinámico entre 0,779 a 25,0 mM con una reproducibilidad sensor a sensor de 5,7 % como $\log a_{\text{cit}}$, en el medio del rango lineal. El desarrollo del sensor óptico de un solo uso ha sido chequeado en el análisis de citrato en refrescos y medicamentos, validándose los resultados frente a un método de referencia.

6. Se ha desarrollado un modelo matemático lineal simple que se ha aplicado a membranas sensoras de aniones, linealizando la habitual función respuesta de tipo sigmoidal, lo que permite una determinación de las muestras de forma directa y rápida sin la necesidad de operaciones preliminares. Esto hace que el rango de aplicación se incremente hasta seis órdenes de magnitud en la concentración analítica, permitiendo la medida directa de muestras con contenidos de analito extremos.
7. Los sensores desechables desarrollados en la presente Memoria se han aplicado a la determinación de los diferentes aniones (nitrito, cloruro y nitrato) en muestras de agua de grifo, pozo, mineral, fuente, río, lluvia, nieve y de mar, sin necesidad de tratamiento previo de las muestras en ningún caso, salvo dilución en algún caso y adición de disolución reguladora del pH. En el caso de citrato se ha aplicado a su determinación en muestras de fármacos y en refrescos.
8. En todos los casos, el coste de los sensores de un solo uso desarrollados se encuentran entre 1 y 10 céntimos de euro, considerando solo materiales y el tiempo de vida se encuentra alrededor de un mes y medio.
9. En conclusión, es posible el desarrollo de sensores desechables con buenas características para la determinación de los aniones considerando su sensibilidad, simplicidad de uso, rapidez y bajo costo.

ANEXO 1

SÍNTESIS DE REACTIVOS

1. Reactivos empleados para síntesis

- Cloruro de 5-amino-9-(dietilamino)benzo[a]fenoxacin-7-io. (cloruro de azul Nilo). (Sigma-Aldrich Química S.A., Madrid, España).
- Hidróxido de sodio (Panreac, Barcelona, España).
- Cloruro de estearoilo (Sigma-Aldrich Química S.A., Madrid, España).
- Sulfato sódico anhidro, Panreac (Panreac, Barcelona, España).
- 1,3,5-trietilbenceno (Sigma-Aldrich Química S.A., Madrid, España).
- Paraformaldehído (Sigma-Aldrich Química S.A., Madrid, España).
- Ácido acético glacial (Panreac, Barcelona, España).
- Bromuro potásico (Panreac, Barcelona, España).
- HBr/AcOH (31%) (Sigma-Aldrich Química S.A., Madrid, España).
- Ácido sulfúrico (Panreac, Barcelona, España).
- Azida sódica (Sigma-Aldrich Química S.A., Madrid, España).
- Catalizador de Pd sobre carbón activo (Sigma-Aldrich Química S.A., Madrid, España).
- Trietilamina (Fluka, Madrid, España).
- Dicloruro de 2,6-piridindicarbonilo (Sigma-Aldrich Química S.A., Madrid, España).
- 2-Metil-tio-2-imidazolina hidroyoduro (99%) (Sigma-Aldrich Química S.A., Madrid, España).
- Metilcloroformiato (Sigma-Aldrich Química S.A., Madrid, España).

2. Síntesis de reactivos

Algunos de los reactivos empleados en la formación de la zona sensora han sido sintetizados en nuestro laboratorio, como ya ha quedado dicho en los capítulos correspondientes. Paso a detallar a continuación las diferentes síntesis realizadas.

2.1. Síntesis del cromoióforo 4,5, dibromofluorescein octadecil ester

La síntesis del cromoióforo 4,5, dibromofluorescein octadecil ester, conocido como ETH 7075, fue sintetizado siguiendo las etapas descritas en el trabajo publicado por Tan *et al.*{Tan, 1991 685 /id}.

1º paso: Obtención de 4', 5' –Dibromofluoresceina sal sódica

Se disuelven (0,40 g, 10 mmol) de NaOH en 100 mL de etanol. A 2,45 g (5 mmol) de dibromofluoresceina se le añaden 50 mL de etanol y se le va añadiendo poco a poco la disolución de NaOH. Se calienta a reflujo durante 30 minutos. Se evapora el disolvente obteniéndose 3,127 g.

2º paso: Obtención del 4',5'-dibromofluoresceina octadecil ester

Se disuelven (2,45 g, 5 mmol) del producto obtenido anteriormente en 50 mL de DMF. Una vez disuelto se le añaden 1,65 g (5 mmol) de 1-bromooctadecano y se calienta a temperatura de reflujo (100°C), bajo agitación magnética, durante 3 horas. El producto resultante se añade a 200 mL de H₂O y se realiza una extracción con acetato de etilo. La fase orgánica se vuelve a extraer con HCl 1 M y se evapora el disolvente en el rotavapor. Se purifica el producto pasándolo dos veces por columna cromatográfica (sílica gel 60), empleando como eluyente mezclas CH₂Cl₂ / éter etílico . Después se evapora en rotavapor el disolvente del producto eluido y se obtiene un producto cuyo espectro coincide con el de la 4',5'-dibromofluoresceina octadecil ester. Se obtienen 170 mg (Rendimiento 6,94 %). A continuación se muestran los espectros de ¹H-RMN (Figura 10.1) y ¹³C-RMN (Figura 10.2).

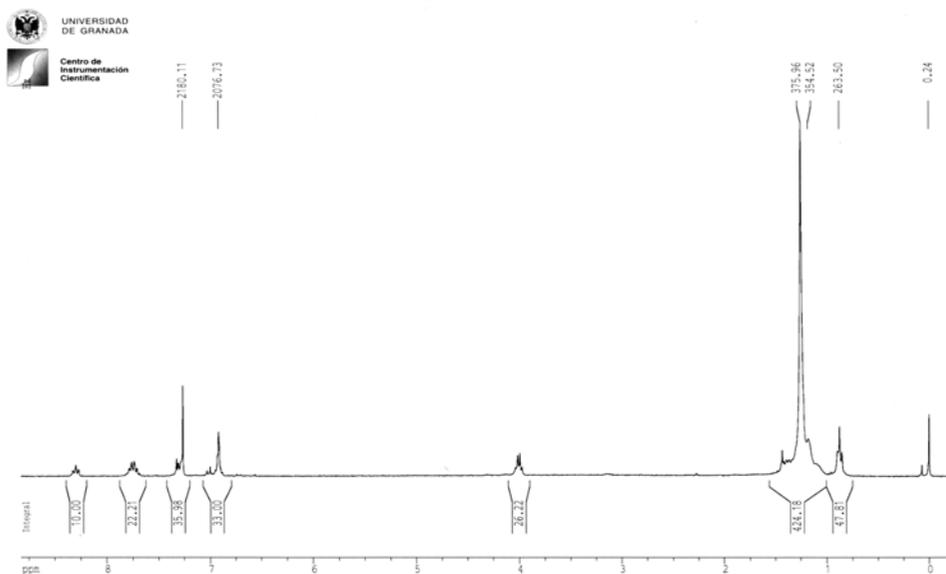


Figura 10.1. Espectro ^1H -RMN de la 4',5'-dibromofluoresceína octadecil éster (300 MHz, CDCl_3), $\delta = 8,30$ (t,1H, $J=7,3$ Hz), 7,74 (m,2H) [7,78(d,1H, $J=7,2$ Hz) y 7,71 (t,1H, $J=7,4$ Hz), 7,32 (d,1H, $J=5,5$ Hz), 7,03-6,88 (m,4H), 4,01 (2H,m,2H, CH_2O), 1,50-1,00 [m,32H, $(\text{CH}_2)_n$] y 0,88 (t,3H, CH_3).

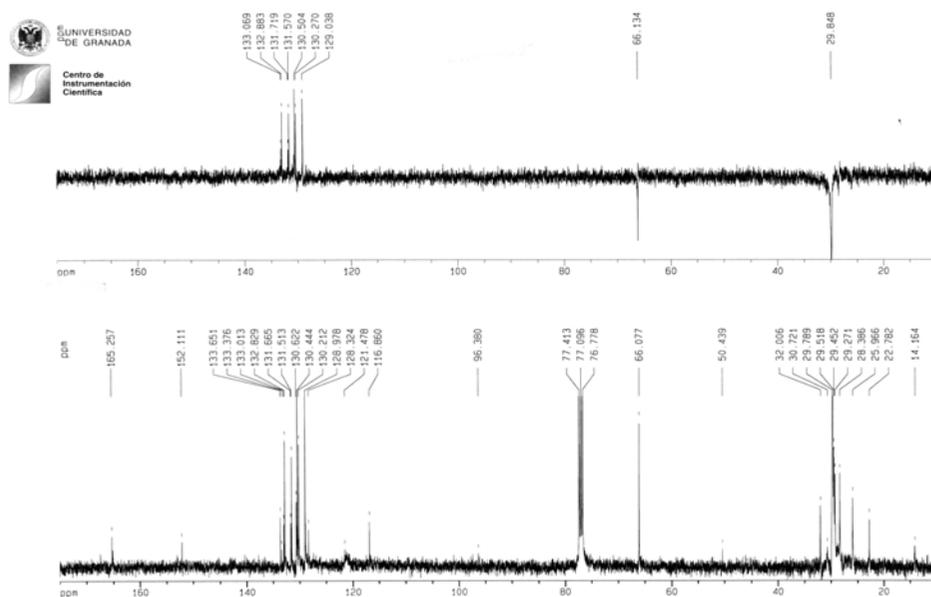


Figura 10.2. Espectro ^{13}C -RMN de la 4',5'-dibromofluoresceína octadecil éster (300 MHz, CDCl_3), $\delta = 165,3$ (COO), 152,1, 133,7, 133,0, 132,8, 131,7, 131,5, 130,6, 130,5, 130,2, 129,0, 128,3, 116,9 (aromático), 66,1(CH_2O), 32,0, 30,7, 29,8, 29,6, 29,5, 29,3, 28,4, 26,0, 22,8 y 14,2 (CH_3).

2.2. Síntesis del 1,2-benzo-7-(dietilamino)-3-(octadecanoilimino)fenoxacina (azul Nilo lipofilizado)

El cromóforo 1,2-benzo-7-(dietilamino)-3-(octadecanoilimino) fenoxacina, conocido como azul Nilo lipofilizado (ETH 5294), se sintetizó siguiendo los pasos descritos por W. Morf, K. Seiler, B. Rusterholz y W. Simon (Morf, 1990) en 1990. Estos consisten, en primer lugar, en la preparación de la forma básica del azul Nilo, para, en una segunda etapa, introducir un grupo estearoilo que le confiere la lipofilicidad deseada, sin modificar el carácter de indicador ácido-base.

Síntesis de la forma básica del azul Nilo: A 100 mL de una disolución acuosa de cloruro de azul Nilo A (1g; 2,8 mmol) termostatada a 65°C en un baño de glicerina, se le añaden 100 mL de una

disolución acuosa de hidróxido sódico 0,5 M y se agita magnéticamente durante 30 minutos. Tras dejar enfriar a temperatura ambiente, se extrae la disolución en tres ocasiones con 100 mL de Cl_2CH_2 . La fase orgánica se decanta y seca con Na_2SO_4 , se filtra y tras evaporar el disolvente, se obtienen 600 mg (1,6 mmol) de la forma básica del azul Nilo (R: 60%).

Síntesis del azul Nilo lipofilizado: A una disolución de la forma básica del azul Nilo (317 mg en 13 mL de CH_2Cl_2) se le añade poco a poco, otra de cloruro de estearoilo (242 mg en 2 mL de CH_2Cl_2), manteniendo en agitación durante 15 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo se le añaden 50 mL de CH_2Cl_2 y se lava con una disolución acuosa de hidróxido sódico 0,1 M. La fase orgánica se seca con Na_2SO_4 , se filtra y se evapora el disolvente obteniendo el cromoforo 1,2-benzo-7-(dietilamino)-3-(octadecanoilimino)fenoxacina. Se purifica mediante una columna de sílica gel utilizando acetato de etilo como disolvente. Se obtienen 350 mg (R: 94%) del compuesto deseado cuya estructura podemos ver en la Figura 3

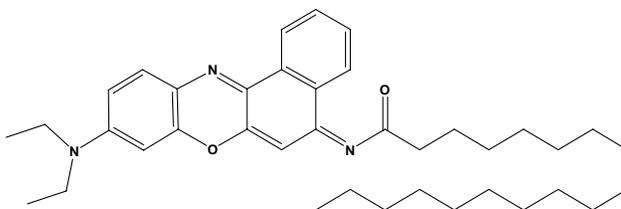


Figura 10.3. Estructura del azul Nilo lipofilizado

Se identificó el compuesto obtenido mediante análisis fundamental y $^1\text{H-RMN}$, comparando los resultados con los obtenidos para el mismo compuesto comercial adquirido a la casa Fluka. El análisis elemental realizado arrojó un contenido en carbono del 77,7 % frente al 78,1% teórico considerando la molécula $\text{C}_{38}\text{H}_{53}\text{N}_3\text{O}_2$, un 7,3 % en nitrógeno frente a un 7,2 % teórico, 8,3 % en hidrogeno frente a un 9,1% teórico y 6,6 % en oxígeno frente a un 5,5 % teórico.

A continuación se registraron los espectros de resonancia magnética nuclear de ^1H del producto sintetizado y del adquirido a Fluka S.A. con el objetivo de compararlos y corroborar que tienen la misma estructura. Estos espectros los podemos observar en las Figuras 4, 5, 6 y 7.

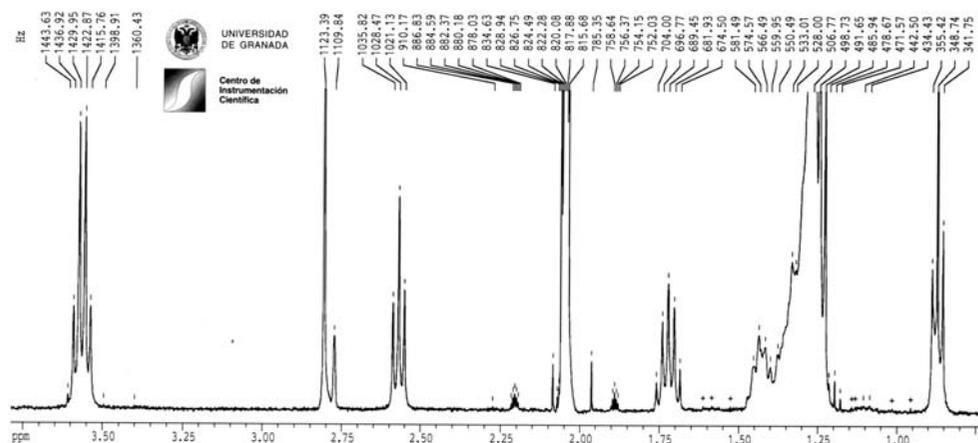


Figura 10.4. Espectro ^1H -RMN del azul Nilo lipofilizado sintetizado en el laboratorio, (espectro en la zona de campo alto).

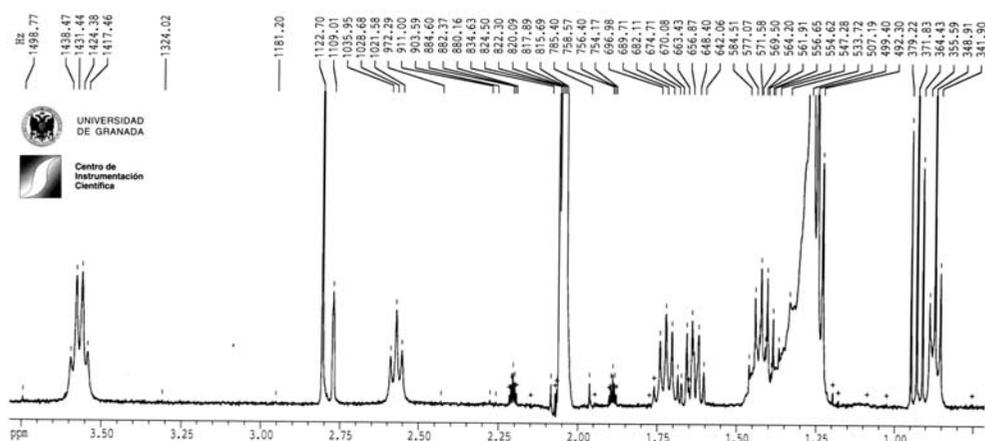


Figura 10.5. Espectro ^1H -RMN del azul Nilo lipofilizado adquirido a Fluka (espectro en la zona de campo alto).

En el espectro se aprecian como señales características comunes un doblete a δ 8,61 ppm correspondiente al hidrógeno 5 ó 6; un doblete que resuena a δ 8,34 ppm y corresponde al hidrógeno 5 ú 8, un triplete resonando a δ 7,75 ppm correspondiente al hidrógeno 6 ó 7; otro triplete a δ 7,67 ppm debido al hidrógeno 7 ó 6; un doblete a δ 7,55 ppm que se origina en el hidrógeno 1; un doblete que resuena a δ 6,80 ppm y que corresponde al hidrógeno 2; un doblete a δ 6,55 ppm debido al hidrógeno 3; un singulete a δ 6,31 ppm originado en el hidrógeno 4; un cuatriplete a δ 3,56 ppm que tiene su origen en los 4 hidrógenos de los metilenos nitrogenados (Me-CH₂-N); un triplete a δ 2,57 ppm correspondiente a los dos hidrógenos adyacentes al grupo carbonilo (CH₂-CO-NH); un quintuplete resonando a δ 1,72 ppm debido a los dos hidrógenos separados por un metileno del grupo carbonilo (HN-COCH₂-CH₂); un multiplete a δ 1,50-1,20 ppm que corresponde a los hidrógenos de los grupos ((CH₂)₁₄) y, por último, una señal a δ 0,87 ppm que resuena como triplete y que corresponde al disolvente (CD₃)₂CO.

Como puede observarse las señales características son comunes a los dos productos, sintetizado y adquirido a Fluka S.A., lo que concluye que ambos productos son idénticos.

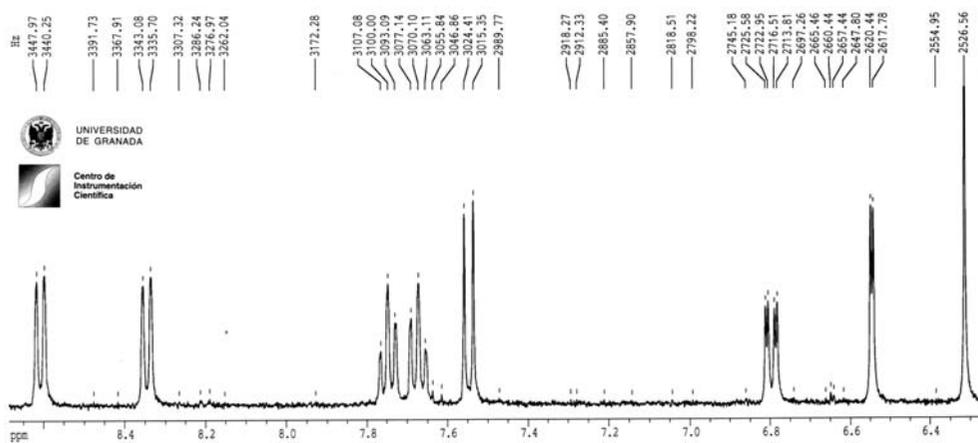


Figura 10.6. Espectro ¹H-RMN ampliado del azul Nilo lipofilizado sintetizado en el laboratorio (espectro en la zona de campo bajo)

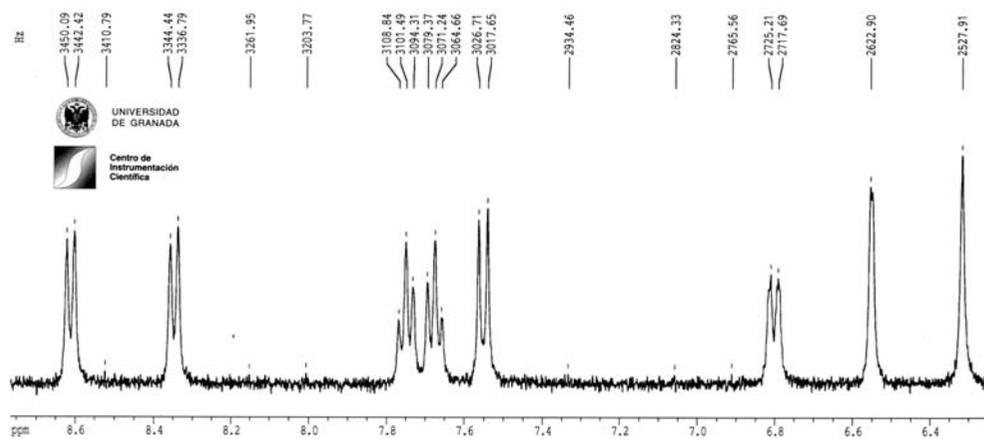


Figura 10.7. Espectro $^1\text{H-NMR}$ ampliado del azul Nilo lipofilizado adquirido a Fluka, (espectro en la zona de campo bajo)

2.3. Síntesis del ionóforo para nitrato: 2,16,18,32,45,47-hexaetil-5,13,21,29,34,42,44,46,48-nonaazaheptaciclo [15.15.11.1^{3,31}.1^{7,11}.1^{15,19}.1^{23,27}.1^{36,40}]-octatetraenta-1,3(45),7(48),8,10,15(47),16,18,23(46),26,31,36,37,39-pentadecaeno-6,12,22,28,35,41-hexona (HNOPH)

La obtención del ionóforo para nitrato, HNOPH, se realizó siguiendo la síntesis descrita por V. Anslyn *et al.* [Niikura, 1999 3103 /id]. En esta referencia la obtención del 2,4,6-tris(aminometil)-1,3,5-trietilbenceno se basa en lo ya publicado anteriormente por los mismos [Metzger, 1997 3093 /id]. Nosotros hemos realizado algunas modificaciones en la síntesis del 2,4,6-tris(aminometil)-1,3,5-trietilbenceno, en lo que respecta a la formación del triazido derivado 3 y la transformación de este en el triamino derivado 4.

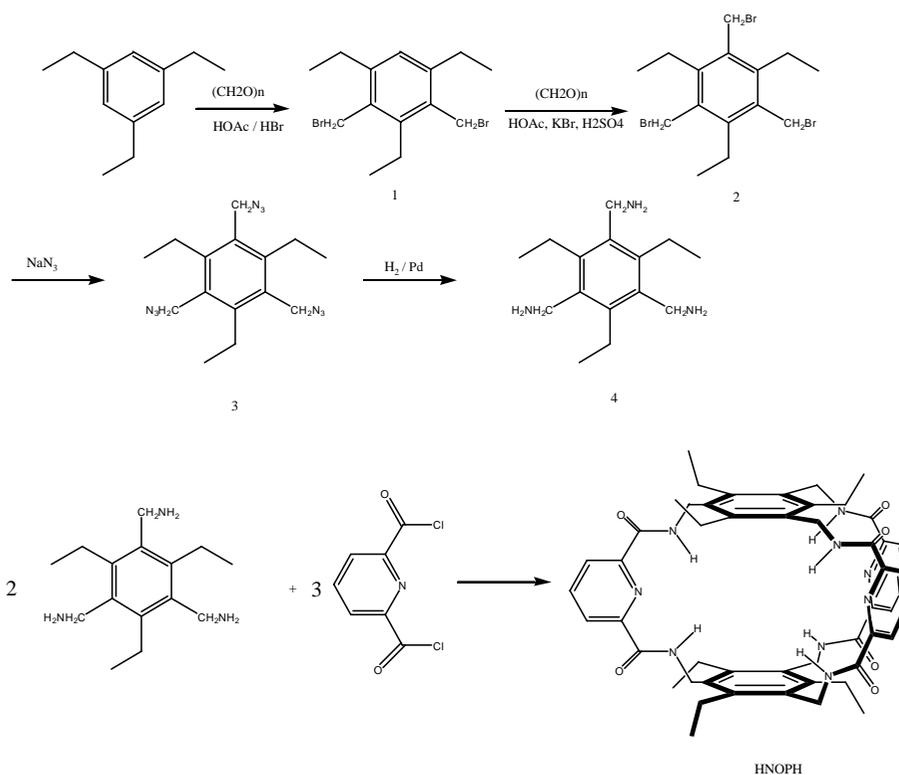


Figura 10.8. Etapas en la síntesis del receptor de nitrato HNOPH

El desplazamiento nucleofílico del tris-bromometil derivado 2 con azida sódica se ha realizado empleando como disolvente mezcla hidroalcohólica de etanol-agua (9:1) a temperatura de reflujo. La transformación del triazido en triamino no se ha efectuado con trifenilfosfina, como lo describe E.V. Anslyn *et al.*, sino que lo hemos realizado mediante una reducción con hidrógeno con paladio como catalizador soportado sobre carbono.

Obtención de 2,4,6-tris(azidometil) 1,3,5-trietilbenceno a partir de 1,3,5-trietilbenceno

a) Bromometilación. Síntesis del tris(2,4,6-bromometil)-1,3,5-trietilbenceno.

En un matraz esférico se colocan 8,11 g (0,05 moles) de 1,3,5-trietilbenceno, 6 g (0,2 moles) de paraformaldehído y 25 mL de ácido acético glacial. A esta mezcla se le añade, gota a gota, mediante un embudo de adición 45 mL de HBr/AcOH (31%). La mezcla de reacción se mantiene, bajo agitación magnética a temperatura de reflujo, durante 12 horas. Se deja enfriar a temperatura ambiente y se añade sobre un vaso con 200 mL de una mezcla de agua y hielo. El precipitado que aparece se filtra y se deja secar en desecador con P₂O₅. De esta manera se obtiene con un rendimiento del 100% el 2,4-dibromometil 1,3,5-trietilbenceno, como se deduce del espectro ¹H-RMN que se muestra en la Figura 9.

La presencia de un singulete a $\delta = 6,95$ ppm que integra por un hidrógeno es indicativo de que existe un hidrógeno en el anillo aromático, por tanto no se ha producido la perbromometilación y se trata de un producto que posee 2 grupos bromometil, en lugar de un producto con 3 bromometilos. Esto se corrobora con la presencia de 2 cuádrupletes a $\delta 2,93$ y a $2,79$ ppm en una relación 2 a 4, y de 2 tripletes a $\delta 1,32$ y $1,29$ ppm en una proporción 3 a 6, pues son concordantes con la introducción de 2 grupos bromometilo en el anillo bencénico, al igual que la integral de los hidrógenos del metileno unidos a bromo que aparecen a $\delta 4,59$ ppm. Por tanto, como se puede ver en la Figura 9, el producto obtenido en este paso es el 2,4-dibromometil 1,3,5-trietilbenceno, 1, y consecuentemente se pone de nuevo a bromometilar este producto con el fin de obtener el tris(2,4,6-bromometil-)1,3,5-trietilbenceno 2.

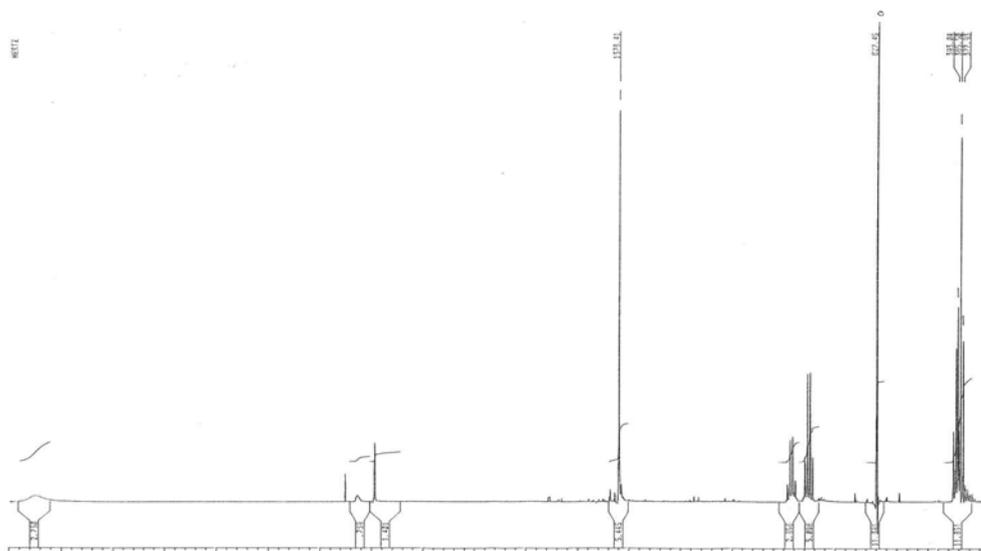


Figura 10.9. Espectro de ^1H -RMN del 2,4-dibromometil 1,3,5-trietilbenceno

A continuación se mezclan en un matraz 10,4 g (0,03 moles) del producto obtenido, 2,4-dibromometil 1,3,5-trietilbenceno, con 1,58 g (0,05 moles) de paraformaldehído, 6,28 g (0,05 moles) de KBr y 35 mL de ácido acético. A la mezcla anterior se le añade gota a gota una mezcla de 15 mL de CH_3COOH y 15 mL H_2SO_4 . Se deja agitando 24 horas a temperatura de reflujo (140°C , temperatura del baño). A continuación se deja enfriar a temperatura ambiente y se vierte sobre 300 mL de agua fría. Aparece un precipitado que se filtra y lava con agua. Se disuelve en ClCH_3 y se lleva a un embudo de decantación realizando una extracción con agua. Se seca la fase orgánica con Na_2SO_4 anhidro, se filtra y se evapora el disolvente. Obteniéndose un crudo de 2,4,6-tris(azidometil)-1,3,5-trietilbenceno.

b). Síntesis del 2,4,6-tris(azidometil)-1,3,5-trietilbenceno

Se disuelven 14,6 g (0,225 moles) de NaN_3 en la mínima cantidad de H_2O y se añade 9 veces mas de etanol que de agua. Se agregó esta disolución a 13,2 g (0,03 moles) del crudo obtenido en la etapa anterior, 2,4,6-tris(bromometil)-1,3,5-trietilbenceno. La mezcla de reacción se mantiene bajo agitación magnética a temperatura de reflujo durante 6 horas. A continuación, se evapora todo el etanol, añadiendo posteriormente 100 mL de ClCH_3 . La capa orgánica se separa, seca, filtra y

concentra a vacío. Se purifica en columna de silicagel usando como eluyente hexano:éter (10:1) obteniéndose el triazidoderivado 3 con un rendimiento global del 38% desde el 1,3,5-trietilbenceno. En el siguiente espectro de ^1H -RMN se puede corroborar su estructura.

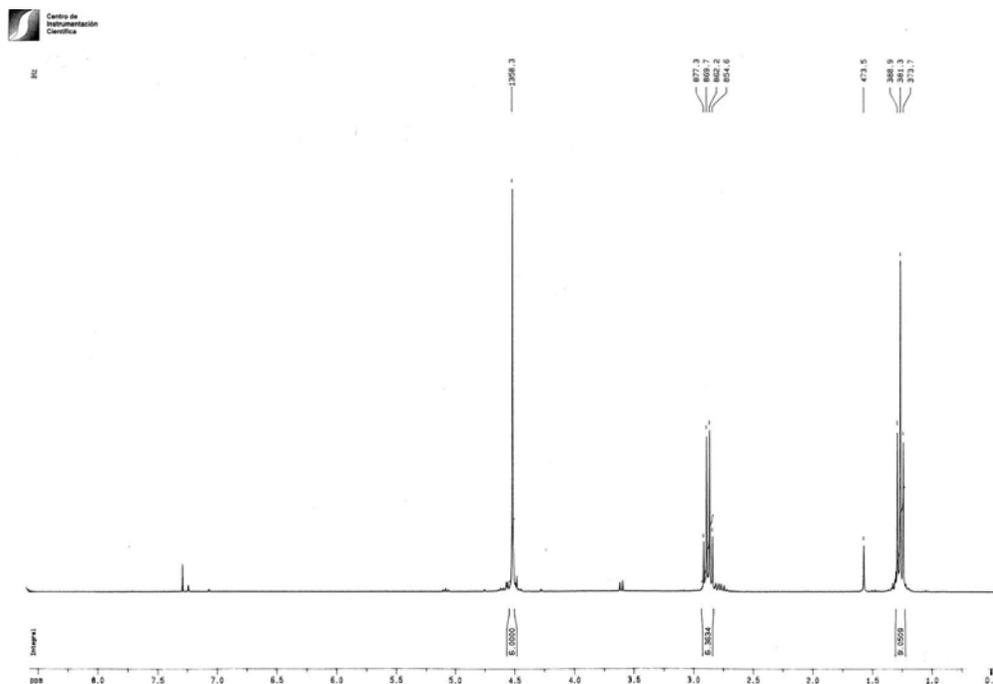


Figura 10.10. Espectro de ^1H -RMN del 2,4,6-tris(azidometil)-1,3,5-trietilbenceno

El espectro de ^1H -RMN es plenamente concordante con la estructura del triazido derivado 3, observándose un singulete a 4,5 ppm perteneciente a los 3 CH_2N_3 , a 2,8 ppm un cuadruplete perteneciente a los 3 CH_2 unidos a CH_3 , y a 1,2 ppm un triplete perteneciente a los 3 CH_3 unidos a esos CH_2 .

Obtención del 2,4,6-Tris(aminometil)-1,3,5-trietilbenceno

Se disuelven 1,41 g (4,3 mmoles) de 2,4,6-tris(azidometil)-1,3,5-trietilbenceno, obtenido en la etapa anterior, en 125 mL de metanol. Se le añaden aproximadamente 40 mg de catalizador de Pd sobre carbón activo (10%) y se introduce en un hidrogenador a una presión de 2 bares durante 24 horas. Se filtra sobre celita y se concentra. Se realiza purificación en columna de sílica gel empleando como eluyente la mezcla $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}:\text{NH}_3$ (14:2:1). El rendimiento después de pasar por columna es del 58%. A continuación (Figura 10.11) se muestra el espectro de ^1H -RMN para este compuesto.

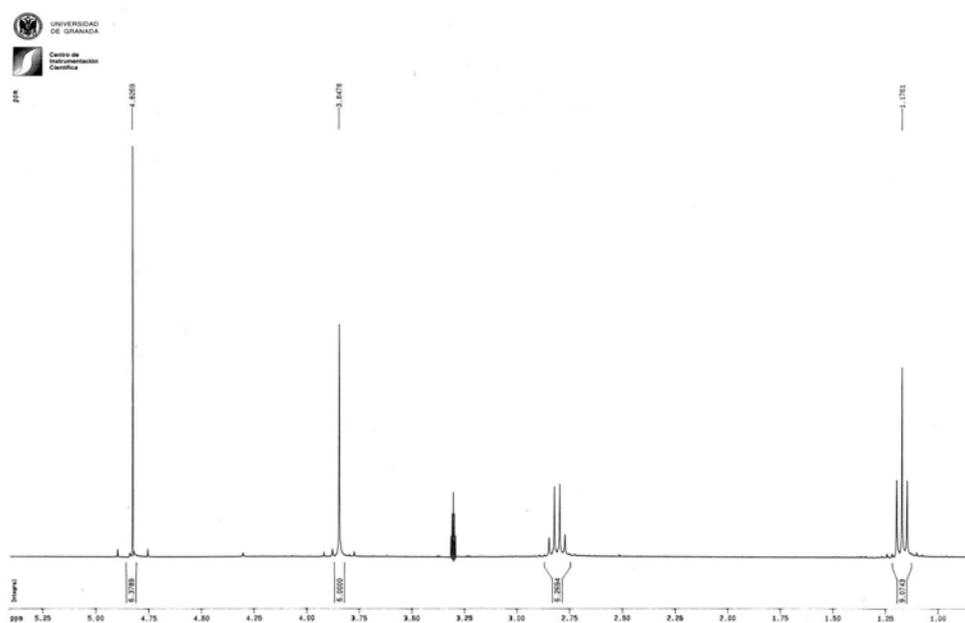


Figura 10.11. Espectro de ^1H -RMN del 2,4,6-tris(aminometil)-1,3,5-trietilbenceno

La estructura es acorde con la del 2,4,6-tris(aminometil)-1,3,5-trietilbenceno, donde la señal a 4,80 ppm, es un singlete que se corresponde con los CH_2NH_2 ; a 3,80 hay un singlete perteneciente a los NH_2 ; a 2,8 ppm un cuádruplete que se corresponden con los CH_2 unidos a CH_3 y por ultimo a 1,2 un triplete perteneciente a los CH_3 .

Obtención de 2,16,18,32,45,47-hexaetil-5,13,21,29,34,42,44,46,48-nonaazaheptaciclo [15.15.11.1^{3,31,17,11,115,19,123,27,136,40}]-octatetraenta-1,3(45),7(48),8,10,15(47),16,18,23(46), 26,31,36,37,39-pentadecaeno-6,12,22,28,35,41-hexona

Para simplificar la escritura en lo sucesivo le denominaremos hexaetil-nonaazaheptaciclo-octatetraenta-pentadecaeno-hexona (HNOPH). Se disuelven 0,343 g (1,40 mmol) del 2,4,6-tris(aminometil)-1,3,5-trietilbenceno y 0,620 mL de trietilamina en 150 mL de cloruro de metileno anhidro. Se adicionan poco a poco 0,435 g de cloruro del diácido piridin-2,6-dicarboxílico. La mezcla de reacción se mantiene bajo agitación magnética a temperatura ambiente durante 24 h. La mezcla de reacción se lava con 15 mL de agua, se decanta y la capa orgánica, se seca, filtra y concentra, obteniéndose un crudo que se purifica en columna con silica gel empleando como eluyente AcOEt-MeOH, 10:0,5. Se obtiene un producto sólido en polvo de color blanco que pesa 0,166 g y que se corresponde con el producto final deseado. El rendimiento de esta etapa es 26,6%, p.f. 276°C (con descomposición). A continuación, se muestra el espectro de ¹H-RMN para este compuesto, siendo totalmente concordante con los resultados publicados por E.V. Anslyn *et al.* {Niikura, 1999 3103 *id*}.

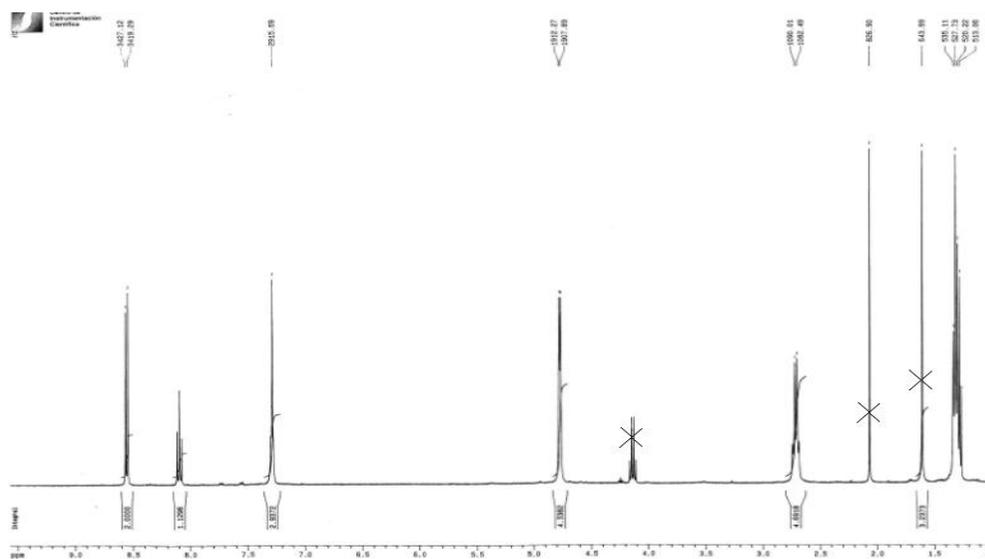


Figura 10.12. Espectro de ¹H-RMN para el HNOPH

2.4. Síntesis del ionóforo para citrato 1,3,5-benzenotrimetanamina N,N',N''-tris(4,5-dihidro-1H-imidazol-2-il) 2,4,6-trietil trihidrocloruro (RCT)

La síntesis de este compuesto se ha llevado a cabo mediante un procedimiento alternativo a lo publicado por Anslyn{Metzger, 1997 3093 /id}. Está basado en el nuevo procedimiento descrito por Mundla y col.{Mundla, 2000 3100 /id} de síntesis de aminoimidazolin. Estos autores emplean 2-metiltilio-2-imidazolina como un reactivo eficaz para la síntesis de 2-amilamino-2-imidazolin a partir de aminas. Nosotros hemos utilizado el carbamato (1-metoxicarbonil-2-metiltilio-1,3-imidazolina) que se ha preparado a partir del producto comercial 2-metiltilioimidazolina, por tratamiento con cloroformiato de metilo tal como describe Mundla (Figura 10.13 etapa 1).

El 1,3,5-tris(aminometil)-2,4,6-trietilbenzeno **4** se ha obtenido según ha quedado expuesto en la síntesis del receptor de nitratos en el apartado anterior. La síntesis del receptor de citrato a partir del 1,3,5-tris(aminometil)-2,4,6-trietilbenzeno se ha realizado siguiendo el procedimiento descrito por Mundla{Mundla, 2000 3100 /id} que consiste en un proceso en tres etapas tal como describimos a continuación:

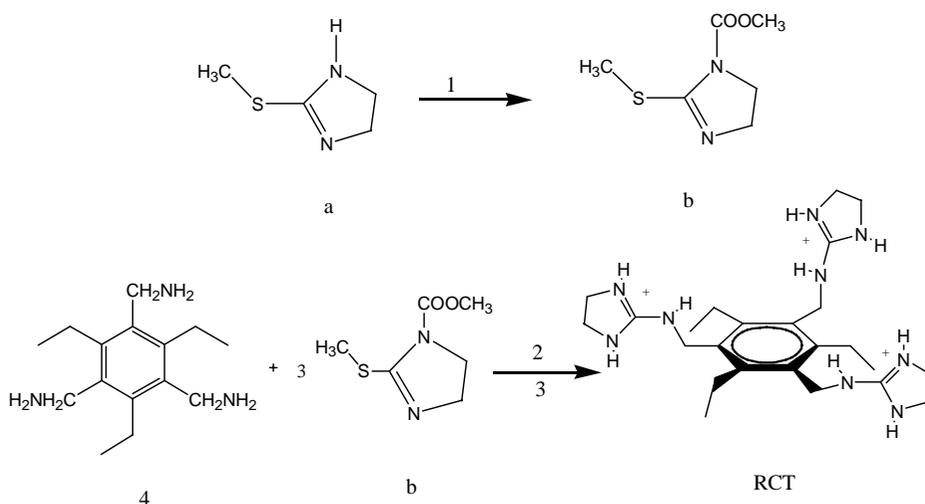


Figura 10.13. Etapas en la síntesis del receptor de citrato. 1) CH_3COOCl , $(\text{CH}_2\text{Cl}_2)_2$, TEA, 0°C , a temperatura ambiente 2-6 h. 2) $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{EtOH}$, de temperatura ambiente a 65°C , 16 h; 3) Reflujo 24h.

1) A una suspensión de 4,55 g (18,4 mmol) de yodohidrato de 2-metiltio-2-imidazolina (99%) en 15 mL de dicloroetano, se le añaden 5,4 mL de trietilamina (TEA). A continuación, se introduce en un baño de hielo y se le añaden gota a gota 1,93 mL, 2,36 g (25 mmol) de metilcloroformiato y se deja a temperatura ambiente durante 6 horas agitando. Transcurridas las 6 horas se elimina el disolvente y se añaden 150 mL de acetato de etilo, filtrando para eliminar las sales insolubles. Se evapora el disolvente obteniendo un sólido amarillo. R: 85%, p.f. 109°C, IR (KBr): 1718, 1590, 1437, 1382, 1025, 759, 555 (cm^{-1}), $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) δ : 3,94 (m, 4H, CH_2CH_2), 3,83 (s, 3H, COOMe), 2,46 (s, 3H, CH_3S), $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 75 MHz) 159,5 (CO), 152,3 (C-2), 53,7, 47,3 (C-4,5), 53,0 (MeO), 15,0 (MeS).

A continuación, se muestra el espectro de $^1\text{H-RMN}$ del compuesto b (1H-imidazol-1-ácido carboxílico,-4,5-dihidro-2-(metiltio)-metil ester) cuya estructura es concordante con la estructura propuesta

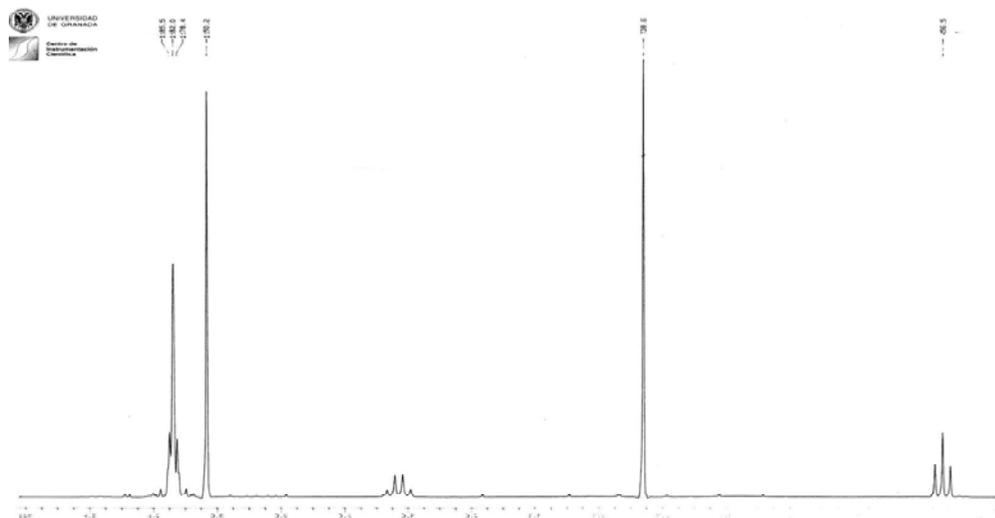


Figura 10.14. Espectro de $^1\text{H-RMN}$ del compuesto b (1H-imidazol-1-ácido carboxílico,-4,5-dihidro-2-(metiltio)-metil ester).

2) En un matraz de 100 mL se añaden 0,2 g (0,6 mmol) de 1,3,5-tris(aminometil)-2,4,6-trietilbenceno, 5,2 mL de una disolución al 10% de CH_3COOH en etanol. A esta disolución se añaden 0,347 g (2 mmol) de b y se deja a 65°C durante 16 horas en un baño termostado (con refrigerante y torre).

3) Se deja, a continuación, 24 horas a reflujo, se evapora el disolvente y se disuelve en 5 mL de H_2O , que se congela y liofiliza. En la siguiente Figura 10.15 se muestra el espectro de ^1H -RMN y el ^{13}C -RMN para el receptor de citrato en forma acetato.

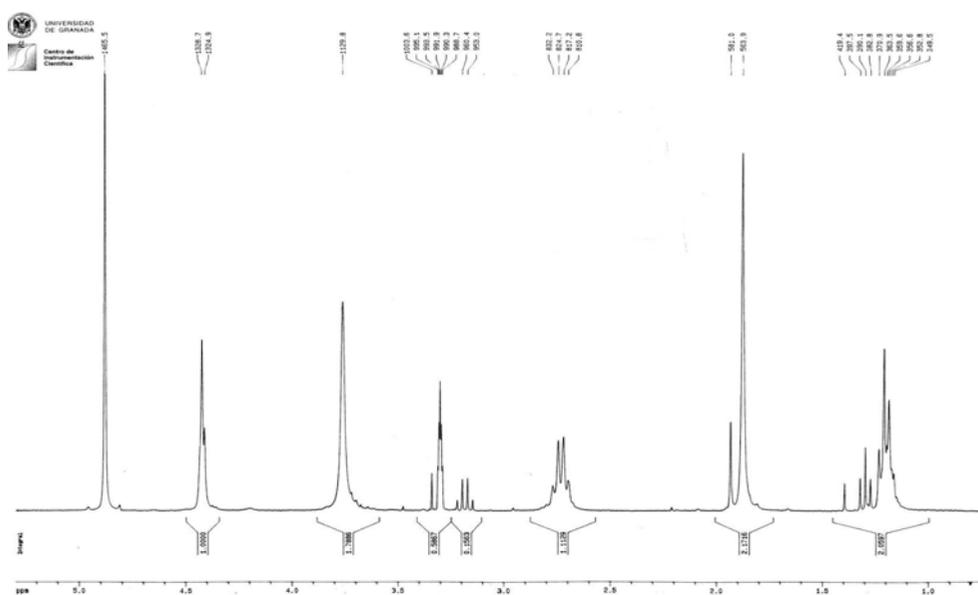


Figura 10.15. Espectro ^1H -RMN de RCT como acetato (CD_3OD , 300 MHz) δ : 4,43 (s,6H, ArCH_2N), 3,76(s ancho,12H, CH_2CH_2), 2,73 (q,6H, $J=7,5\text{Hz}$, CH_3CH_2), 1,88(s,9H,AcO), 1,21(t,9H, $J=7,5\text{Hz}$, CH_3CH_2).

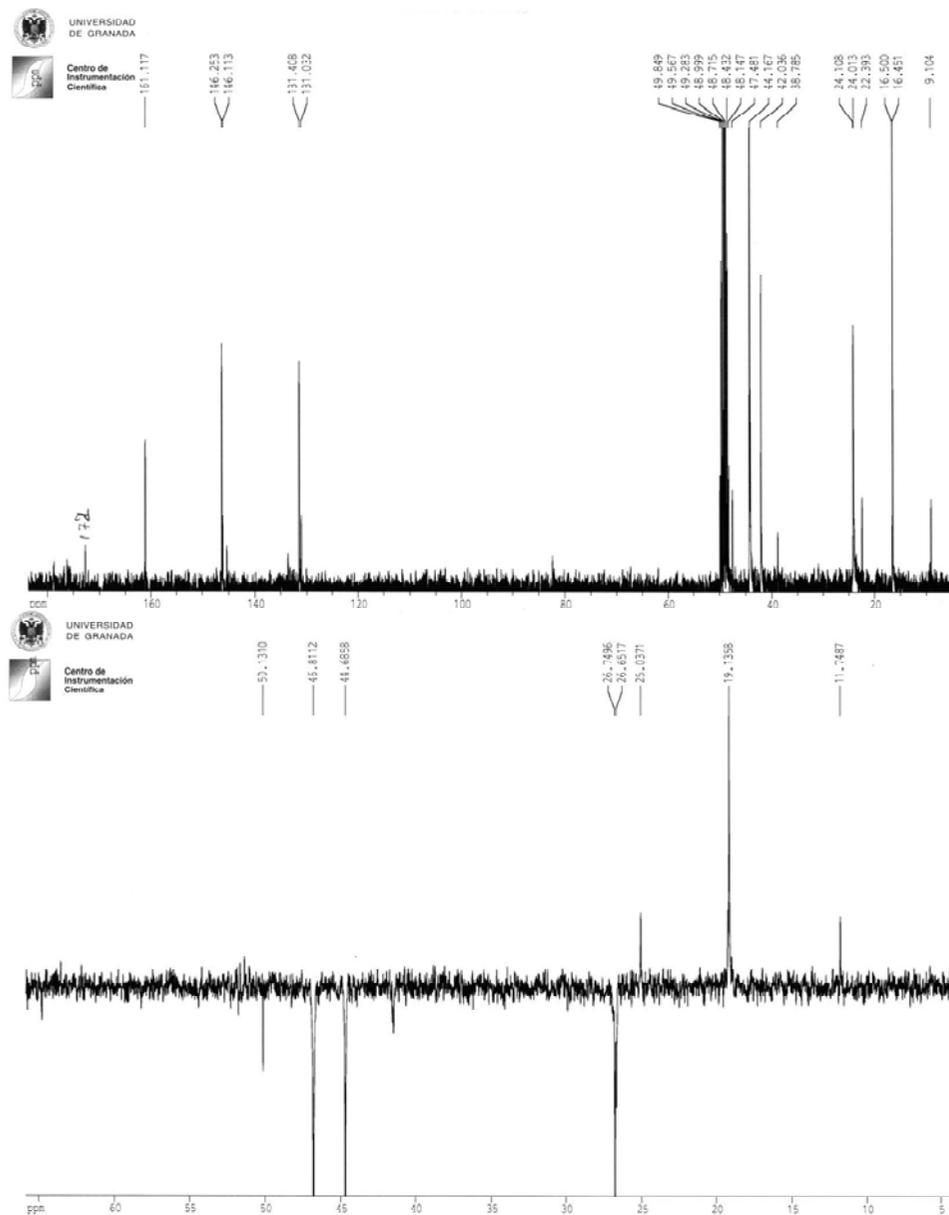


Figura 10.16. Espectro de ^{13}C -RMN de RCT como acetato (CD_3OD , 75 MHz) δ : 170,0; 161,1; 146,2; 131,4; 44,2; 42,0; 24,1; 24,0; 22,4; 16,5

De esta forma obtenemos el receptor de citrato como acetato. Lo convertimos a cloruro pasando el producto disuelto en agua por una columna de cambio aniónico IRA 400. MS HR(FAB+) calculado para $C_{24}H_{40}N_9[M+H]^+$: 454,3. Encontrado: 454,3. El punto de fusión es de 180°C (con descomposición). El rendimiento de esta etapa es del 78,6%. En el conjunto de las dos etapas el rendimiento obtenido es del 67,1%. El espectro de 1H -RMN y ^{13}C -RMN, y el HRMS son idénticos a los ya publicados{Metzger, 1997 3606 /id}. La Figura 10.17 muestra el espectro de 1H RMN del receptor para citrato.

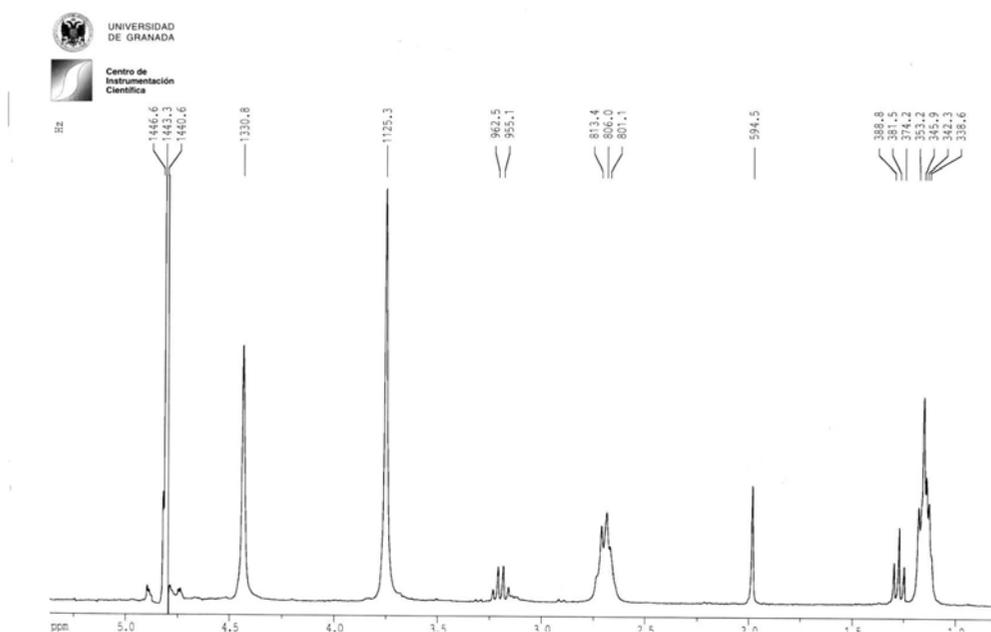


Figura 10.17. Espectro 1H -RMN para el receptor de citrato (RCT) en forma cloruro. (D_2O , 300 MHz) δ : 4,43 (s,6H, ArCH₂N), 3,75(s,12H,CH₂CH₂), 2,68 (m,6H,CH₃CH₂), 1,15(m,9H,CH₃CH₂).

APÉNDICE DE ACRÓNIMOS Y SIMBOLOS

APENDICE DE ACRÓNIMOS Y SIMBOLOS

A: absorbancia

AcOEt: acetato de etilo

a_{H^+} : actividad protónica

A^{m-} : anión genérico de carga m

$a_{X^{v-}}$: actividad del anión X de carga v-

b: constante global de formación de una especie

BFE: dibromofluoresceina octadecil ester

b_{XLp} : constante de estabilidad de la especie XL_p

C⁻: forma básica de cromoióforo cargado negativamente

CA: calibrado con adición de patrón

C_c: concentración analítica de cromoióforo

C_L: concentración analítica de ionóforo

CS: calibrado con patrones

CY: calibrado de Youden

D(α): término disturbador

DER: desviación estándar relativa

DMF: dimetil formamida

DOP: dioctilftalato

DOS: bis(2-etilhexil)sebacato

ϵ : absortividad molar

ELISA:enzyme linked inmunoabsorvent assay

Especies barradas: aquellas que se encuentran dentro de la membrana

ETH5294: azul nilo lipofilizado (1,2-benzo-7-(dietilamino)-3-(octadecanoilimino) fenoxacina)

ETH7075: 4',5'-dibromofluoresceina octadecil ester

Φ : eficiencia en la recogida de radiación en el detector

FIA: flow injection análisis

HC: forma ácida del cromoióforo.

H_nL: se refiere a un reactivo cromogénico convencional de carácter lipofílico

HNOPH: ionóforo de nitrato: 2,16,18,32,45,47-hexaetil-5,13,21,29,34,42,44,46,48-nonaazaheptaciclo [15.15.11.1^{3,31}.17.11.1^{15,19}.1^{23,27}.1^{36,40}]-octatetraconta-1,3(45),7(48),8,10,15(47),16,18,23(46),26,31,36,37,39-pentadecaeno-6,12,22,28,35,41-hexona

ISE: electrodo selectivo de iones

K_a : constante de acidez del ligando

K_{AS} : constante de asociación del par iónico especie formada-catión lipofílico

K_d : constante de disociación de la sal lipofílica

K_D : constante de distribución

K_e : constante de equilibrio del proceso de coextracción.

$k_e^{XL_p}$: constante que gobierna el proceso de coextracción de un anión X^v y un catión H^+ , donde se forma la especie XL_p

K_{H^+} : lipofilicidad relativa del protón

K_{ij}^{opt} : coeficiente de selectividad

K_{X^v} : lipofilicidad relativa del analito X^v

L: ligando o ionóforo

λ : longitud de onda

LD: límite de detección

$L_p A_n^{(nm-np)+}$: especie cargada resultante de la reacción de un anión genérico A^{m-} con un reactivo convencional de carácter lipofílico H_nL

LQ: límite de cuantificación

MCL: maximum contaminant level

MeOH: metanol

MS HR (FAB+): high-resolution mass spectrometry (positive fast atom bombardment)

NED: N-(1-naftil)etilendiamina

NPOE: 2-nitrofeniloctileter

OLS: regresión lineal ordinaria de mínimos cuadrados

PVA: acetato de polivinilo

PVC: cloruro de polivinilo

R: anión lipofílico

R: reflectancia difusa

R^+ : catión lipofílico

RCT: receptor de citrato(3,5-bencenotrimetanamina N,N',N''-tris(4,5-dihidro-1H-imidazol-2-il) 2,4,6-trietil trihidrocloruro)

RMSRE: error relativo cuadrático medio

S: coeficiente de reflexión

SA: sulfanilamida

SSM: método de las disoluciones separadas

TBP: tributil fosfato

TEHP: tris(2-etilhexil)fosfato

THF: tetrahidrofurano

TOT: cloruro de trioctilestaño

WLS: regresión ponderada de mínimos cuadrados

X⁻: anión lipofílico genérico (modelo convencional. No confundir con X⁻ q es anión a determinar

X⁺: catión lipofílico genérico

XL_p^{v-}: especie originada al complejarse un anión X de carga v-, con el ionóforo L. La especie formada tiene una estequiometría p

Y(α): inversa del logit decimal de α

α : grado de desprotonación

ANEXO 2

PUBLICACIONES

L. F. Capitán-Vallvey · R. Avidad
M. D. Fernández-Ramos · A. Ariza-Avidad · E. Arroyo

Test strip for determination of nitrite in water

Received: 24 September 2001 / Revised: 2 April 2002 / Accepted: 9 April 2002 / Published online: 30 May 2002
© Springer-Verlag 2002

Abstract A disposable test strip is proposed for the determination of nitrite in waters. The strip is an inert rectangular strip of polyester with a 6 mm o.d. circular, transparent and colorless film attached to its surface. This film contains the chemicals required for reaction and fixation of the dye formed, sulfanilamide, *N*-(1-naphthyl)ethylenediamine on Nafion. When the test strip is placed in an acidified (pH 2.0) sample solution containing nitrite a red-violet color develops; the absorbance of this is measured at 536 nm. The linear range of the method depends on the time of equilibration of the test strip with the sample solution. When the equilibration time was 45 min, the linear range was 8.9–500 $\mu\text{g L}^{-1}$ whereas for an equilibration time of 60 min it was 4.7–200 $\mu\text{g L}^{-1}$. The detection limit was 1.4 $\mu\text{g L}^{-1}$ for an equilibration time of 60 min. The precision of the method, expressed as RSD, was 8.8% at 100.0 $\mu\text{g L}^{-1}$. The method was applied, and validated chemometrically, for the determination of nitrite in different types of water (spring, mineral, tap, well, and sea).

Keywords Nitrite determination · Test strip · Water analysis

Introduction

Nitrogen compounds in natural waters arise from the biochemical reactions necessary to satisfy the metabolic requirements of living organisms. Spillage of residual waters, urban and industrial, and, above all, agricultural fertilizing increases the amount of nitrogenated matter, both organic and inorganic, in waters.

The determination of nitrite in water is necessary not only because of its undesirable properties but also because it acts as an indicator of bacterial contamination, and most

members of the European Community [1, 2], stipulate that the maximum admissible concentration of nitrite in water for human consumption is 0.1 mg L^{-1} .

The usual method for performing an analysis requires taking a sample, conserving it, refrigeration at 4 °C or adjustment of the pH to <2 with H_2SO_4 , and transport to the laboratory where analysis can be performed with the least delay possible, and 24 h after sampling at the very most.

A current trend in analytical methodology is to obtain chemical information at the place where the client or user needs it, without careful sampling, conservation, transport, or analysis in a laboratory by skilled personnel. Test methods, or test kits [3], enable chemical analysis that is rapid, simple and, usually, inexpensive, and enables the detection and/or determination of analytes without trained personnel, or even the laboratory itself [4].

Most test strip procedures are based on diffuse reflectance measurements of an opaque reagent zone that contains the assay reagents. Several attempts have been made to prepare transparent test strips that absorb liquids by use of a film-forming polymer and a water-swellaable component [5]. Here, the methodology of bulk membranes [6] was used to develop a transparent disposable base for the test strip. From this, our research group proposed quantitative test strip methods for the determination of different chemicals, e.g. iron [7], calcium [8] or nalidixic acid [9] in waters.

Several different commercial reactive strips are available for the semi-quantitative detection and determination of nitrite. Among those used in environmental water analysis are Merckoquant rods for rapid analysis, which provide semi-quantitative information between 1 and 80 mg L^{-1} , and RQ Flex, which measures nitrite between 0.02 and 3 mg L^{-1} by use of a pocket reflectometer; both are from Merck. Similarly, Quantofix semi-quantitative strips from Macherey–Nagel work between 1 and 3000 mg L^{-1} nitrite, by use of a color card.

The most common use of reactive strips for nitrite in clinical analysis is, however, for the diagnosis of urinary tract infections caused by bacteria such as *E. coli*, *Proteus*, *Klebsiella*, *Staphylococcus*, or *Enterococcus*, bacte-

L.F. Capitán-Vallvey (✉) · R. Avidad · M.D. Fernández-Ramos
A. Ariza-Avidad · E. Arroyo
Department of Analytical Chemistry, University of Granada,
18071 Granada, Spain
e-mail: lcapitan@ugr.es

ria which are capable of enzymatic reduction of nitrates to nitrites. The most common are multi-reagent strips, which contain within a plastic strip a series of small squares of porous material impregnated with the reagents necessary to respond to up to ten different analytes when moistened with urine. The sensitivity of multi-reagent strips from Ames is 0.6 mg L^{-1} nitrite whereas that for those from Boehringer–Mannheim is 0.75 mg L^{-1} [10].

We have developed a disposable test strip capable of detecting the presence of nitrite ion in natural waters at concentrations between 2.5 and $500 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$, depending on the contact time. Our work is based on the formation of azo dyes by diazotization of the sulfanilamide and subsequent coupling with *N*-(1-naphthyl)ethylenediamine, all incorporated in a Nafion membrane. This test strip enables determination of nitrite concentrations $>1.7 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ at low cost and with high precision (7.8%), and, as a consequence of its design, it can be used with portable equipment for routine analysis. Its main disadvantage is a long analysis time when working at high sensitivity, a consequence of the reaction mechanism on which it is based.

The proposed method, for which a patent is pending [11], is selective, because of the selectivity of the derivatizing reaction, and sensitive, because the range of application of the classic reaction is considerably reduced by preconcentration of the analyte in the solid matrix.

Experimental

Apparatus and software

A Perkin–Elmer Lambda 2 (Norwalk, CT, USA) spectrometer interfaced to an IBM SX-486 microcomputer was used for absorbance measurements. Acquisition and manipulation of the spectral data was performed by means of the PECSS software package supplied by Perkin–Elmer. The absorbance measurements were performed by use of the home-made cell holder shown in Fig. 1. This accessory was constructed from a black-painted prismatic block of iron with a circular hole (4 mm in diameter) that delimits the surface of the beam light and avoids possible refraction phenomena in the border of the sensing zone – such refraction phenomena would increase the errors in the measurement of the analytical signal. Statgraphics software ver.6.0 STSC (Manugistics and Statistical Graphics Corporation, USA, 1992) was used for treatment of the data.

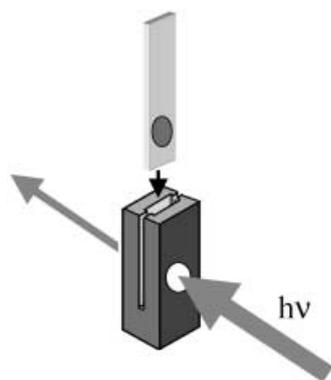


Fig. 1 Home-made support used to measure the absorbance of the test strip

Reagents and materials

Nitrite stock solution (10.0 mg L^{-1}) was prepared from sodium nitrite (Merck, Darmstadt, Germany), dried at 105°C , in water. The solution was periodically standardized by titration with potassium permanganate. Solutions of lower concentration were prepared by appropriate dilution with water. This solution was stable for at least one month and was kept in a refrigerator in well-stopped amber vial. Other reagents and materials used were: sheets of Mylar type polyester (Goodfellow, Cambridge, UK), Nafion 5% w/w solution in a mixture of aliphatic alcohols, sulfanilamide, *N*-(1-naphthyl)ethylenediamine dihydrochloride, all supplied by Sigma–Aldrich (Madrid, Spain), and 1000 mg L^{-1} stock solutions of the ions: Na(I), K(I), Mg(II), Ca(II), Al(III), Zn(II), Pb(II), Cd(II), Hg(II), Fe(III), Ni(II), Co(II), Mn(II), Cr(III), and Cu(II), as the nitrates, CrO_4^{2-} , SO_4^{2-} , CO_3^{2-} , HCO_3^- , PO_4^{3-} , ClO^- , and Cl^- , as the sodium salts, and NO_3^- as the potassium salt (Merck). All reagents were of analytical-reagent-grade unless stated otherwise. Reverse-osmosis quality water (Milli-RO 12 plus Milli-Q station from Millipore) was used throughout.

Membrane preparation

To prepare the sensing film a mixture of 7.0 mg sulfanilamide and 0.7 mg *N*-(1-naphthyl)ethylenediamine dissolved in 0.6 mL of Nafion was prepared by vigorous shaking of the mixture to achieve complete homogeneity. Then, by means of a micropipette and a laboratory-made spin-on device [12] turning at 20 rpm , $30 \text{ } \mu\text{L}$ of this solution was placed on a rectangular ($50 \text{ mm} \times 14 \text{ mm} \times 0.5 \text{ mm}$) sheet of Mylar type polyester. After 30 s , i.e. when the cocktail had been homogeneously distributed on the polyester sheet, rotation was stopped and the membrane was left to dry in air in a dark place for 20 min .

The physical characteristics of the sensing zone were: solid and homogeneous 6 mm o.d. circular film, transparent and colorless, firmly attached to the solid support. The thickness of the resulting sensing layer was calculated to be approximately $0.2 \text{ } \mu\text{m}$.

Absorbance measurements

To obtain the absorbance measurements the test strip and sample, and a corresponding blank strip, were placed in two of the cell holders described above, which improve reproducibility because measurement is performed on a zone with a constant diameter (4 mm), which is less than the diameter of the active zone of the test strip. Thus, we avoid variability in the size of the zone between one membrane and another. The absorption measurements were performed at 536 nm .

Procedure for samples and standards

Standard solution or sample solution (25 mL) containing between 4.7 and $200 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ nitrite were placed in a 30 mL glass vessel and HCl solution (2.0 mol L^{-1} , 0.5 mL) was added. The strip, hanging from a support, was introduced to the solution which was magnetically stirred at 300 rpm for 90 min at room temperature. The membrane was then removed from the solution, wiped to remove any solution droplets, and its absorbance was measured as described above. All measurements were performed at room temperature. The membranes were not conditioned before use.

Results and discussion

Experimental conditions

To optimize the development of color in the test strip factors affecting the composition of the membrane (nature

and proportions of the mixture components, volume and conditions used for membrane casting) and other conditions affecting the reaction of the nitrites and fixation of the reaction product in the sensing membrane (pH, ionic strength, temperature and time of contact), were studied.

Membrane composition

Sheets of Mylar polyterephthalate-type polyester were selected as solid support for the sensing membrane, because they are transparent in the visible region and inert to the chemicals used. As reaction for nitrite determination azo dye formation was selected because of its high reactivity, sensitivity, and selectivity for these species. The reagents which form the sensing layer were nitrosating compound, coupling reagent, and a polymeric solid support that incorporates the other reagents and retains the azo dye when formed.

Sulfanilamide (SA) and *N*-1-(naphthyl)ethylenediamine (NED), were used as nitrosating and coupling reagents, respectively. Other reagents (sulfanilic acid, *p*-nitroaniline, *p*-aminobenzoic acid, 1-naphthylamine, 1-naphthol) led to worse results in terms of reaction rate in the membrane, solubility in the membrane, or toxicity.

The azo dye formed in the aqueous acidic medium is positively charged and thus is retained strongly by cation-exchange resins (e.g. Dowex 50W-X2-H⁺) [13]. Retention by the sensing membrane thus needs the presence of lipophilic anions in the bulk membrane to retain the compound by electrostatic interaction. This negative charge could be introduced into the membrane as an anionic lipophilic species that forms an ion pair with the dye, or as a negatively charged polymer used as the membrane matrix. The first approach was not successful, because PVC membranes prepared with different plasticizers and counterions, e.g. tetraphenylborate derivatives, were prone to leaching components, which resulted in low reproducibility. This problem was overcome by use of Nafion membrane [14], which forms an ionic film and retains cationic species by ion exchange with its sulfonic groups. The alcoholic medium also enables solubilization of the components used.

To optimize the proportion of the membrane constituents (SA, NED, and Nafion), several test strips were prepared from 0.6 mL Nafion, a constant amount of one component, and variable amounts of the other component. The different mixtures prepared contained amounts of SA and NED between 0.5 and 10.0 mg and between 0.1 and 1.5 mg, respectively.

It was found that amounts of NED >1.0 mg and/or amounts of SA >10 mg made the membrane brittle and opaque, impeding its use as a test strip. Figure 2 shows the response of different strips to 0.1 mg L⁻¹ nitrite; these results indicate that 0.7 mg NED and 7 mg SA are appropriate amounts for preparation of the test strip.

Others conditions related to the preparation of the membrane that could influence its response are the volumes of the mixture placed on the support and the drying

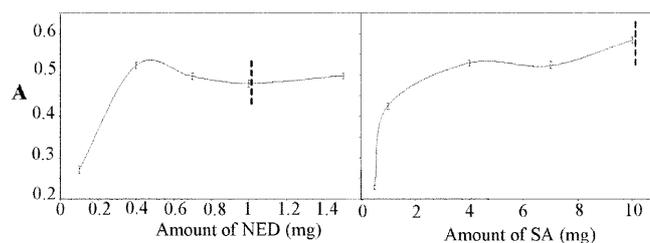


Fig. 2 Effects of the amounts of NED and SA in the membrane

time. Using the optimized composition, membranes were prepared using volumes of mixture between 5 and 40 μ L. In this range the analytical signal was observed to increase, because of the increase in spot diameter. Because the size of the sensing zone was limited by the sheet width, a volume of 30 μ L of the mixture was selected as optimum, because larger volumes reach the border of the sheet of polyester and the thickness of the sensing membrane was not uniform. When this volume was used the diameter of the circular film formed was slightly lower than the width of the sheet of polyester, and higher than the width of the radiation beam of the spectrophotometer.

The effects of drying conditions and drying time were also studied. Two drying conditions were tested – at atmosphere pressure and under vacuum. Drying at atmosphere pressure resulted in better characteristics; 20 min was sufficient time for thorough drying.

Reaction conditions

As a consequence of the reaction of the colorless nitrite-sensitive membrane, a red violet color developed with an absorption maximum at 536 nm, a value very similar to that for water (540 nm) or the resin phase (550 nm) for the same dye [13].

The experimental conditions affecting the reaction of nitrites and fixation of the dye are pH, ionic strength and reaction time.

It is known that nitrosating species (H_2NO_2^+ , NOX , N_2O_3) are formed from nitrous acid, so the pH of the system must be below the pK_a of this acid (3.6) to ensure complete protonation of the nitrite [15]. To test the effect of pH on membrane response we adjusted the pH of the aqueous solution of nitrite to 15 $\mu\text{g L}^{-1}$, by use of hydrochloric acid or sodium hydroxide. The narrow pH-dependence is apparent from Fig. 3; the maximum response was at $\text{pH } 2.0 \pm 0.5$.

We tried to introduce an acidic component into the sensing membrane, as is usual in test strips for assaying nitrites in urine for the diagnosis of bacterial infection [16, 17, 18] or diagnosis to distinguish allergies and infections [19]. Acids tested, at percentages of approximately 10% of the sensing membrane, were the hydroxycarboxylic, mono- and dicarboxylic acids citric, oxalic, tartaric, malic, malonic, succinic, glutaric, adipic, benzoic and trichloroacetic acids and also *p*-toluenesulfonic acid and potassium hydrogen sulfate. Although tartaric, citric,

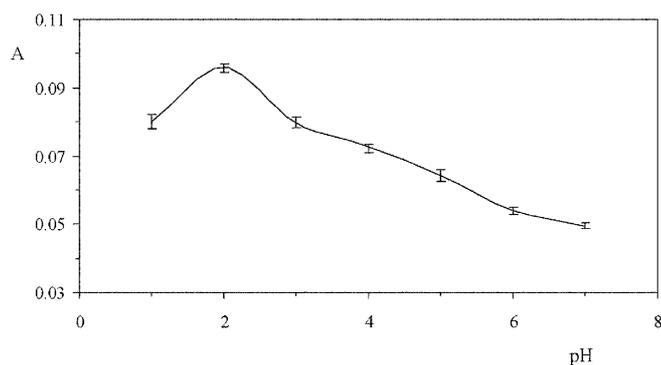


Fig. 3 Effect of pH on the absorbance of the test strip at a nitrite level of 0.1 mg L^{-1}

and oxalic acids gave the best results, in general the mechanical and optical properties of the sensing membranes deteriorated – the membranes became opaque and more brittle, necessitating a longer period of contact between the strip and the solution than when the acid was in solution with the sample. Membranes prepared with Nafion and reagents only could be used, because of acidity arising from hydrogen ions present as counterions of the sulfonic groups of Nafion.

Because this test strip was intended for the determination of nitrite in natural waters, however, the use of sensing membranes with an acid incorporated is not a good alternative, because the level of nitrites can be below $10 \mu\text{g L}^{-1}$. For this reason, it is necessary to place the test strip in contact with a volume of solution in a form that results in preconcentration of the azo dye. This method of operation is different from that usual with clinical test strips, which are moistened with the sample, or a small amount of the sample is placed on the sensing zone.

It was therefore decided to add the acid to the solution which is placed in contact with the test strip. A variety of buffer solutions and common acids were tested. Although it has been observed that mineral acids give worse results than others such as acetic acid [15], in this work the optimum was slightly less than usual in a solution of pH 2.5–3.0 and it was found that HCl gave good results and the buffer capacity was adequate.

The effect of ionic strength, adjusted with NaCl, on the response is very small up to 0.5 mol L^{-1} (for 0.5 mg L^{-1} nitrite) or up to 2.5 mol L^{-1} for 3.0 mg L^{-1} nitrite. For both nitrite concentrations higher NaCl concentrations led to leaching of the dye into the solution, possibly as a result of a competition between Na^+ ions and the protonated dye for the ionic positions of Nafion. At low nitrite concentrations no leaching was observed.

Although it was observed that increasing the temperature increased the response speed of the test, working at room temperature was chosen to simplify the operating procedure.

Because we have previously observed that with this test strip the equilibration time necessary for development of the analytical signal varies, depending on the concentration level of the analyte [7], we studied the time course

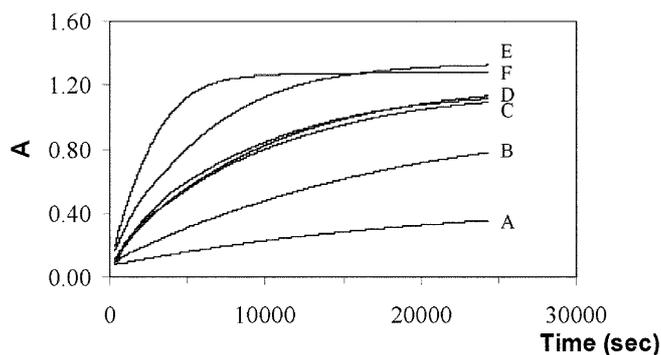


Fig. 4 The time course of the test strip response for different amounts of nitrite: A, 0.1 mg L^{-1} ; B, 0.5 mg L^{-1} ; C, 1.0 mg L^{-1} ; D, 1.5 mg L^{-1} ; E, 2.0 mg L^{-1} ; F, 3.0 mg L^{-1}

of the reaction of the nitrite response of the test strip at concentrations ranging from 0.1 to 3.0 mg L^{-1} . In these experiments, the strip was placed on one side of a 10-mm path-length optical cell and 5 mL nitrite solution was added. As is apparent from Fig. 4, the rate increases with higher nitrite concentrations, from a concentration of approximately 2 mg L^{-1} nitrite, and a constant signal is observed when equilibrium is reached, because of the number of ionic positions in the membrane, which approximately coincides with the exchange capacity of the Nafion (0.85 meq g^{-1} [20]). Increasing the reaction time would enable the detection of low nitrite concentrations.

To increase the speed of the method it is necessary to stir the solution after insertion of the test strip, to facilitate transport of the nitrite from the bulk of the solution to the surface of the strip. Different methods of agitation were tried (magnetic stirrer, rotation, and vibrating agitator) and it was found that the best results, i.e. homogeneous coloring in the membrane and hence higher reproducibility, were achieved by hanging the strip from a support and magnetically stirring at 300 rpm for a time that depended on the nitrite concentration level.

Analytical performance

Using the previously established conditions, several nitrite standards, at concentrations between 0.001 and 500.0 mg L^{-1} , were equilibrated with test strips for different times – 45, 60, or 90 min. Each calibration curve was obtained from eight standards and three replicates of each standard. The lack-of-fit test was used to determine the linearity of these analytical curves, as suggested by the Analytical Method Committee [21], and to establish the upper range of linearity. The precision, expressed as relative standard deviation (RSD), was obtained by analysis of ten 0.1 mg L^{-1} nitrite standards, with three replicates of each; the IUPAC detection and quantification limits [22, 23, 24, 25] were determined from ten blanks. It is apparent that detection limit decreases as the contact time increases. Table 1 contains the figures of merit of the proposed procedure. The repeatability, including the repro-

Table 1 Analytical figures of merit

Characteristic	Value for time:		
	45 min	60 min	90 min
Intercept	0.0093	0.0141	0.0098
Slope ($\mu\text{g L}^{-1}$) ⁻¹	0.0034	0.0055	0.0105
Lack-of-fit test (P_{val})	0.641	0.397	0.677
Lineal range ($\mu\text{g L}^{-1}$)	8.9–500	4.7–200	2.6–100
Detection limit ($\mu\text{g L}^{-1}$)	2.7	1.4	0.8
Quantification limit ($\mu\text{g L}^{-1}$)	8.9	4.7	2.6
RSD (%) ^a	6.9	8.8	7.8

^aRelative standard deviation from analysis of ten 0.1 mg L⁻¹ nitrite standards

ducibility in the construction of the membranes, is approximately 8%.

To assess potential interference from other ions frequently present in natural waters, a systematic study was performed of the effects of such species on the analysis of samples containing 0.1 mg L⁻¹ nitrite. To perform the tests the potentially interfering ion species were tested at different concentrations depending on their occurrence. If interference occurred the concentration of the interfering species was reduced until the error in the result from the analysis was <8%. The maximum concentration of interfering species resulting in an error of 8% was taken as the tolerance level.

We found that tolerance for NO₃⁻, SO₄²⁻, CO₃²⁻, HCO₃⁻, Cl⁻, PO₄³⁻, Ca(II), Mg(II), Na(I), K(I), Pb(II), Zn(II), Cd(II), Hg(II), Cu(II), Ni(II), Co(II), Mn(II), Al(III), Cr(III) and (VI), and Fe(III) was >100 mg L⁻¹, the maximum amount tested. The only interference arose from hypochlorite and chromate (tolerance 1 mg L⁻¹ for both ions) because they oxidize the amines presents in the membrane.

Analytical applications

To assess the usefulness of the method for the determination of nitrite it was applied to real samples of waters of diverse provenance (spring, mineral, tap, well, and sea). For samples that did not contain nitrites, known amounts of the analyte were added to the sample. For some samples it was possible to determine the nitrites directly; for others, however, e.g. tap water, it was necessary to eliminate interference from ClO⁻. In such circumstances active charcoal, 2 g per liter of water, was added, the sample was shaken for 30 min, and, after filtering, the procedure was applied. The quality and accuracy of the proposed method for nitrite was checked by use of a statistical procedure based on standard addition methodology [26, 27]. Standard calibration (SC), standard addition calibration (AC), and Youden calibration (YC) functions were established. The slope, intercept, and regression standard deviation for each curve were calculated by use of linear regression analysis. The proposed method was found to be valid under the conditions: 1. homogeneity of variances for all

Table 2 Results from determination of nitrite in different water samples (50 $\mu\text{g L}^{-1}$ was added to all samples)

Sample	From SC ($\mu\text{g L}^{-1}$)	From AC ($\mu\text{g L}^{-1}$)	P-value (%)	$C_{\pm s_{n-1}}$
Spring (Granada)	15.04	18.93	34.65	53.12±0.006
Sea (Almería)	21.76	21.56	93.91	57.11±0.017
Mineral (Benzoya)	14.75	15.98	65.10	53.38±0.036
Mineral (Lanjaron)	21.29	26.07	15.60	50.46±0.008
Tap (Granada)	16.81	19.46	33.62	50.89±0.023
Tap (Illora, Granada)	15.02	16.67	54.21	48.51±0.019
Well (Illora, Granada)	18.89	20.50	54.28	50.36±0.017

Data are averages from three independent calibrations SC – standard solutions; AC – standard addition; YC (P-values) sample portions; $C_{\pm s_{n-1}}$ – mean concentration from three replicates±standard deviation

calibration curves, 2. similarity of slopes, and 3. that the value of the intercept obtained from the YC curve is included in the confidence interval value of the SC curve. Under these conditions the accuracy of the method is confirmed by comparison of the analyte content determined by use of the different calibration functions. Because the results from both were similar, the method is accurate, with a null hypothesis test acceptance significance level of 95%. Table 2 shows the results obtained from the validation study. We found there was no constant error bias and no significant difference between AC and SC slopes. In all instances, t_{cal} was < t_{tab} (α 0.05 and 16 degrees of freedom).

Conclusions

A test strip based on transmission measurements has been designed which affords good repeatability at low cost. The proposed test strip enables determination of nitrite in water after addition of dilute hydrochloric acid as the only sample pretreatment step. The results obtained are indicative of good accuracy and precision. Because of its low cost, the test strip could be useful for routine analysis with portable equipment. It could also be used with a color chart for semi-quantitative determination.

The disadvantages of the test strip are its relatively long response time (60 min) when the concentration of nitrite is very low, and its limited lifetime – one month under optimum conditions, although this can be improved by use of appropriate preservation procedures (absence of light, inert atmosphere, and/or low temperatures).

Acknowledgements The authors are grateful to the Ministerio de Educacion y Cultura, Dirección General de Enseñanza Superior (Spain) (Project No. PB98–302) for financial support.

References

- Official Journal of the European Communities, No. L 229, 15 July 1980
- R.D. 1138/1990; BOE 226, 27488–27497, 20-9-1990

3. Unger-Heumann M (1996) *Fresenius J Anal Chem* 354:803–806
4. Zolotov Y (1997) *Annali di Chimica* 87:285–295
5. Hildenbrand K, von Döhren HH, Perrey H, Wehling K (1989) US Patent 4 824 640
6. Oehme I, Wolfbeis O (1997) *Mikrochim Acta* 126:177–192
7. Capitán-Vallvey LF, Arroyo E, Berenguer C, Fernández Ramos MD, Avidad Castañeda R (2001) *Fresenius J Anal Chem* 369:139–144
8. Capitán-Vallvey LF, Alvarez de Cienfuegos-Gálvez P, Fernández Ramos MD, Avidad Castañeda R (2000) *Sens Actuators B* 71:140–146
9. Capitán-Vallvey LF, Al-Barbarawi OMA, Fernández Ramos MD, Avidad Castañeda R, Ramírez González V (2000) *Analyst* 125:2000–2005
10. Guardiola JM (1995) Las tiras reactivas y el cribado de orinas para examen de sedimento. In: *La orina y su análisis*. QF Bayer, Madrid
11. Capitán Vallvey LF, Avidad Castañeda R, Fernández Ramos MD, Ariza Avidad A (2000) Oficina Española de Patentes y Marcas, Patent pending P200 002 623
12. Seiler K, Simon W (1992) *Anal Chim Acta* 266:73–88
13. Capitán F, Valencia MC, Capitán-Vallvey LF (1984) *Mikrochim Acta* III:303–311
14. Banick WM, Smith GF (1957) *Anal Chim Acta* 16:464–472
15. Fox JB (1984) *CRC Crit Rev Anal Chem* 15:283–313
16. Avakian S (1968) US Patent 3 415 717
17. Rittersdorf W, Ray HG, Rieckmann P (1973) US Patent 3 712 853
18. Kiyoto Takimo A, Hidetoshi Asahi K, Hiroshi Wada C (1986) US Patent 4 631 255
19. Small PA, Huang SW (1999) US Patent 5 910 421
20. Technical Information Bulletin, No. AN-163, Aldrich Chemical Co
21. Analytical Methods Committee (1994) *Analyst* 119:2363–2369
22. Analytical Methods Committee (1978) *Analyst* 112:199
23. Analytical Methods Committee (1988) *Analyst* 113:1469
24. Guidelines for Data Acquisition (1980) *Anal Chem* 52:2242
25. Nomenclature, symbols, units and their usage in spectrochemical analysis II (1978) *Spectrochim Acta B* 33B:242
26. Cuadros L, García AM, Jiménez C, Roman M (1993) *Anal Lett* 26:1243–1258
27. Bosque JM, Cuadros L, García AM (1998) *Recent Res Dev Pure Appl Anal Chem I*:115–131

L. F. Capitán-Vallvey · E. A. Guerrero · C. B. Merelo
M. D. F. Ramos

A test strip for chloride analysis in environmental water

Received: 8 April 2004 / Revised: 10 June 2004 / Accepted: 14 June 2004 / Published online: 21 August 2004
© Springer-Verlag 2004

Abstract A disposable and reversible test strip for chloride is proposed. It is based on a polyester strip containing a circular sensing zone, 6 mm in diameter and 9.5 μm in thickness, with all the reagents necessary to produce a selective response to chloride. This sensing zone comprises a plasticized poly(vinyl chloride) (PVC) membrane that incorporates trioctyltin chloride as ionophore and 4',5'-dibromofluorescein octadecyl ester as chromoionophore. The prepared test strip works on a co-extraction system of chloride and hydrogen ions in the sensing zone. This disposable test strip can determine chloride simply by introducing the strip into a water sample containing a pH 2.0 buffer and measuring the absorbance at 534 nm as the analytical signal because the colour changes from red to orange. Experimental variables that influence the sensor response have been studied, especially those related to selectivity and response time. The sensor responds linearly in activities in the range 0.15–24.7 mM. The detection limit is 0.15 mM, the intermembrane reproducibility at a mid-level of the range is 6.4% relative standard deviation (RSD) of $\log a_{\text{Cl}^-}$ and the intramembrane reproducibility is 4.5%. The procedure was applied to the determination of chloride in different types of water (tap, well, stream and sea), validating results against a reference procedure. This proposed test system for chloride determination in waters is inexpensive, selective and sensitive and uses only conventional instrumentation.

Keywords Chloride determination · Optical test strip · Neutral ionophore · Water analysis

Introduction

Chloride is an anion whose analysis is highly demanded in different contexts such as with natural or industrial waters, soils, biological fluids or others. Usually, chloride ion in water is analysed in labs mainly by gravimetry, titrimetry, spectrophotometry, potentiometry (ISE), coulometry and ionic chromatography, but the use of test methods may be an alternative in some instances where it can offer a reduction in cost, time, and skilled labour as well as the possibility of using it wherever necessary and quite easily. Different test systems have been proposed for the quick and simple estimation and/or determination of chloride, mainly in water samples. Chloride test methods in solution include titrimetry, both visual and instrumental colourimetry, and radial chromatography in kits supplied by different companies such as CHEMetrics, Hach, Macherey–Nagel, Merck, Lange or Kyoritsu Chemical-Check, among others. Different solid-state test devices have been used for chloride determination. The simplest are test strip of papers impregnated with salts such as Ag_2CrO_4 [1] or complexes of organic reagents such as the silver complex of a triazine [2] or indicator tubes [3] for which the colour or area of the test strip or the length-of-stain of the indicator tubes is observed. Others test strips used, for clinical use mainly, include poly(vinyl chloride) (PVC) membranes based on ionophores [4] and enzymatic multilayer formats [5], both of which measure radiation absorption by transmission and reflection, respectively, or polyacrylamide membranes containing fluorescence quenchers, such as acridinium derivatives [6].

Among the host–guest systems for anions, the neutral organometallic ligands have been used for different sensing schemes based on the coordination of an anion to a Lewis acidic centre [7]. Various organotin compounds have been used as Lewis acid receptors for anion sensing, both for anion-selective electrodes [8, 9] and optodes [4]. The selectivity sequence observed deviates

L. F. Capitán-Vallvey (✉) · E. A. Guerrero · C. B. Merelo
M. D. F. Ramos
Department of Analytical Chemistry,
University of Granada, Granada 18071, Spain
E-mail: lcapitan@ugr.es

from the one observed with anion exchanger membranes, namely Hofmeister lyotropic anion selectivity sequence, because selectivity is not governed by simple anion lipophilicity but by specific chemical interaction between the neutral carrier and anion. Depending on the organic substituents, the selectivity usually deviates from the Hofmeister series and the chloride is highly favoured [10]. Other optical sensing schemes have been proposed for chloride [11–15]

We present here a sensing scheme for chloride based on a co-extraction mechanism and implemented in a test strip format. The test strip proposed is based on the use of the chloride-selective ionophore trioctyltin chloride and 4',5'-dibromofluorescein octadecyl as chromoionophore [16]. The optical test strip developed for chloride determination in water works in a reversible way and offers enough selectivity and sensitivity for its use in environmental water, which is the objective of this study.

Experimental

Reagents and materials

All chemicals used were of analytical reagent grade. Water (Milli-RO 12 plus Milli-Q station from Millipore) of reverse-osmosis-type quality was used throughout. Chloride stock solution (1,000 M) was prepared in water by exact weighing of dry potassium chloride (Sigma–Aldrich Química S.A., Madrid, Spain). Stock solutions (1,000 M) of the following ions were also used: Br^- , I^- , and NO_3^- , as potassium salts; and SO_4^{2-} , as the sodium salt, all from Merck (Darmstadt, Germany).

For preparing the sensing membranes PVC (high molecular weight), tributylphosphate (TBP), 2-nitrophenyloctylether (NPOE), bis(2-ethylhexyl)sebacate (DOS), dioctylphthalate (DOP), tris(2-ethylhexyl)phosphate (THEP) and tetrahydrofuran (THF) were purchased from Sigma and trioctyltin chloride (TOT) from Fluka (Fluka, Madrid, Spain). The chromoionophore dibromofluorescein octadecyl ester (BFE) was synthesized, purified and identified by us according to ref. [16]. Sheets of polyester-type Mylar (Goodfellow, Cambridge, UK) were used as support.

Apparatus and software

Absorbance measurements were performed with a Hewlett Packard HP-8453 diode array spectrophotometer (Nortwalk, CT, USA) interfaced to a Pentium MMX 200 microcomputer via an HP IB interface board and HP IB cable for spectral acquisition, and subsequent manipulation of data was used to perform the absorbance measurements. As software for the acquisition and manipulation of the spectral data, the UV–VIS Chemstation software package supplied by HP was used.

The absorbance measurements were performed by using a homemade cell holder [17] with a circular hole (4 mm in diameter) that delimits the surface of the light beam and prevents the possible refraction phenomena produced in the border of the sensing zone. These refraction phenomena would increase the errors in the measurement of the analytical signal. The absorbance measurements were made against a Mylar polyester sheet.

Other apparatus and laboratory materials used were a laboratory-made spin-on device [18], a digital pH meter with combined electrode from Crison (Crison Instruments, Barcelona, Spain), and an ultrasonic bath (Selecta, Ultrasons, Barcelona, Spain). Software programs used for the treatment of the data were a Statgraphics software package (Manugistics Inc. and Statistical Graphics Corporation, version 6, USA, 1992) and Graphmatica for Win 32 version 1:60d (edited by K. Hertzner and adapted by J. Garrido).

Membrane preparation

Mixtures for the preparation of the chloride-sensitive membrane contain 40.00 mg (37.8 wt%) of PVC, 63.50 mg (60.0 wt%) of DOS, 1.33 mg (1.26 wt%) of TOT and 1.00 mg (0.94 wt%) of BFE in 0.75 mL of freshly distilled THF. A 20- μL portion of this solution was cast on a 14 mm \times 4 cm \times 0.5-mm-thick polyester sheet by means of a laboratory-made spin-on device and stored in a vacuum dryer at room temperature to enable a slow solvent evaporation. The prepared membrane is a solid and homogeneous circular film, 6 mm in diameter and 9.5 μm in thickness, transparent and orange in colour, well adhered to the support. The concentrations of the ionophore and chromoionophore in a dry, thin-film obtained in the above way were calculated to be 25.4 mmol kg^{-1} and 12.7 mmol kg^{-1} , respectively.

Experimental procedure

An aliquot of aqueous standard solution containing between 0.15 and 24.7 mM in activities (0.18 and 31.6 mM in concentrations) of chloride was placed in a 50-mL flask together with 1 mL of pH 2.0 orthophosphoric acid/sodium dihydrogen phosphate 1 M buffer solution. A 10-mL aliquot of the above solution was placed in a 10 \times 1.5-cm polyethylene plastic tube, and a disposable test strip was introduced for 6 min into the tube without shaking. Next, the membrane was pulled out of the solution, wiped to remove any solution droplets, and its absorbance was measured at 534 nm. Before being used, all membranes were introduced into a 0.02 M NaOH solution to remove chloride ions from the sensing zone and change the colour to red. All measurements were carried out at room temperature.

In the case of the water samples, 8.0 mL of water, diluted if necessary, was introduced in a polyethylene

tube together with 2.0 mL of pH 2.0 orthophosphoric acid/sodium dihydrogen phosphate 0.1 M buffer solution, operating as described above.

Calculations

The K_e value to obtain an optimal fit of the experimental data was calculated according to ref. [19], in which values in the maximum slope zone of the calibration curves were taken, which offer more information and produce less error.

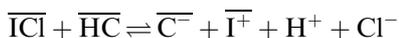
The degree of protonation (α ; Eq. 1) of chromoionophore was obtained from the spectra by using the minimum and maximum absorbance values (A_{HC} and A_{C^-}) from the spectra of equilibrated test strips with 10^{-2} M HCl and 10^{-2} M NaOH, respectively.

$$\alpha = \frac{A - A_{HC}}{A_{C^-} - A_{HC}} \quad (1)$$

But as the chromoionophore cannot be fully protonated ($\alpha \approx 0.95$) at the working pH (2.0), we used an effective α value, α_{eff} , in order to use a measurement which gives us the degree of protonation with respect to the pH 2.0 buffer solutions. Thus we calculate the minimum and maximum absorbance values, A_{buffer} and A_{C^-} , equilibrating strips with 10^{-2} M buffer and 10^{-2} M NaOH. Selectivity coefficients $K_{Cl^-, j^-}^{\text{opt}}$ were calculated by using the separate solution method (SSM) [20, 21]. Activities were calculated according to the Debye Hückel formalism [19].

Results and discussion

This test strip is based on an optical bulk membrane containing all necessary components for extraction and recognition of chloride dissolved in an homogeneous plasticized polymeric membrane [16, 22]. The host-guest recognition process of chloride by the ionophore I is coupled—through an electroneutrality condition—to the co-extraction of a reference ion, a proton, which is reversibly complexed by a pH indicator C, called a chromoionophore, that acts as a transducer of the recognition process. In contact to an aqueous solution containing chloride, the following co-extraction equilibrium holds in the test strip, characterised by the constant K_e :



Thus, the activities of Cl^- and H^+ in the sample solution determine their concentrations in the membrane. By using the absorbance of the deprotonated form of the chromoionophore, which is the measurable species in the membrane phase, the degree of protonation α , defined as the ratio of deprotonated chromoionophore to its analytical concentration C_o , is obtained. This normalized absorbance is the analytical parameter used.

The ion activities a_{Cl^-} and a_{H^+} in the aqueous phase are related to the equilibrium constant K_e and α through the response function:

$$a_{Cl^-} = \frac{(1 - \alpha)^2}{\alpha \left[\left(\frac{I_o}{C_o} - (1 - \alpha) \right) \right]} \times K_e a_{H^+} \quad (2)$$

where I_o and C_o are the analytical concentrations of ionophore and chromoionophore, respectively. We ignore the activity coefficients in the membrane phase. To optically determine chloride activities, the pH value is adjusted with an appropriate buffer solution to keep the pH value constant.

Optimisation of test strip response

Experimental parameters

The parameters that can influence the optical response may be related to: (a) the design and composition of the membrane and (b) the equilibration process between the sample solution and the test strip.

The type and proportion of plasticizer were optimised by taking into account the extent of the reaction with chloride, response time and selectivity. We then studied the selectivity of the membrane for concomitant anions in water for different ionophore to chromoionophore ratios.

We tested plasticizers coming from different groups such as phosphates esters, ethers and carboxylic acid esters, namely DOS, DOP, NPOE, TBP and THEP. The best results were obtained by using DOS or TBP in the order $DOS \approx TBP > DOP > NPOE > THEP$. To choose between the plasticizers DOS and TBP, the response times of different test strips were studied at a 65% level of plasticizer. For these experiments, the strip was placed on one side of a 10-mm-pathlength optical cell and 5 mL of 4×10^{-2} M of Cl^- solution was added. DOS was selected because its response time was a half that of TBP. The proportion of DOS was established by considering: (1) its influence on selectivity [23] with respect to usual concomitant anions in the intended application to natural waters and (2) its influence on the response rate. The selectivity coefficient $K_{Cl^-, j^-}^{\text{opt}}$ for Br^- , I^- , NO_3^- and SO_4^{2-} was calculated by using the SSM method for membranes containing DOS from 30 to 70% (Fig. 1). The experimental values of α_{eff} for sulfate were adjusted to the equation of a monovalent anion because at the working pH, the amount of HSO_4^- is significantly high. The selectivity order found ($I^- > Br^- > Cl^- \gg NO_3^- > SO_4^{2-}$) meant a change in the usual selectivity pattern of free transfer energy of anions from water to organic membrane (Hofmeister series), owing to the Lewis acidic interaction in the membrane by the ionophore. The percentage of plasticizer does not modify this order but the value of selectivity coefficients, especially for nitrate and sulfate, increases up to 50% of DOS.

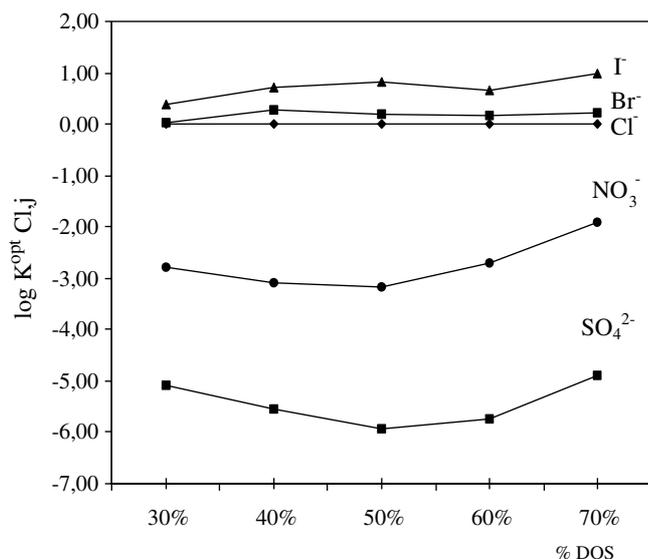


Fig. 1 Selectivity (SSM) variation of the test strip as a function of plasticizer percentage. Ionophore/chromionophore ratio = 1

Additionally, the proportion of DOS has a considerable influence on the response time of the test strip. The response times needed to reach equilibrium were: 9.5 min for 40%; 8 min for 50%; 6 min for 60%, and 8.5 min for 70%. The rate increased with the amount of DOS, as did the physical properties, up to a percentage of around 60%. With amounts higher than this, both the rate and the physical properties were worse because the membrane was less homogeneous and the preparation drying time increased. DOS (60%) was selected as the optimal percentage for all the subsequent experiments, although selectivity was better at 50%, because the selectivity factors found for this last percentage were sufficient, in most cases for the use of this test strip in water analysis and the response time decreased to 25%. Compared with other membranes for chloride based on a similar organotin ionophore [4], we observed a reduction in the response time from 10 to 6 min.

The optimal concentration of ionophore in the membrane was that needed to reach maximum chloride selectivity. Thus, the quantity of chromionophore was kept constant, in an amount adequate to minimise photometric error in the measurement of the absorbance, while the amount of ionophore was varied from 50 to 500%. Figure 2 shows the same selectivity pattern as that previously observed and a small influence of ionophore/chromionophore ratio on $K_{Cl^-jz^-}^{opt}$. However, an ionophore/chromionophore ratio of 2 was selected because of its better selectivity coefficients and better fit to the theoretical model. The $K_{Cl^-jz^-}^{opt}$ values found for this ratio were as follows: I⁻ (0.82), Br⁻ (0.19), NO₃⁻ (-3.21) and SO₄²⁻ (-3.26). The selectivity found means some improvement on results previously reported for a sensor membrane for chloride in serum that incorporates this ionophore but uses bis(1-butylpentyl)adipate as plasticizer (coefficients of 1.0, 0.3, -1.8, -2.8) [16].

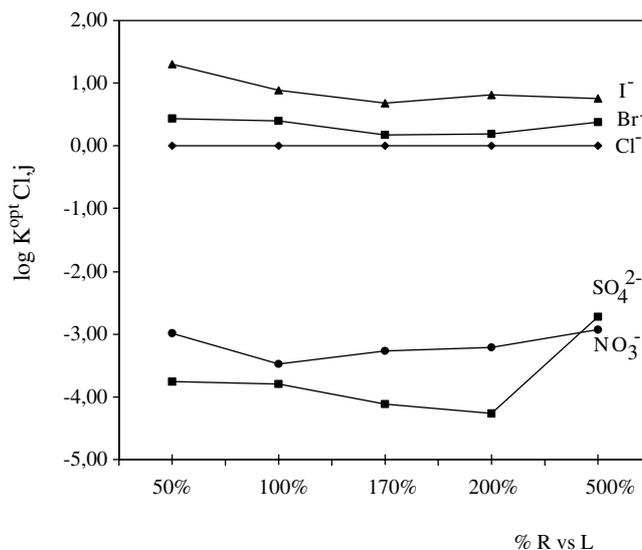


Fig. 2 Selectivity (SSM) variation of the test strip as a function of ionophore/chromionophore ratio. 60% DOS

Additionally, the use of a similar ionophore, tricyclohexyltin chloride, combined with bis(2-ethylhexyl)sebacate as plasticizer results in a membrane with lower selectivity coefficients [I⁻ (1.0), Br⁻ (0.5), NO₃⁻ (< -2.0)] [4].

Reaction parameters

The influence of pH on the response of the test strip was studied at different activities of chloride and different pH values (Fig. 3). Only at pH values below 5.0 does the co-extraction of Cl⁻ and H⁺ from bulk solution to membrane begin. For pH values between 2.0 and 4.0 there is

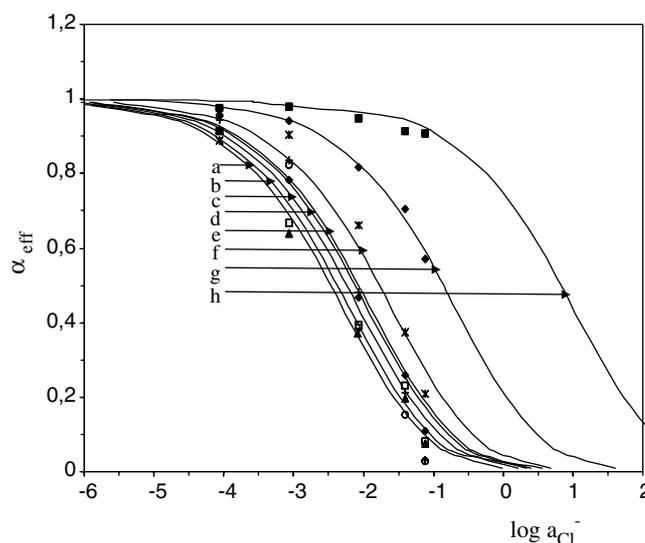


Fig. 3 Effect of pH on the test strip response a pH 2.0; b pH 2.4; c pH 2.7; d pH 3.0; e pH 3.4; f pH 4.0; g pH 5.2; h pH 7.2

a good fit (according to summation of residual squares) between experimental data and the theoretical model, but pH 2.0 was selected because the displacement to the left of the response curve is higher, increasing the sensitivity. As a buffer, we selected pH 2.0 orthophosphoric acid/dihydrogen phosphate at a final concentration of 2×10^{-2} M.

The optical response of the test strip based on trioctyltin chloride ionophore to chloride activities between 8.1×10^{-7} and 0.32 M in activities (1×10^{-6} and 0.5 M in concentration) at pH 2.0 is shown in Fig. 4. The effect of stoichiometry on the response curve shows a clear distinction between the stoichiometry 1:2 $\text{Cl}^-:\text{I}$ ($p=2$) and the others ($p=0.5$, $p=1$). The distinction between 0.5 and 1.0 stoichiometries is not clear, but we suppose according to Wuthier et al. [8] that 1:1 stoichiometry chloride:ionophore occurs in the membrane.

The least-squares fit of the experimental points in the linear maximum slope zone (six different concentration levels and nine replicates of each one) of the calibration curve to the mathematical model indicated by Eq. 2, makes it possible for us to calculate a value of $\log K_c$ of 4.41.

Analytical parameters

As a measuring range, we used the linear relationship in the middle of the sigmoidal response function defined by means of a lack-of-fit test and as the detection limit the intersection of the linear calibration function defined above and a linear function adjusted in the minimal slope zone [22], as shown in Fig. 5.

To characterise the proposed test strip, we prepared two series of standards: one in the maximum slope zone (six standards, nine replicates each one), between 4.05×10^{-4} and 8.00×10^{-3} in activities (5.00×10^{-4} and 1.00×10^{-2} M in concentration); and another in the

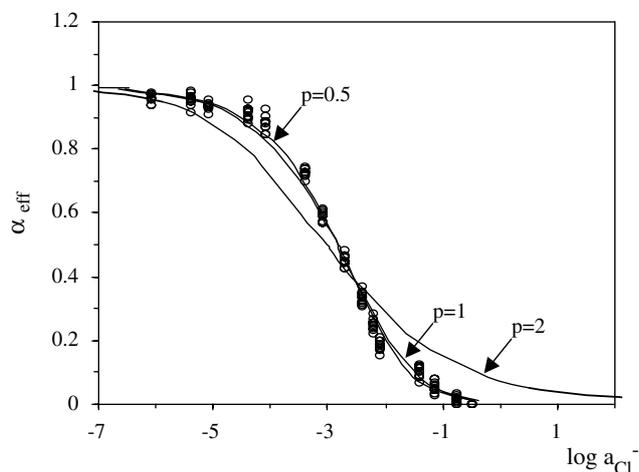


Fig. 4 The degree of protonation α_{eff} as a function of chloride activity

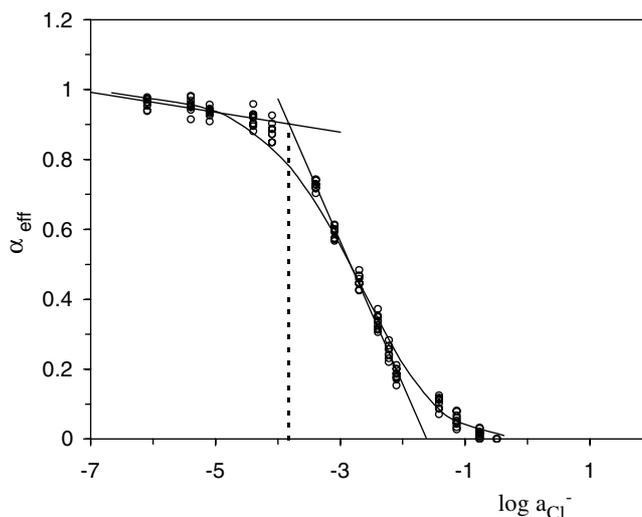


Fig. 5 Calibration plot for free chloride activity

minimum slope zone of lower activity (five standards, nine replicates each one), between 8.10×10^{-7} and 8.10×10^{-5} in activities (1.00×10^{-6} and 1.00×10^{-4} M in concentration). The linearity of both series was tested by applying the lack-of-fit test [24], and the linear functions obtained were: $\alpha_{\text{eff}} = -0.6538 - 0.4066 \log a_{\text{Cl}^-}$ and $\alpha_{\text{eff}} = 0.7924 - 0.0285 \log a_{\text{Cl}^-}$. The intercept of both functions gives us a detection limit of 0.15 mM. From the intercept of the linear calibration function with the abscissa, a value of 24.7 mM was obtained for the upper limit of the measuring range. Thus, the measuring range of the test strip proposed for chloride is between 0.15 and 24.7 mM, both expressed in activities.

The precision relative standard deviation (RSD) of the test strip was studied by using both the same disposable sensor and different sensors each time and for three activity levels of chloride: 4.05×10^{-4} , 2.02×10^{-3} and 8.00×10^{-3} M (5.00×10^{-4} M, 2.50×10^{-3} and 1.00×10^{-2} M in concentrations) and ten replicates of

Table 1 Analytical figures of merit

Parameter	Value (SD)
Intercept	-0.654 (0.022)
Slope	-0.407 (0.008)
Probability level % (lack-of-fit test)	8.32
Linear range (mM)	0.15–24.7
Detection limit (mM)	0.15
RSD (%) ^a	
Intrasensor (mM ^b)	
0.41	2.6
2.02	4.4
8.00	4.8
Intersensor (mM ^b)	
0.41	6.0
2.02	6.4
8.00	6.6

^aRSD for $\log a_{\text{Cl}^-}$

^bActivities tested

SD standard deviation

Table 2 Some characteristics of methods for the determination of chloride ions by using test methods

Test means	Method of detection	Analytical range (mg L ⁻¹)	Analysis time (min)	Reference
Merckoquant test strip	Visual (colour)	500–3,000	5	[26]
Aquaquant test kit	Visual (colour)	5–300	5	[27]
Hach test strip	Visual (colour)	30–600	–	[28]
Quantofix test sticks	Visual (colour)	500–3,000	–	[29]
Satesmo test paper	Visual (micro-titration on paper)	250–5,000	–	[30]
Kyoritsu chemical-check pack test	Visual (colour)	2–50100–200	110 s	[31]
Test strip	Visual (colour)	1,500–8,000	1	[2]
Test strip	Spectrophotometry	20–350	10	[4]
Test strip sealed	Visual (length of coloured zone)	0.1–1,000	10	[32]
Test strip	Visual (colour)	1,000–4,0002,000–6,000	0.50.5	[33]
Indicator powder	SFS	1–30	20	[3]
Indicator tube	Visual (length of coloured zone)	20–200	5	[3]
Membrane	Fluorescence quenching	3.5–3,550	–	[6]
Test strip	Spectrophotometry	5–877	6	This paper

Table 3 Determination of chloride in different types of water using an ISE as a reference method

Matrix	Test strip (mM Cl ⁻)	SD	Reference method (mM Cl ⁻)	SD	<i>p</i>
Sea water (Almuñecar, Granada)	498	12.73	479	20.41	34.5
Sea water (Almería)	555	76.59	493	12.04	11.0
Tap water (Balanegra, Almería)	6.8	0.98	6.1	0.15	30.8
Tap water (Almería)	0.8	0.32	0.83	0.02	72.0
Well water (Rebeque, Almería)	7.7	0.58	7.2	0.18	20.6
Stream water (Chauchina, Granada)	22.5	0.58	23.6	0.59	12.2

*Three replicate samples in both cases
SD standard deviation

each one. The precision for log a_{Cl^-} using the same strip was 2.6, 4.4 and 4.8% and for different strips 6.0, 6.4 and 6.6%. The results obtained indicate that the proposed test strip acts in a reversible way and offers better results, as RSD, when the same test strip is used than when we use different test strips, as was expected. Table 1 shows these and other analytical parameters. The performance characteristics of the developed and reported procedures for determining chloride are compared in Table 2.

Application of the method

The performance of the test strip in a practical situation was tested by measuring chloride in waters coming from diverse sources (tap, well, stream and sea). Table 3 shows the results obtained by using the proposed test strip and a reference potentiometric method [25]. This table includes the mean values from three determinations of each sample, standard deviations of these measurements and the probability value (P_{val}) of the test used for the comparison of the results obtained for both methods. As can be seen, the results obtained for both methods are statistically similar.

Conclusion

We have prepared an optical test strip for chloride determination based on an organotin ionophore which measures by transmission and which offers good performance, a sufficiently good repeatability and may be considered as an inexpensive alternative to obtaining analytical information in situ. The prepared membrane has sufficient selectivity for the determination of chloride in natural waters and can be successfully applied to the determination of this ion in waters from different sources. This sensor only requires buffering and offers good results with an accuracy, precision and cost that make it useful for routine analysis with portable equipment. The lifetime of the studied test strip is 1.5 months in usual conditions when protected from light. A disadvantage of the test strip is its relatively long response time of 6 min.

Acknowledgements We thank Dr. J. Isaac from the Department of Organic Chemistry, University of Granada, for his help with this work. We also acknowledge financial support from the Ministerio de Educacion y Cultura, Dirección General de Enseñanza Superior (Spain) (Project No. BQU2002-00353) and Plan Propio de la Universidad de Granada (2002-30PP000500).

References

1. Zolotov Yu, Ivanov VM, Amelin VG (2002) *Chemical test methods of analysis* XXXVI:192–194
2. Ruparisi Lakshman LS, Liese K (2000) Patent FR 2800166
3. Morosanova E, Velikorodnyi A, Myshlyakova OV, Zolotov Yu (2001) *J Anal Chem* 56:284–289
4. Hisamoto H, Miyashita N, Watanabe K, Nakagawa E, Yamamoto N, Suzuki K (1995) *Sensors Act B* 29:378–385
5. Clement PL (1977) Patent US 4 042 335
6. Kawabata Y, Toge Y (1997) Patent US 5 691 205
7. Martijn MM, Reinhoudt DN, Reinhoudt AN (1998) *Chem Commun* 443–448
8. Wuthier U, Pham HV, Zuend R, Welti D, Funck RJJ, Bezegh A, Ammann D, Pretsch E, Simon W (1984) *Anal Chem* 56:535–538
9. Moriuchi-Kawakami T, Aoto H, Takeda N, Fujimori K, Shibutani Y (2000) *Anal Sci* 16:303–307
10. Wuthier U, Pham HV, Rusterholz B, Simon W (1986) *Helv Chim Acta* 69:1435–1441
11. Buhlmann P, Pretsch E, Bakker E (1998) *Chem Rev* 98:1593–1687
12. Xu C, Qin Y, Bakker E (2004) *Talanta* 63:180–184
13. Ceresa A, Quin Y, Peper S, Bakker E (2003) *Anal Chem* 75:133–140
14. Zhang W, Rozniecka E, Malinowska E, Parzuchowski P, Meyerhoff ME (2002) *Anal Chem* 74:4548–4557
15. Hisamoto H, Watanabe K, Oka H, Nakagawa E, Spichiger-Keller UE, Suzuki K (1964) *Anal Sci* 10:615–623
16. Tan SSS, Hauser PC, Wang K, Fluri K, Seiler K, Rusterholz B, Suter G, Krüttli M, Spichiger-Keller UE, Simon W (1991) *Anal Chim Acta* 255:35–44
17. Capitán-Vallvey LF, Alvarez de Cienfuegos P, Fernández-Ramos MD, Avidad-Castañeda R (2000) *Sensors Act B* 71:140–146
18. Seiler K, Simon W (1992) *Anal Chim Acta* 266:73–88
19. Meier PC (1982) *Anal Chim Acta* 136:363–368
20. Bakker E, Simon W (1992) *Anal Chem* 64:1805–1812
21. Lerchi M, Bakker E, Rusterholz B, Simon W (1992) *Anal Chem* 64:1534–1540
22. Bakker E, Buhlmann P, Pretsch E (1997) *Chem Rev* 97:3083–3132
23. Preininger C, Mohr GJ, Klimant I, Wolfbeis OS (1996) *Anal Chim Acta* 334:113–123
24. Analytical methods committee (1994) *Analyst* 119:2363
25. American public health association (1981) Standard methods for the examination of water and wastewater, pp 273–275
26. Merck, Merckoquant (2004) <http://photometry.merck.de/servelet/PB/menu/1170820/1170820.html>
27. Merck A (2004) The sensitive test for drinking water and mineral water analysis. <http://photometry.merck.de/servelet/PB/menu/1169200/1169200.html>
28. Lange H (2004) Drinking water. http://www.hach-lange.co.uk/index/TOKEN/ab8_tmIFAKb92P1L_HYJ3oxH4F8/M/VLR5gQ
29. Sigma-Aldrich (2004) Quantofix test sticks. http://www.sigma-aldrich.com/Brands/Fluka_Riedel_Home/Analytical/Analytical_Specialties/AQUANAL_reg_/Test_Sticks.html
30. Macherey-Nagel (2004) Testpapers and test sticks. <http://www.macherey-nagel.com/web/MN-WEB-TestenKatalog.nsf/web/framesE?Open&showpage=MNTESTPAPIERE>
31. Kyoritsu (2004) Chemical-check, pack test. <http://kyoritsu-lab.co.jp/english/index.htm>
32. Nabivanets BI, Sukhan VV, Kokhonenko TV, Sukhan TA (1998) *Zh Anal Khim* 53:136
33. LaMotte (2004) Company insta-test. <http://www.lamotte.com/pages/pool/instaspe.html>

Disposable Receptor-Based Optical Sensor for Nitrate

Luis Fermín Capitán-Vallvey,^{*,†} Eduardo Arroyo-Guerrero,[†] María Dolores Fernández-Ramos,[†] and F. Santoyo-Gonzalez[‡]

Department of Analytical Chemistry and Department of Organic Chemistry, Faculty of Sciences, Campus Fuentenueva, University of Granada, Granada 18071, Spain

A new optical absorption-based disposable sensor for nitrate is described. The nitrate-sensitive element is a bicyclic cyclophane receptor next to a suitable pH-sensitive lipophilic dye immobilized in a plasticized polymeric membrane. The rigid amide-based receptor with C_3 symmetry controls the anion selectivity pattern of the optical element. The optical selectivity coefficients obtained for nitrate over a variety of naturally occurring anions in natural waters meet the requirements for the determination of nitrate in waters. The disposable sensor responds to nitrate rapidly—the typical response time is 5 min—and reversibly over a wide dynamic range (26 μM –63 mM) with sensor-to-sensor reproducibility (relative standard deviation, RSD, 3.68%, as $\log \alpha_{\text{NO}_3^-}$, at the medium level of the range and RSD 1.39% for repeated measurements with the same sensor). The performance of the optical disposable sensor was tested for the analysis of nitrate in different types of natural waters (river, well, spring), validating results against a reference procedure. The proposed method is quick, inexpensive, selective, and sensitive and uses only conventional instrumentation.

Anion recognition is a growing area of particular interest in supramolecular chemistry because of the challenge it brings when compared with cations (size, form, geometry, interactions, pH dependence, solvent effects) as well as its importance in environmental monitoring, medicinal diagnosis, and biological analysis.^{1,2}

Nitrate is an anion with a basic and weakly coordinating character, so selective recognition of nitrate requires both size and shape complementarity in the host. Different synthetic receptors have been studied for nitrate recognition mainly through hydrogen bond detaching. Here, the binding groups are arranged in a convergent and rigid manner using receptors with C_3 symmetry to match the functionality of the nitrate, as with the amide-based receptor prepared by Anslyn³ or the thiourea-based receptor by Herges.⁴ In other cases, both hydrogen bond-donating amides and an electrostatic contribution from the metal center is

used for nitrate recognition, such as with platinum(II) nicotinamide.⁵ Interaction via hydrogen bonding with protonated amines serves to complex two nitrates, such as with the C_3 symmetry bicyclic macrocycle obtained from condensation between tren and dicarboxaldehydes.⁶ Electrostatic interaction has been used also for nitrate recognition using quaternary ammonium hosts^{7–10} or cationic complexes such as Ni(II)–phenanthroline complex,¹¹ although selectivity is influenced by hydrophobicity according to the Hofmeister series,¹² which results in strong interference from anions of similar hydration energy, such as nitrate and chloride. Metal or Lewis acid coordination are other types of noncovalent interaction used to complex the anionic guest, such as the highly charged Pt complex, which encapsulates nitrate through Lewis acidic Pt atoms,¹³ or macrotricyclic Pd(II) metalcage, which in this case encapsulates nitrate through Pd atoms.¹⁴

The analytical use of these nitrate receptors is very limited. One citation is a spectrophotometric competition assay proposed for nitrate based on the displacement of an anionic dye, such as methyl red and resorufin, complexed with the receptor upon the addition of nitrate;¹⁵ however, the use of $\text{CH}_3\text{OH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ (1:1) as the solvent prevents its use in real samples.

In any application of the above receptors to analysis the important role played by solvent effects in controlling anion binding, strength and selectivity must be considered.¹⁶ For any application to real-life samples, which will be mostly aqueous, the competition between the neutral receptor and solvated anions in homogeneous solutions can lead to no reaction or to a small

* To whom correspondence should be addressed: (e-mail) lcapitan@ugr.es; (phone) +34 958248436; (fax) +34 958243328.

[†] Department of Analytical Chemistry.

[‡] Department of Organic Chemistry.

(1) Beer, P. D.; Gale, P. A. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2001**, *40*, 486.

(2) Gale, P. A. *Coord. Chem. Rev.* **2003**, *240*, 191.

(3) Bisson, A. P.; Lynch, V. M.; Monahan, M. K.; Anslyn, E. V. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1997**, *36*, 2340.

(4) Herges, R.; Dikmans, A.; Jana, U.; Köhler, F.; Jones, P. G.; Dix, I.; Fricke, T.; König, B. *Eur. J. Org. Chem.* **2002**, 3004.

(5) Chantelle, R. B.; Stephen, J. L.; Philip, A. G. *Chem. Commun.* **2001**, 2001, 729.

(6) Mason, S.; Clifford, T.; Seib, L.; Kuczera, K.; Bowman-James, K. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 8899.

(7) Hauser, P. C.; Litten, J. C. *Anal. Chim. Acta* **1994**, *294*, 49.

(8) Mohr, G. J.; Lehmann, F.; Östereich, R.; Murkovic, I.; Wolfbeis, O. S. *Fresenius J. Anal. Chem.* **1997**, *357*, 284.

(9) Koncki, R.; Glab, S.; Dziwulska, J.; Palchetti, I.; Mascini, M. *Anal. Chim. Acta* **1999**, *385*, 451.

(10) Högg, G.; Steiner, G.; Cammann, K. *Sens. Actuators, B* **1994**, *19*, 376.

(11) Lumpp, R.; Reichert, J.; Ache, H. J. *Sens. Actuators, B* **1992**, *7*, 473.

(12) Hofmeister, F. *Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.* **1888**, *24*, 247.

(13) Schnebeck, R.-D.; Freisinger, E.; Lippert, B. *Angew. Chem., Int. Ed.* **1999**, *38*, 168.

(14) Dillip, K. C.; Kumar, B.; Makoto, F. *Chem. Commun.* **2001**, 2001, 1652.

(15) Niikura, K.; Bisson, A. P.; Anslyn, E. V. *J. Chem. Soc., Perkin Trans.2* **1999**, 1111.

(16) Benniston, A. C. In *Encyclopedia of Supramolecular Chemistry*; Atwood, J. L.; Steed, J. W., Eds.; Dekker: New York, 2004.

displacement. The use of membrane-based schemes makes it possible to sense anions in aqueous solutions.

Nitrate ion is ubiquitous in environmental, food, industrial, and physiological systems, but the common sources of contamination in water are runoff from fertilizer use, leaching from septic tanks, sewage, and erosion of natural deposits.¹⁷ Nitrate can cause several sanitary problems¹⁸ among which the most serious include infant methemoglobinemia (or blue baby syndrome), especially in babies still on a milk diet, and the formation of nitrosamines upon reaction with secondary amines in food products, which is possibly related to the appearance of stomach cancer. These problems have been widely recognized, and as a consequence, statutory frameworks aimed at controlling their level within the wider environment, especially in water, have been established: one MCL of 10 mg/L as nitrogen in the United States¹⁹ and 50 mg/L as nitrate in the European Community countries.^{20,21}

Different analytical strategies have been employed to facilitate the detection, determination, and monitoring of nitrate²² mostly in water. These include disposable sensors, miniaturized self-contained analytical devices with the necessary reagents incorporated in the element in a dry format, which respond to the presence or concentration of an analyte, usually through a chemical or biochemical reaction. Electrochemical disposable sensors include capillary-fill device-type amperometric sensors,²³ based on the reduction of nitrate on a freshly prepared copper electrode from copper sulfate and a potassium hydrogen sulfate screen printed on the upper plate within the device.²⁴ Two types of potentiometric disposable sensors are described for nitrate: ion-selective electrodes prepared using screen-printing technology^{9,10} and potentiometric devices prepared by depositing the ion-sensitive polymer on a field-effect transistor gate insulator of ref 25. Tridodecylmethylammonium nitrate is the usual receptor, and here the selectivity follows the Hofmeister pattern.

Visual sensors for nitrate—test strips—are based on reduction to nitrite and the formation of a colored azo dye with the reagents adsorbed²⁶ or chemically immobilized on cellulosic supports.²⁷ Techniques used for qualitative or semiquantitative concentration determination are as follows: comparing the strip with a standardized color chart²⁸ or measuring the length or diameter of the colored zone of a polymer-sealed test strip.²⁷ Nitrate test strips in very different formats, mono- or multianalyte, are supplied by different companies such as Merck, Industrial Test Systems, Macherey-Nagel, Orion AQUAFast, Hach, Agri-Screen, CHEMetrics, and EnviroEquip among others for different applications such as water, soils, sap, plant tissues, forages, wines, fruit juices,

and whey. Optical disposable sensors for nitrate are based on the same reactions as visual ones, using measurement of an optical property, usually diffuse reflectance with free-standing instruments²⁷ or hand-held dedicated devices, as is the case with the pocket-sized digital Nitratechek reflectometer²⁹ and the Reflectoquant system from Merck.³⁰

The use of nitrate receptors or ionophores can improve conventional test strips for nitrate in different ways: (1) by not requiring reduction to nitrate or the formation of colored dyes, since in addition to the toxicity associated with nitrates, the reagents present in the commercialized reagent strips contain amines that are toxic in nature; (2) by increasing the dynamic range usually present in test strips for nitrate; (3) by easily determining nitrate concentration, while the majority of commercial strips only offer semiquantitative information; (4) by being reversible both because of the possibility of reuse that they offer and because of their advantage in error reduction.

The development of a highly selective optical disposable sensor procedure for nitrate based on a C₃ symmetry amide-based receptor with enhanced analytical characteristics over earlier disposable sensors is described.³¹

EXPERIMENTAL SECTION

Reagents. The chemicals used were of analytical reagent grade, and all aqueous solutions were prepared using reverse-osmosis-type quality water produced by a Milli-RO 12 plus Milli-Q purification system (Millipore, Bedford, MA).

Stock solutions (1 M) were prepared in water from potassium salts of nitrate, iodide, bromide (Merck, Darmstadt, Germany), sulfate (Panreac, Barcelona, Spain), and chloride (Sigma-Aldrich Química S.A., Madrid, Spain) and from sodium salts of perchlorate (Panreac), thiocyanate, nitrite, hydrogen carbonate, and acetate (Sigma-Aldrich). A 0.02 M concentration of a pH 6.0 buffer solution was prepared from sodium dihydrogen phosphate and sodium monohydrogen phosphate (Sigma-Aldrich).

For preparing the nitrate-sensitive films, high molecular weight poly(vinyl chloride) (PVC), tributyl phosphate (TBP), tris-(2-ethylhexyl) phosphate (TEHP), dioctyl phthalate (DOP), bis-(2-ethylhexyl) sebacate (DOS), 2-nitrophenyl octyl ether (NPOE), and tetrahydrofuran (THF) were purchased from Sigma-Aldrich. The chromoionophore *N,N*-diethyl-5-(octadecanoylimino)-5-benzotriazin-9-amine was synthesized, purified, and characterized by us according to ref 32. Sheets of Mylar-type polyester (Goodfellow, Cambridge, U.K.) were used as support.

Ionophore Synthesis. The synthesis of ionophore 2,16,18,32,45,47-hexaethyl-5,13,21,29,34,42,44,46,48-nonaazaheptacyclo-[15.15.11.1.3,31]1.7,11]1.15,19]1^{23,27}1^{36,40}]-octatetraconta-1,3(45),7(48),8,10,15(47),16,18,23(46),26,31,36,37,39-pentadecaene-6,12,22,28,35,41-hexone was made according to the two-step procedure described by Anslyn et al.^{15,33} but using an alternative way to synthesize the intermediate 1,3,5-tris(aminomethyl)-2,4,6-triethylbenzene (Figure 1). The nucleophilic displacement of tris-

(17) United Nations Environment Programme (UNEP) Millennium. Report on the Environment, Global Environmental Outlook. Earthscan Publications: London, 1999.

(18) Bruning-Fann, C. S.; Kaneene, J. B. *Vet. Hum. Toxicol.* **1993**, *35*, 521.

(19) EPA. National Primary Drinking Water Regulations. Internet. 2004.

(20) European Communities *Off. J. Eur. Commun.* **1998**, *L330*, 32.

(21) European Communities *Off. J. Eur. Commun.* **1991**, *L375*, 1.

(22) Moorcroft, M. J.; Davis, J.; Compton, R. G. *Talanta* **2001**, *54*, 785.

(23) Birch, B. J.; Burns I. W. Patent WO 8804048, 1988.

(24) Fogg, A. G.; Scullion, S. P.; Edmonds, T. E.; Birch, B. J. *Analyst* **1991**, *116*, 573.

(25) Knoll, M.; Cammann, K.; Dumschat, C.; Eshold, J.; Sundermeier, C. *Sens. Actuators, B* **1994**, *21*, 71.

(26) Lange, H.; Rittersdorf W.; Rey H. G.; Werner W.; Rieckmann P. U.S. Patent 4,061,468, 1977.

(27) Amelin, V. G.; Kolodkin, I. S. *J. Anal. Chem.* **2001**, *56*, 182.

(28) Jain, A. V.; Ross, P. F.; Carlson, M. P. *J. AOAC* **1999**, *82*, 9.

(29) Ijkelkamp. Soil Analysis. 2004. <http://www.eijkelkamp.com>.

(30) Merck. Reflectoquant Liquid Analysis System. 2004.

(31) Capitán-Vallvey, L. F.; Fernandez Ramos M. D.; Arroyo E. Patent ES P 200500199, 2005.

(32) Morf, W. E.; Seiler, K.; Rusterholz, B.; Simon, W. *Anal. Chem.* **1990**, *62*, 738.

(33) Metzger, A.; Lynch, V. M.; Anslyn, E. V. *Angew. Chem., Int. Ed.* **1997**, *36*, 862.

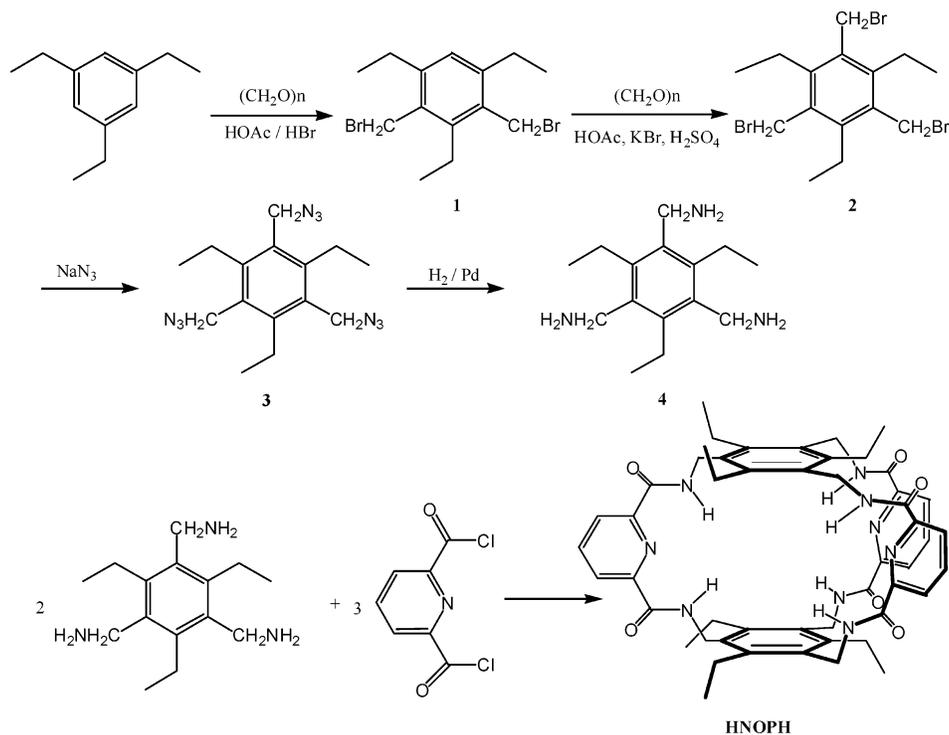


Figure 1. Synthesis of HNOPH ionophore.

(bromomethyl) derivative **2** with sodium azide to form the triazide derivative **3** was carried out using a hydro alcoholic mixture (ethanol/water 9:1) at reflux temperature. The transformation of triazide into triamine derivative **4** was not done with triphenylphosphine as described by Anslyn et al. but by means of reduction with hydrogen–Pd–C. Characterization of the intermediate and synthesized ionophore was made by ^1H NMR, ^{13}C NMR, IR, and HRMS (FAB +), obtaining data identical to that reported.

Preparation of Disposable Membranes and Measurement Setup. The membranes were produced on a polyester substrate using a spin-coating technique. Mixtures for the preparation of nitrate-sensitive membranes were made from a batch of 29.20 mg (32.2 wt %) of PVC, 58.80 mg (65.0 wt %) of TBP, 1.50 mg (1.7 wt %) of HNOPH, and 1.00 mg (1.1 wt %) of *N,N*-diethyl-5-(octadecanoylimino)-5*H*-benzo[*a*]phenoxazine-9-amine dissolved in 1 mL of freshly distilled THF. The disposable sensors were cast by placing 15 μL of the cocktail on a 14 mm \times 40 mm \times 0.5 mm thick polyester sheet using a homemade spin-coater³⁴ rotating at 180 rpm. After spinning for 10 s, the membrane was removed from the spin-coater and dried in a dryer with saturated THF atmosphere for 10 min at room temperature. The sensing area of the disposable sensor is a transparent and red 6-mm-o.d. circular film with a calculated thickness of ~ 4.5 μm and a concentration of ionophore and chromoionophore in a dry thin film of 1.71 mmol $\cdot\text{kg}^{-1}$ for both chemicals. It is also possible to prepare the disposable sensors in cellulosic or in clothlike supports by a two-bath process for buffer and cocktail with the advantages of simplicity and response time.

The response of the disposable sensors was evaluated by adding 8 mL of test solution to a polyethylene plastic tube together

with 2 mL of pH 6.0 buffer solution. The disposable sensor was then introduced for 5 min into the tube without shaking. After reaching equilibrium, the membrane was pulled out of the solution, wiped to remove any solution droplets, and its absorbance was measured at 660 nm in a Hewlett-Packard diode array spectrophotometer (model 8453; Nortwalk, CT) provided with a 44-mm-high, 12-mm-wide homemade membrane cell holder made of a matte black painted iron block.³⁵ To correct for the background absorbance, the measurements were made against a Mylar polyester strip. All measurements were carried out at room temperature. The membranes were not conditioned before use. The maximum and minimum absorbance values, corresponding to the fully protonated (A_{HC^+}) and deprotonated (A_{C}) forms of the chromoionophore necessary for calculation of α values, were measured by conditioning the disposable sensors in 10^{-2} M HNO_3 and 2×10^{-2} M NaOH, respectively. Activities were calculated according to the two-parameter Debye–Hückel formalism.³⁶ The coextraction constants $K_{\text{e}1}$, $K_{\text{e}2}$, and $K_{\text{e}3}$ were calculated according to ref 37 using values in the maximum slope zone of the experimental response functions for nitrate, which provided more information and less error, with disposable sensors prepared with ($K_{\text{e}1}$ and $K_{\text{e}3}$) and without ionophore ($K_{\text{e}2}$). The selectivity coefficients $K_{\text{NO}_3^-}^{\text{opt}}$ were determined with separate solutions of the interfering ions (SSM).^{38,39} Software programs used for the treatment of the data and fitting of experimental data to theoretical response function were as follows: Statgraphics software package

(35) Capitán-Vallvey, L. F.; Fernández-Ramos, M. D.; Alvarez de Cienfuegos, P.; Santoyo-Gonzalez, F. *Anal. Chim. Acta* **2003**, *481*, 139.

(36) Meier, P. C. *Anal. Chim. Acta* **1982**, *136*, 363.

(37) Capitán-Vallvey, L. F.; Fernández-Ramos, M. D.; Alvarez de Cienfuegos, P. *Anal. Chim. Acta* **2002**, *451*, 231.

(38) Bakker, E.; Simon, W. *Anal. Chem.* **1992**, *64*, 1805.

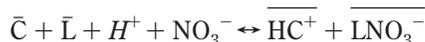
(39) Lerchi, M.; Bakker, E.; Rusterholz, B.; Simon, W. *Anal. Chem.* **1992**, *64*, 1534.

(34) Seiler, K.; Simon, W. *Anal. Chim. Acta* **1992**, *266*, 73.

(Manugistics Inc. and Statistical Graphics Corp., 1992), ver. 6.0 STSC Inc. Statistical Graphics Corp. (1993), and Graphmatica for Win 32 ver. 1:60d (1998 edited by K. Hertzner and adapted by J. Garrido).

RESULTS AND DISCUSSION

The sensing mechanism used in this disposable sensor relies on a coextraction process between a bulk membrane of plasticized PVC and the aqueous problem containing the analyte.⁴⁰ Although reversibility is not strictly necessary for a disposable sensor, this system provides advantages in terms of reversibility and also creates an ample measuring range and a short response time. In this mechanism, the selective binding of nitrate by the ionophore L is accompanied by protonation of the chromoionophore C to maintain the electroneutrality of the membrane, which generates the analytical signal. In this case, the use of lipophilic ionic additives is not required for extraction considering the neutral character of both the ionophore and basic form of chromoionophore, as is observed experimentally. The following coextraction equilibrium holds, if it is assumed that LNO_3^- and HC^+ are the species produced:



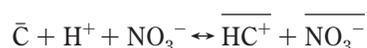
in which barred species are in membrane phase, while all other chemicals are in aqueous solution.

The description of the disposable sensor response characteristics can be accomplished through the protonation degree α ($[\text{C}]/[\text{C}_\text{C}]$) measured by the absorbance of the protonated form of chromoionophore, which is the measurable species in membrane phase, as a normalized absorbance.⁴⁰ The α value is related to the coextraction constant K_{e1} , the analytical concentrations of ionophore C_L and chromoionophore C_C , and the activities of NO_3^- and H^+ in the aqueous sample through the response function:

$$K_{e1} = \frac{(1 - \alpha)^2}{\alpha \left(\frac{C_L}{C_C} - (1 - \alpha) \right) a_{\text{NO}_3^-} a_{\text{H}^+}} \quad (1)$$

Accordingly, adjusting the pH with an appropriate buffer makes it possible to optically determine nitrate activity in solution.

In the absence of ionophore in the membrane, an extraction of nitrate to the sensing membrane is observed due to another coextraction process, nitrate and proton, due to the presence of the basic chromoionophore in membrane according to



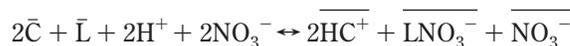
Analogously, the process can be characterized by a coextraction constant K_{e2} according to

$$K_{e2} = \frac{1 - \alpha}{\alpha a_{\text{H}^+} a_{\text{NO}_3^-}} \quad (2)$$

The selected ionophore HNOPH is a rigid bicyclic cyclophane¹⁶ proposed by Anslyn's group and obtained by condensation of 1,3,5-tris(aminomethyl)-2,4,6-triethylbenzene with 3 equiv of 2,6-pyridinedicarbonyl dichloride that produces a C_3 symmetric host with six amide groups converging in the center of a binding pocket.¹⁵ The trigonal prismatic array of this ionophore is able to coordinate to the π -electron system of planar nitrate within the cavity of the box forming an 1:1 complex.³

N,N-Diethyl-5-(octadecanoylimino)-5*H*-benzo[*a*]phenoxazine-9-amine was used as chromoionophore, taking into consideration its acidity characteristics and the pH requirements of the whole process. To select the plasticizer, we conducted a preliminary study with different plasticizers (TBP, TEHP, NPOE, DOS, DOP), monitoring the response signal over NO_3^- , Cl^- , and SO_4^{2-} , reversibility, and response time. DOP and DOS produced a small and nonreversible response (12 and 5% of the highest signal) and very similar for the three anions studied. On the contrary, NPOE is more selective, giving a higher response (75%), which is reversible but very slow. Phosphate esters gave high signals (TBP 100%, TEHP 83%), which were also selective and reversible, with less response time, but in this case, the signals for TBP were highest and fastest, and TBP was thus used as plasticizer for all subsequent experiments.

As the coextraction scheme indicates, the response of the disposable sensor depends on proton activity. An increase in proton activity displaces quantitatively the response to lower nitrate activity (Figure 2A) but also increases the coextraction of nitrate in membranes without ionophore (Figure 2B) in good agreement with both theoretical models. Moreover, at low pH values, the response of the membranes containing ionophore did not shift quantitatively with pH as indicated by the theory, which states that the product of nitrate and hydrogen ion activity in solution must produce a single theoretical response curve. At pH values lower than 5.0, the response function shifted to the right of the theoretical response function, which implies that the α values are lower than predicted by the theory, so, the fraction of protonated chromoionophore is higher than expected and with a higher slope. An additional coextraction process without ionophore might be taking place at proton activities from 10^{-5} and higher. This mixed model in membranes containing ionophore takes into consideration the coextraction of nitrate and proton, but not all the nitrate must be complexed with ionophore, according to



a process characterized by a coextraction constant K_{e3} :

$$K_{e3} = \frac{(1 - \alpha)^3}{\alpha^2 \left(\frac{C_L}{C_C} - (1 - \alpha) \right) a_{\text{NO}_3^-}^2 a_{\text{H}^+}^2} \quad (3)$$

Indeed, as shown in Figure 2, the response curves for $\text{pH} \leq 5$ fit to this mixed model, which accounts for the intermediate slope observed between that of the models with and without ionophore.

At a pH value from 6 on, the coextraction model given by eq 1 works well and the sensing system shows enough sensitivity to determine nitrate in water together with minimization of the nitrate

(40) Bakker, E.; Bühlmann, P.; Pretsch, E. *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 3083.

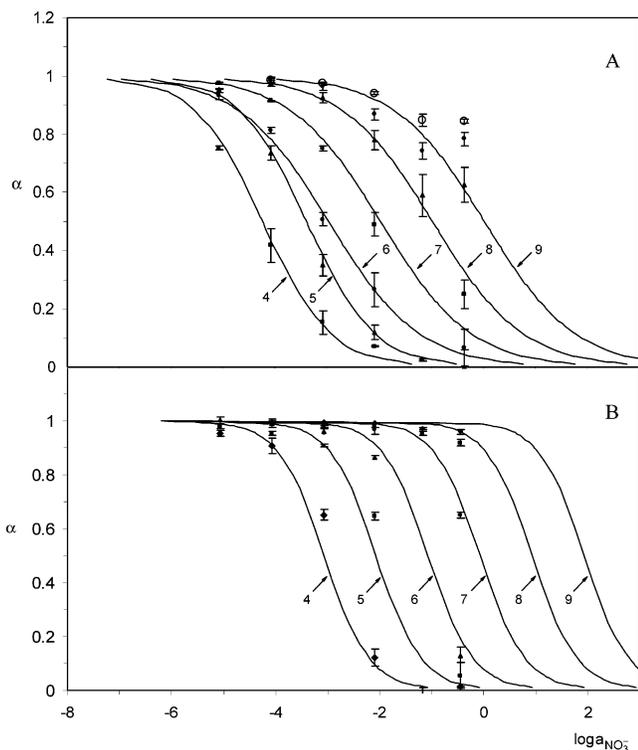


Figure 2. Effect of pH on disposable sensor response at the following pHs: (4) 4.0, (5) 5.0, (6) 6.0, (7) 7.0; (8), and (9) 9.0. (A) with ionophore; (B) without ionophore. Open circles in the top figure are tetramethylammonium nitrate response at pH 9.

coextraction without ionophore (no answer is observed for nitrate concentration lesser than 10^{-2} M) in agreement with the coextraction constants calculated: K_{e1} , 9.06 ± 0.04 ; K_{e2} , 6.90 ± 0.08 . Additionally, the slope for disposable sensors containing ionophore is half of that without ionophore as the models predicted, which shifts, in this case, the dynamic range to lower nitrate concentrations. For pH higher than 7, the response to nitrate decreases due to the low proton concentration, and the remainder of the experiments were thus performed at pH 6.0.

From the horizontal distance of the two response curves at half-protonation, obtained at pH 6.0 for membranes with and without ionophore, it is possible to estimate the complex formation constant of nitrate complex with HNOPH within the solvent polymeric membrane phase, using the procedure proposed by Bakker et al.⁴¹ We accept the assumptions indicated there and suppose that complexation with ionophore, forming a 1:1 complex, is the prevalent process at this pH. The value found ($\log \beta_{LNO_3^-} = 3.8 \pm 0.1$), although not very high, is higher than that reported for the same complex in bulk solution with solvents of increasing polarity. Namely, a value of 2.48 has been reported using ¹H NMR titration in CD_2Cl_2/CD_3CN (25:75 v/v) as solvent³ (dielectric constant estimated, 31; dielectric constant of plasticizer TBP, 8), as is usual considering the different free energies of solvation of nitrate in each solvent.

At high pH values and high nitrate concentrations, there is a strong deviation from the theoretical behavior predicted for the membrane with the ionophore model (Figure 2A), with high

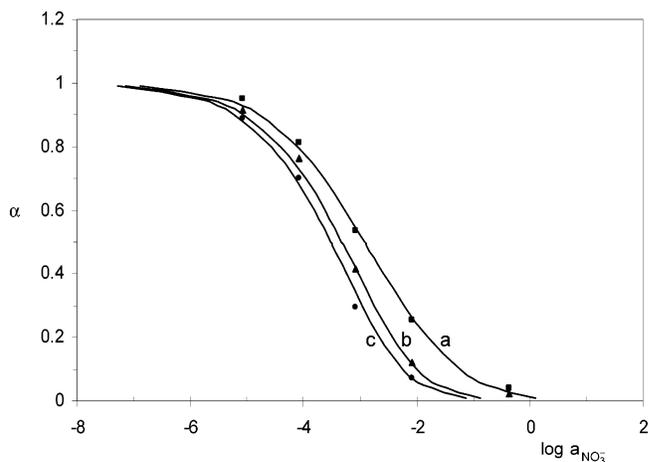


Figure 3. Displacement of response function with C_L/C_C ratio. (a) 1:1; (b) 2:1; (c) 3:1.

experimental α values observed and, thus, low protonation of basic chromoionophore. This could be explained considering that given that the proton activity at basic pH is low, the feasibility of chromoionophore protonation needed to counteract nitrate complexation in the membrane is also low, and therefore, the counterion present in solution, potassium in this case, is extracted. This behavior makes nitrate extraction possible, but creates a cation interference. Such behavior is not very common with bulk optodes but has been observed in some instances, such as by Ceresa et al. in a sensor for chloride based on [9]mercuracarborand-3 ionophore.⁴² Experiments performed with nitrate standard solution, in which the nitrate counterion potassium has been replaced by the more lipophilic tetramethylammonium, show a response curve even more shifted and confirm the cation interference (see Figure 2).

The scheme used for the development of a disposable sensor for nitrate does not need lipophilic anions whose ratio against ionophore greatly influences selectivity.⁴³ For this reason, the influence of ionophore on the membrane was tested as an ionophore/chromoionophore (C_L/C_C) ratio, maintaining an adequate quantity of the chromoionophore to minimize photometric error in the measurement of the absorbance. An increase in the C_L/C_C ratio implies, as predicted by the above-proposed model, a displacement of response function to the left and a slight increase in slope (Figure 3). For this reason, although the selectivity coefficient increases slightly with the C_L/C_C ratio (Figure 4), a 1:1 ratio was selected because of the lower response function slope, which shows a more extensive dynamic range to nitrate.

The percentage of plasticizer in the membrane is shown to have very little influence on selectivity. Consequently, and to optimize the amount of plasticizer, the response time and physical properties of the disposable sensor were studied. The response time to reach the equilibrium ($t_{95\%}$) was measured with different membranes for an intermediate nitrate concentration 10^{-4} M obtaining the following: 12 min for 50% TBP, 7.0 min for 60%, 5 min for 65%, 6.5 for 70%, and 7 min for 80%. With amounts higher than 70%, the physical properties are worse because the membrane is less homogeneous and the drying time increases. The value of 65% for TBP was chosen as a compromise.

(41) Bakker, E.; Willer, M.; Lerchi, M.; Seiler, K.; Pretsch, E. *Anal. Chem.* **1994**, *66*, 516.

(42) Ceresa, A.; Quin, Y.; Peper, S.; Bakker, E. *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 133.

(43) Zhang, W.; Jenny, L.; Spichiger-Keller, U. E. *Anal. Sci.* **2000**, *16*, 11.

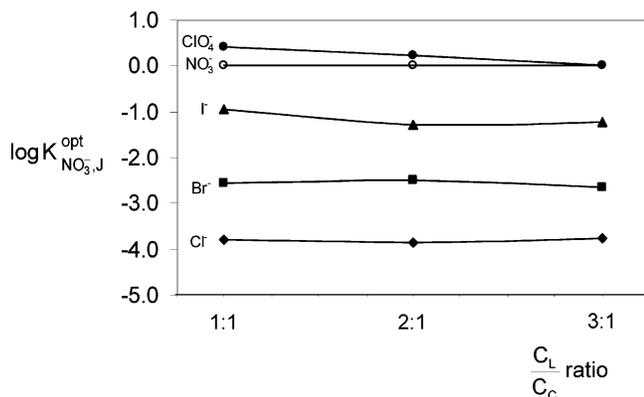


Figure 4. Selectivity (SSM method) variation of disposable sensor as a function of C_L/C_C ratio. (a) perchlorate; (b) nitrate; (c) iodide; (d) bromide, (e) chloride.

To calculate the selectivity coefficients for the disposable sensor described, we obtained the response curves for different anions using both membranes with and without ionophore, in all cases at pH 6.0, adjusted with $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 0.02 M buffer solution. The results obtained using membranes without ionophore fit the theoretical curve described by eq 2, but this is not the case for most of the anions using membranes with ionophore, since the slope of the curves is systematically higher than predicted by eq 1 but lower than indicated by eq 2. We assume that the complex formation constant for most of the anions is very small, as could be inferred from the position of the primary anion curve with respect to the interfering curves and the low value for nitrate constant discussed above. Consequently, the equilibrium due to complex formation could not be displaced very much and simple coextraction of anions governed by lipophilicity could take place simultaneously. The use of an equation such as eq 3 corresponding to the above mixed model makes it possible to fit experimental α values for most of the interferences, except for chloride and nitrite (Figure 5). In this last case, there is a strong deviation of the model at high nitrite concentrations.

The optical anion selectivity measured by $K_{\text{NO}_3^-,j}^{\text{opt}}$ of the disposable sensor described at pH 6.0, and measured by the SSM method, follows the Hofmeister series for membranes that do not contain ionophore, $\text{ClO}_4^- > \text{SCN}^- > \text{I}^- > \text{NO}_3^- > \text{Br}^- > \text{HCO}_3^- > \text{Cl}^- \cong \text{SO}_4^{2-} \cong \text{NO}_2^- > \text{CH}_3\text{COO}^-$, with a change in the usual order for $\text{Cl}^- > \text{HCO}_3^- > \text{CH}_3\text{COO}^- > \text{SO}_4^{2-}$. In the presence of ionophore, the displacement of the reaction is higher, an idea supported by the increase in absorbance due to the protonated form of the chromoionophore (see Figure 5). Additionally, the selectivity sequence changes to $\text{ClO}_4^- \cong \text{SCN}^- > \text{NO}_3^- > \text{I}^- > \text{Br}^- \cong \text{NO}_2^- > \text{Cl}^- > \text{HCO}_3^- > \text{SO}_4^{2-} \cong \text{CH}_3\text{COO}^-$, increasing the selectivity against nitrate, due to the selective interaction between the cyclophane and nitrate, which is consistent with the data previously reported in the bibliography.^{3,15} Table 1 offers $K_{\text{NO}_3^-,j}^{\text{opt}}$ values found. The poor selectivity observed with acetate is particularly striking in view of the acetate selectivity found for this same ionophore in $\text{CD}_2\text{Cl}_2/\text{CD}_3\text{CN}$ (25:75 v/v) mixtures as solvent with association constants of 770 and 300 M^{-1} for acetate and nitrate, respectively. However, other H-bonding ionophores containing calix[4]arene amide moieties show a similar pattern, thus, 370 and 200 M^{-1} for the same ions in acetone- d_6 .⁴⁴ In other cases, the association constant of H-bonding ionophores with

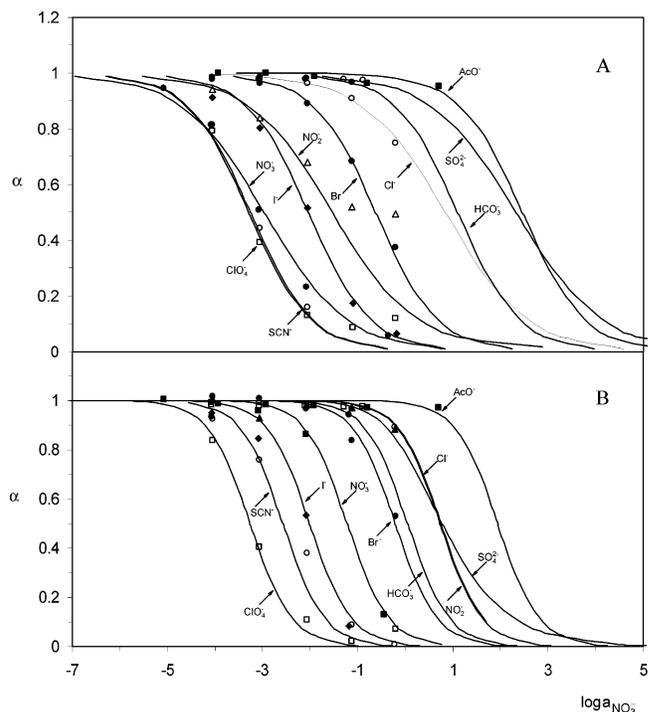


Figure 5. Selectivity of disposable sensor system at pH 6.0. (A) Membranes with ionophore. Solid lines are theoretical response curves according to eq 1 for nitrate, nitrite, and chloride and according to eq 3 for the rest of the anions. (B) Membranes without ionophore. Solid lines are theoretical response curves according to eq 2.

Table 1. Selectivity Coefficient $K_{\text{NO}_3^-,j}^{\text{opt}}$ for HNOPH-Based Optical Disposable Sensor in Comparison with Membranes without Ionophore (SSM Method)

anion	with ionophore	without ionophore
SCN^-	0.3 ± 0.08^a	1.4 ± 0.07
ClO_4^-	0.3 ± 0.13	2.04 ± 0.02
NO_3^-	0	0
I^-	-0.97 ± 0.01	0.78 ± 0.02
NO_2^-	-2.4 ± 0.13	-2.0 ± 0.12
Br^-	-2.3 ± 0.13	-0.98 ± 0.05
Cl^-	-3.8 ± 0.12	-1.96 ± 0.01
HCO_3^-	-4.0 ± 0.12	-1.26 ± 0.01
AcO^-	-5.4 ± 0.13	-3.5 ± 0.02
SO_4^{2-}	-5.3 ± 0.13	-1.99 ± 0.02

^a \pm standard deviation of three replicates.

nitrate is higher than that of acetate; this is the case with the Pt(II) nicotinamide complex ionophore (K_{a1} , 230 M^{-1} ; K_{a2} , 491 M^{-1} for acetate in $\text{CD}_3\text{CN}/\text{DMSO}-d_6$, 3 + 1 v/v; K_{a1} , 562 M^{-1} ; K_{a2} , 132 M^{-1} for nitrate in CD_3CN)⁵ although the difference is much greater with our case.

The response of the disposable sensor to nitrate activities between 2.59×10^{-1} and 8.37×10^{-7} M in activities (0.5 and 10^{-6} M in concentrations) at pH 6.0 is shown in Figure 6 along with the theoretical response function using eq 1 for the stoichiometric ratio of ionophore/nitrate, $p = 1$ and 2. The effect of the stoichiometry on the theoretical response curve for this case is small, hindering a clear distinction between different stoichio-

(44) Sansone, F.; Baldini, L.; Casnati, A.; Lazzarotto, M.; Ugozzoli, F.; Ungaro, R. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2002**, *99*, 4842.

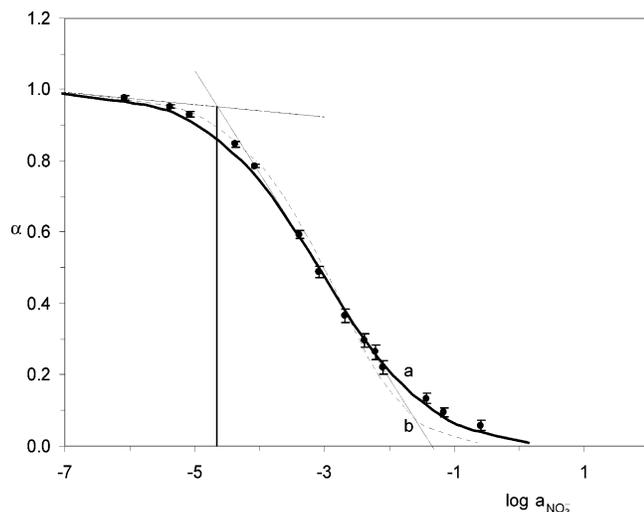


Figure 6. Calibration plot for free nitrate activity. Solid lines are theoretical curve for 1:1 stoichiometry (L/M) and dashed line for 2:1 stoichiometry.

metries in membrane. We assume, according to studies of Anslyn et al.,³ that a 1:1 complex occurs in the membrane. The fit by least squares of the experimental points, in the linear maximum slope zone (8 different concentration levels and 9 replicates of each one) of the response curve for nitrate to the theoretical model indicated by eq 1, makes it possible for us to calculate for $\log K_{e1}$ the value 9.06 ± 0.04 .

ANALYTICAL CHARACTERIZATION AND APPLICATIONS

The measuring range of a disposable sensor based on bulk optode membranes that exhibits a sigmoidal shape response function has been defined in different ways: (i) by the linear relationship in the middle of the response function in such a way that the slope does not deviate more than 1 or 0.1% from its maximum value³⁴ or that the slope does not decrease less than a factor of 2 compared with its maximum value;⁴⁰ (ii) taking into account the nonlinear behavior of the activities between the upper and lower limits of the measuring range,^{34,40} which depends on the definition of the detection limit.^{34,39,45} In this case, the linear relationship in the middle of the sigmoidal response function defined by means a lack-of-fit test is used as the measuring range and the intersection of the linear calibration function and a linear function adjusted in the minimal slope zone (background) as the detection limit.

To characterize analytical behavior of the disposable sensor, two series of standards are used, one in the maximum slope zone (8 standards, 9 replicates each one), between 2.20×10^{-5} and 8.09×10^{-3} in activities (2.62×10^{-5} and 1.00×10^{-2} M in concentration), and another in the minimum slope zone of lower activity (3 standards, 9 replicates each one), between 8.37×10^{-7} and 2.20×10^{-5} M in activities (1.00×10^{-6} and 2.62×10^{-5} M in concentration). The linearity of both series was tested by applying the lack-of-fit test,⁴⁶ and the linear functions obtained were, respectively, $\alpha = -0.3868 - 0.2875 \log a_{\text{NO}_3^-}$ and $\alpha = 0.8724 - 0.0172 \log a_{\text{NO}_3^-}$. The detection limit obtained by the interception

Table 2. Analytical Figures of Merit

parameter	value
intercept	-0.387 (0.010)
slope	-0.288 (0.003)
probability level % (lack-of-fit test)	5.6
linear range (mg/L)	1.63–3886
detection limit (mg/L)	1.63
RSD (%) ^a intrasensor	
1.0×10^{-4} M	1.68
2.5×10^{-3} M	1.39
1.0×10^{-2} M	2.77
RSD (%) ^a sensor-to-sensor	
1.0×10^{-4} M	0.79
2.5×10^{-3} M	3.68
1.0×10^{-2} M	6.25
anal. param. (nm)	absorbance, 660
response time (min)	5
cost (euro/strip)	0.04
lifetime (weeks)	6
reusability (weeks)	3

^a RSD for $\log(a_{\text{NO}_3^-})$.

of both functions is 0.022 mM in activities (0.026 mM in concentration) (Figure 6). The upper limit of the measuring range was obtained from the intercept of the linear calibration function with the axis of abscise; the value obtained is 45.15 mM in activities (62.68 mM in concentration). Thus, the measuring range for nitrate determination is between 22 μ M and 45.15 mM in activities (26 μ M and 62.68 mM in concentration or 1.63 and 3886 mg/L).

The precision (RSD) using the same disposable sensor was calculated at three activity levels of nitrate, namely, 1.0×10^{-4} , 2.5×10^{-3} , and 1.0×10^{-2} M and 10 replicates of each one, and has values of 1.68, 1.39, and 2.77% for $\log a_{\text{NO}_3^-}$. The sensor-to-sensor repeatability, working at the same three activity levels of NO_3^- and 10 replicates of each one, has values of 0.79, 3.68, and 6.25% for $\log a_{\text{NO}_3^-}$. The disposable sensor described here works in a reversible way, meaning reuse is possible after conditioning with 0.02 M NaOH. The reusability, tested with a series of membranes checked once a day at a nitrate concentration in the middle of the range and preserved dry and protected from light, has a mean of 3 weeks. The lifetime of disposable sensors, checked in a similar way and preserved from light and excessive humidity, is at least one and a half months. Table 2 shows these and other analytical parameters.

The analytical performance of the disposable sensor described here is better than that of other electrochemical and optical disposable sensors described to date. For instance, the amperometric capillary-fill devices work between 10^{-3} and 10^{-5} M²³ while the potentiometric disposable sensors work from 10^{-2} to 2.5×10^{-5} M¹⁰ and 10^{-2} – 10^{-5} M⁹ and 10^{-2} – 2.6×10^{-4} M.²⁵ Marketed disposable optical sensors range between 4.8×10^{-5} and 3.6×10^{-3} M (Reflectoquant³⁰) and 8.1×10^{-5} – 8.1×10^{-3} M (Nitratech²⁹).

The values of $K_{\text{NO}_3^-}^{\text{opt}}$ obtained using membranes with the optimum composition reflect that the described disposable sensor is in the order of 6.3×10^3 times more selective for nitrate than for chloride, 1.0×10^4 times more than for hydrogen carbonate, and 2.0×10^5 times more than for sulfate. Although the concept of required selectivity coefficients³⁸ is not clearly suitable for a

(45) Bakker, E.; Willer, M.; Pretsch, E. *Anal. Chim. Acta* **1993**, *282*, 265.

(46) Analytical Methods Committee. *Analyst* **1994**, *119*, 2363.

Table 3. Determination of Nitrate in Different Types of Water Using Voltamperometry as a Reference Method

matrix	disposable procedure ^a (mg/L)	s	reference procedure ^a (mg/L)	s	P value (%)
Monachil River water (Monachil, Granada, Spain)	3.6	0.24	3.3	0.45	29.17
Genil River water (Granada, Spain)	3.1	0.25	2.8	0.24	31.62
spring water (Granada, Spain)	27.3	0.63	29	2.0	20.42
spring water (Granada, Spain)	4.1	0.33	4.37	0.02	21.10
spring water (Haza Grande, Granada, Spain)	54	2.24	54	4.1	90.65
spring water (Zujaira, Granada, Spain)	62	2.78	61	3.57	59.95
spring water (La Peza, Granada, Spain)	2.92	1.49	2.7	17.26	39.00
well water (Illora, Granada, Spain)	20.4	0.29	23	1.71	14.30
cistern water (Illora, Granada, Spain)	91.8	5.26	87.9	0.94	27.20
well water (Valderrubio, Granada, Spain)	201	33.5	200	12.1	96.09

^a Three replicate samples in both cases

contaminant species such as nitrate, whose level changes depending on circumstances, it was applied as an example to underground waters in the area of Granada, Spain, using the high and low mean values of those anions⁴⁷ and a maximum tolerable error of 5% in the determination of nitrate. The selectivity values obtained for the disposable sensor fulfill the selectivity requirements ($K_{\text{NO}_3^-/j^{\text{opt}}}$ req: -3.5 (Cl^-); -3.4 (SO_4^{2-}); -3.7 (HCO_3^-)) for a nitrate assay in waters from the selected area (447 mg/L Cl^- ; 2,109 mg/L SO_4^{2-} ; 583 mg/L HCO_3^- ; 5 mg/L NO_3^-).

To test the usefulness of the proposed disposable sensor, it was applied to waters of diverse provenance (spring, mineral, tap) from the area of Granada, Spain, and with different nitrate content. The test method was validated by comparison with a voltamperometric method based on a catalytic wave of U(VI),⁴⁸ and the results obtained by both methods were satisfactory (*P* value) as shown in Table 3.

CONCLUSION

An optical disposable sensor has been developed using a host-guest recognition system based on an artificial C_3 symmetry amide-based ionophore for nitrate. The multiple H-bonding interactions permit a fine-tuned setting between free energies of nitrate-ionophore interaction and hydration, implemented in a transparent membrane that works by coextraction offering an easy-to-measure analytical signal.

We succeeded in preparing a very simple disposable optical sensor, usually more complex than electrochemical sensors for a

weakly coordinating character anion like nitrate. The selectivity pattern found meets most of the selectivity requirements for nitrate analysis in natural waters considering that nitrate more than a natural constituent is a contaminant with very different possible levels.

The described disposable sensor makes it possible to monitor nitrate in situ for most practical situations. Examples include water quality control to maintain the nitrate level within legal regulations or petiole sap testing in plants for nitrate to determine fertilization needs, with advantages in reducing contamination, losses and changes related to sample collection, and cost reduction. It is environmentally friendly and has an estimated lifetime of at least one and a half months when protected from light in normal conditions.

Drawbacks are related to response time, which in the developed format is roughly 5 min due to diffusion within the polymeric membrane, but could be reduced by using porous supports. Precision could be improved with mass production techniques, which could also cut costs. The use of different mass production techniques and the development of small, hand-held, and battery-operated instruments that will make decentralized analyses possible are now under investigation.

ACKNOWLEDGMENT

We acknowledge financial support from the *Ministerio de Educacion y Cultura, Dirección General de Enseñanza Superior* (Spain) (Project BQU2002-00353).

Received for review January 20, 2005. Accepted May 11, 2005.

AC050117B

(47) Castillo, A. *Estudio hidroquímico del acuífero de la vega de Granada*, 1st ed.; University of Granada-IGME: Granada, 1986.

(48) Hemmi, H.; Hasebe, K.; Ohzeki, K.; Kambara, T. *Talanta* **1984**, *31*, 319.

Original Paper

Development of a One-Shot Optical Citrate Sensor Based on a Guanidinium Synthetic Receptor

Luis Fermín Capitán-Vallvey^{1,*}, Eduardo Arroyo-Guerrero¹,
María Dolores Fernández-Ramos¹, and Francisco Santoyo-González²

¹ Department of Analytical Chemistry, Faculty of Sciences, Campus Fuentenueva,
University of Granada, E-18071 Granada, Spain

² Department of Organic Chemistry, Faculty of Sciences, Campus Fuentenueva,
University of Granada, E-18071 Granada, Spain

Received January 7, 2005; accepted May 4, 2005; published online July 7, 2005
© Springer-Verlag 2005

Abstract. A new optical absorption-based one-shot sensor for the determination of citrate is described. The citrate-sensitive element is a plasticized polymeric membrane containing a synthetic guanidinium receptor and a pH-sensitive lipophilic dye. The rigid amide-based receptor with C₃ symmetry controls the anion selectivity pattern of the optical element. The optical selectivity coefficients obtained for citrate over a variety of common carboxylate anions meet the requirements for the determination of citrate in different types of samples. The one-shot sensor responds rapidly – in 40 s – and reversibly to citrate over a dynamic range of 0.779 to 25.0 mM with a sensor-to-sensor reproducibility of 5.7%, as $\log a_{\text{cit}}$, in the medium level of the range. The performance of the optical one-shot sensor has been tested in the analysis of citrate in soft drinks and pharmaceuticals, validating the results against a reference procedure. The proposed method is quick, inexpensive, selective and sensitive, and uses conventional instrumentation only.

Key words: Citrate determination; one-shot sensor; optical sensor; guanidinium receptor; soft drinks and pharmaceuticals analysis.

One-shot sensors can be considered as a kind of test method for obtaining chemical information rapidly, simply and at low cost. There are very different approaches to this type of device coming from different fields, but all share the need for rapid analytical systems that are independent of the usual analytical requirements. One-shot sensors are miniaturized self-contained analytical devices with reagents incorporated in a dry format that respond semiquantitatively (test strips, test sticks and test papers) or quantitatively to the analyte in a wide variety of situations, including clinical, environmental, medical point-of-care diagnosis and terrorism.

Citric acid (2-hydroxy-1,2,3-propanetricarboxylic acid) is a natural component of fruits such as citrus fruits and pineapple and is a multi-functional food additive in the production processes of different foods because of its antibacterial and acidifying effects, its synergistic action with antioxidants and its potential as an intensifier for juice flavours, soft drinks and syrups. Additionally, citric acid, along with other organic acids, is measured in beverage samples, especially wine, for many reasons including product consistency, fermentation monitoring, product authenticity and quality determination, process control and spoilage detection [1]. It is also commonly used in the pharmaceutical industry because

* Author for correspondence. E-mail: lcapitan@ugr.es

of its acidic and anticoagulant properties and to prevent kidney calculi.

The routine determination of citric acid is carried out by reverse phase liquid chromatography with UV or refractive index detection [2], by ionic chromatography [3], capillary electrophoresis [4] or by flow injection techniques [5].

Another very common method for determining citric acid in bioanalysis and food analysis is the use of enzymatic assays [6]. One of the most used assays is based on citrate lyase which catalyses the transformation of citrate to oxaloacetate and acetate, and spectrophotometric measurement of NADH. These enzymatic assays are marketed by different companies such as R-Biopharm and its subsidiary Enzytec and recognised by different international standardisation and regulation authorities (ISO, AOAC, OIV, IFU, IDF, EN, DIN). The assays have also been implemented in a 96-well microplate-based format [7]. Also, a non-enzymatic scheme has been used for citrate sensing, based on a fluorescent ternary tetracycline europium complex with citrate and fluorescence lifetime imaging [8].

Molecular recognition of anionic analytes by neutral electron deficient or positively charged hosts is an interesting area in supramolecular chemistry that has received considerable interest [9–11]. Carboxylic acid, and hence carboxylate, is a particularly common functional group in biological and synthetic organic molecules, and different approaches have been devised for their recognition based on different noncovalent interactions, mainly hydrogen bonding and electrostatic interactions. Charged hosts include ammonium salts and guanidinium salts, while the neutrals include ureas, thioureas, amidopyridines, amides and receptors incorporating metallic centres [12].

Guanidinium salts are particularly attractive for Y-shaped anions such as carboxylates due to their peculiar binding pattern which features two parallel hydrogen bonds in addition to the electrostatic attraction [11]. Anslyn and co-workers described a trisguanidinium receptor species for the recognition of citrate through complementary interactions in shape and charge [13]. This receptor has been used to produce two competition-type assays for citrate [14], fluorimetric and spectrophotometric assays, in beverages using 5-carboxyfluorescein as a fluorescent probe in one of them [15, 16] and xylenol orange and methylthymol blue in the other [17]. A further modification of the guanidinium receptor – the replacement of one aminoimidazolium bearing guanidium group by a teth-

ered Cu(II) complex of 1,10-phenanthroline – has been used to create a fluoroionophore for citrate [18].

To the best of our knowledge, there are no reports on one-shot sensors for citrate determination nor are they marketed. Our goal was to develop hydrophobic membranes incorporating guanidinium salts for selective citrate recognition in the one-shot format in aqueous samples. With this strategy, the addition of an organic solvent is not necessary as it is with homogeneous competition assays [15, 17, 18]. The following is a report on an optical one-shot sensor based on a disposable membrane that works by coextraction.

Experimental

Reagents

Stock solutions (1 M) were prepared in water from sodium salts of citrate, chloride, (Sigma-Aldrich Química S.A., Madrid, Spain), benzoate, (Merck, Darmstadt, Germany) and from potassium salts of tartrate, and phosphate (Sigma-Aldrich). The pH 4.0, 0.1 M buffer solution from sodium acetate and acetic acid was from Sigma (Sigma-Aldrich Química S.A., Madrid, Spain). 2-Methylthio-2-imidazoline hydroiodide, triethylamine, methylchloroformate, 1,3,5-triethylbenzene, paraformaldehyde, 30 wt% hydrogen bromide in acetic acid, sodium azide, and palladium on activated charcoal were purchased from Sigma (synthesis quality). High molecular weight poly(vinyl chloride) (PVC), tributylphosphate (TBP), tris(2-ethylhexyl)-phosphate (TEHP), dioctylphthalate (DOP), bis(2-ethylhexyl) sebacate (DOS), nitrophenyl octylphenyl ether (NPOE) and tetrahydrofuran (THF) were purchased from Sigma and used to prepare the citrate-sensitive films. Chromoionophore N,N-diethyl-5-(octadecanoylimino)-5H-benzo[a]phenoxazine-9-amine was synthesized, purified and identified by us according to [19]. The supports used to prepare the one-shot sensors were sheets of Mylar type polyester (Goodfellow, Cambridge, UK). All chemicals used were of analytical-reagent grade, except those for synthesis, and all aqueous solutions were prepared using reverse-osmosis type quality water produced by a Milli-RO 12 plus Milli-Q purification system (Millipore, Bedford, MA).

Receptor Synthesis

The synthesis of receptor 1,3,5-benzenetrimethanamine N,N',N''-tris(4,5-dihydro-1H-imidazol-2-yl) 2,4,6-triethyl trihydrochloride was made using an alternative procedure to that of Anslyn [13] based on the procedure described by Mundla et al. [20] (Fig. 1). The two-step synthesis has an overall yield of 67.1%. Characterization of the intermediate and the synthesized receptor was performed by ¹H-NMR, ¹³C-NMR, IR, and HRMS (FAB+).

Synthesis of 4,5-dihydro-2-(methylthio)-1H-imidazole-1-carboxylic acid methyl ester (**2**): to a suspension of 2-methylthio-2-imidazoline hydroiodide (**1**) (4.55 g, 18.4 mmol) in 1,2-dichloroethane (15 mL), 5.4 mL triethylamine was added. The reaction mixture was cooled in an ice bath and methyl chloroformate (2.36 g, 25 mmol) was added drop-wise. Then the reaction mixture was allowed to warm to room temperature and stirred for 6 h. Ethyl acetate (150 mL) was added and washed successively with 5% hydrochloric acid (75 mL), saturated aqueous NaHCO₃ (50 mL)

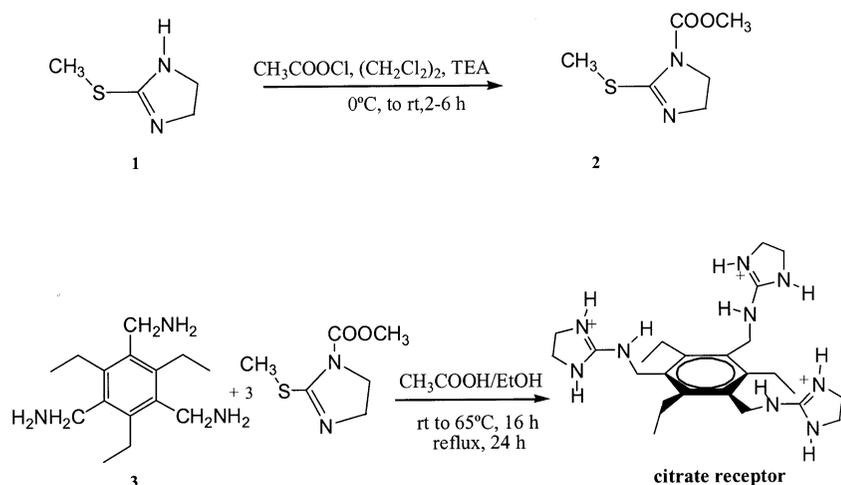


Fig. 1. Synthesis of citrate ionophore

and H₂O (50 mL). The organic layer was dried (Na₂SO₄), filtered and concentrated to produce a solid (3.33 g, 85%), m.p. 109 °C, IR (KBr): 1718, 1590, 1437, 1382, 1025, 759, 555 (cm⁻¹), ¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ: 3.94 (m, 4H, CH₂CH₂), 3.83 (s, 3H, COOMe), 2.46 (s, 3H, CH₃S), ¹³C-NMR (CDCl₃, 75 MHz) 159.5 (CO), 152.3 (C-2), 53.7, 47.3 (C-4,5), 53.0 (MeO), 15.0 (MeS).

Synthesis of 1,3,5-benzenetrimethanamine N,N',N''-tris(4,5-dihydro-1H-imidazol-2-yl) 2,4,6-triethyl trihydrochloride: A magnetically stirred solution of 1,3,5-tris(aminomethyl)-2,4,6-triethylbenzene (**3**) (0.2 g, 0.6 mmol) synthesized previously by us [21] and 4,5-dihydro-2-methylthio-1H-imidazole-1-carboxylic acid methyl ester (0.347 g, 2 mmol) in 10% AcOH/EtOH (6 mL) was left at 65 °C for 16 h and then for 24 h under reflux. The solvent was removed and the crude product was dissolved in H₂O (5 mL) and then lyophilized. The residue was dissolved in water and the acetate was converted into the chloride by anion exchange (Amberlite IRA-400) (20 g). Yield 78.6 %, M.p. 180 °C decomp. (lit [13] 162 °C). The ¹H- and ¹³C-NMR, and HRMS are identical to those reported [13].

Preparation of Disposable Membranes

The membranes were produced on a polyester substrate using a spin-coating technique. Mixtures for the preparation of citrate-sensitive membranes were made from a solution of 35.83 mg (24.7 wt%) PVC, 107.5 mg (74.0 wt%) TBP, 0.963 mg (0.66 wt%) receptor, 1.0 mg (0.69 wt%) N,N-diethyl-5-(octadecanoylimino)-5H-benzo[a]-phenoxazine-9-amine, dissolved in 1 mL of a mixture of freshly distilled THF and ethanol (80/20 v/v). The one-shot membranes were cast by placing 15 μL of the solution on a 14 mm × 40 mm × 0.5 mm thick polyester sheet using a homemade spin-coater [22] rotating at 180 rpm. After spinning for 10 seconds, the membrane was removed from the spin coater and dried in a dryer and in a saturated THF atmosphere for 60 min at room temperature. The sensing area of the one-shot sensor is a transparent and red 6 mm ø circular film with a calculated thickness of about 4.5 μm and a concentration of ionophore and chromoionophore in a dry thin film of 18.7 mmol · kg⁻¹.

Measurement Set-Up

The response of the prepared one-shot sensors was evaluated by adding 8 mL of the test solution to a polyethylene plastic tube

together with 2 mL of pH 4.0 0.1 M acetate buffer solution. The disposable sensor was then introduced for 40 s into the tube without shaking. After that, the membrane was taken out of the solution, wiped to remove the liquid, and the absorbance was measured at 660 nm using a Hewlett Packard diode array spectrophotometer (model 8453; Nortwalk, CT, USA) employing a 44 mm high and 12 mm wide homemade membrane cell holder made of a matte black painted iron block [23]. To correct for the background absorbance, the measurements were made against a Mylar polyester strip. All measurements were carried out at room temperature, and the membranes were not conditioned before use. The maximum and minimum absorbance values, corresponding to the fully protonated (A_{H⁺C}) and deprotonated (A_C) forms of the chromoionophore necessary for calculating α values were measured by conditioning the one-shot sensors in 10⁻² M HNO₃ and 2 · 10⁻² M sodium hydroxide, respectively. Activities were calculated according to the two-parameter Debye-Hückel formalism [24]. The coextraction constant was calculated according to [25], using values in the maximum slope zone of the experimental response functions for citrate, which provided more information and less error. The selectivity coefficients K_{cit,j}^{opt} were determined with separate solutions of the interfering ions (SSM) as the horizontal distance between single-ion response curves recorded separately for a given α = 0.5 [26]. Software programs used for the treatment of the data and fitting of experimental data to the theoretical response function were: Statgraphics software package (Manugistics Inc. and Statistical Graphics Corporation, USA, 1992), ver. 6.0 STSC Inc. Statistical Graphics Corporation, USA, 1993 and Graphmatica for Win 32 ver. 1:60d, 1998 edited by K. Hertzner and adapted by J. Garrido.

Procedure for Calibration Curve and Samples

8 mL of an aliquot of an aqueous standard solution containing between 4.17 · 10⁻⁴ and 1.77 · 10⁻² M in citrate activity was placed in a 10 × 1.5 cm polyethylene plastic tube along with 2 mL of pH 4.0 acetate buffer solution 0.1 M. Then, a one-shot sensor was introduced for 40 s in the tube without shaking, proceeding as in the *Measurement set-up* section.

For analysis of citrate in soft drinks, a volume of 100 mL of carbonated beverage was degassed under vacuum and magnetic stirring and previous dilution, if necessary, and the general procedure was applied. In the case of drugs, an adequate amount (typically between 0.02 and 7 g) was weighed, dissolved in water while stirring for 10 min, and then subjected to the procedure. In no case

was previous filtration of the sample necessary. With the reference procedure, filtration through a 0.45 μm Millipore filter is necessary prior to analysis.

Results and discussion

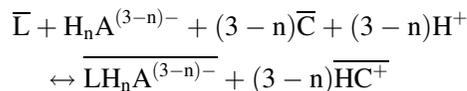
The receptor or ionophore for citrate used here is 1,3,5-benzenetrimethanamine N,N',N'' -tris(4,5-dihydro-1H-imidazol-2-yl) 2,4,6-triethyl trihydrochloride, a pre-organized host proposed by Anslyn's group and consisting of a 2,4,6-triethylbenzene core substituted in positions 1, 3 and 5 with guanidinium moieties embedded in an amidodihydroimidazolium group. The steric gearing imparted by the alternating ethyl groups on positions 2, 4, and 6 ensures that the guanidinium salts are pre-organized on the same face of the benzene ring. This conformation yields a complementary binding pocket with several hydrogen bonds and three sets of charge-pairing interactions in the host-guest complex with citrate [13, 15]. The cationic host is like chloride salt, i.e. very soluble in water, and has been used for citrate determination in beverages using a competitive assay format with coloured indicators [16, 17] and fluorescent indicators [15].

With the goal of developing a one-shot sensor for citrate in aqueous media, we studied different types of membranes using hydrophilic polymers, such as cellulose, polyurethane hydrogels and hydrophobic polymers such as PVC, PVA, ethyl cellulose, and Nafion, and different assay formats, such as coextraction-based and competitive assays using carboxylate-containing indicators, such as methylthymol blue, calcein blue, xylenol orange, 4,5-dibromofluorescein and 5-carboxyfluorescein. The use of hydrophobic membranes working by coextraction gave the best results, although the problem of the lack of solubility of the receptor in the usual solvent, tetrahydrofuran, forced us to use an 80:20% v/v THF/ethanol mixture as the solvent.

The sensing mechanism of this one-shot sensor relies on a co-extraction process of citric acid between a bulk membrane of plasticized PVC and an aqueous solution containing the analyte [26–29]. The selective binding of citrate by the guanidinium receptor L is accompanied by protonation of the chromoionophore C to maintain the electroneutrality of the membrane which generates the analytical signal. Since the selected chromoionophore, N,N -diethyl-5-(octadecanoylimino)-5H-benzo[a]phenoxazine-9-amine, is neutral in its basic form and the cationic receptor is like a chloride, it is not necessary to include any ionic

additives in the membrane formulation, as was observed experimentally.

Assuming that a 1:1 species citrate:receptor is formed and that the chromoionophore is monobasic, the following general co-extraction equilibrium applies:

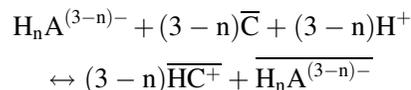


in which barred species are in membrane phase, while all other chemicals are in aqueous solution and $H_n A^{(3-n)-}$ ($0 \leq n \leq 3$) are the possible citrate species in solution depending on pH. The response characteristics description of the one-shot sensor can be accomplished through the protonation degree α , defined as $[C]/C_C$, measured by the absorbance of the protonated form of the chromoionophore, which is the optical measurable species in membrane phase, as a normalized absorbance [26, 27]. The α value is related to the coextraction constant K_{e1} , the analytical concentrations of receptor C_L and chromoionophore C_C and the activities of citrate and protons in the aqueous sample through the response function:

$$K_{e1} = \frac{(1-\alpha)^{4-n}}{\left(\frac{C_L}{C_C} - \frac{1}{(3-n)} \cdot (1-\alpha)\right) \cdot (3-n) \cdot \alpha^{3-n} \cdot a_{H^+}^{3-n} \cdot a_{H_n A^{(3-n)-}}} \quad (1)$$

By adjusting the pH with an appropriate buffer it is possible to determine the citrate activity in solution optically.

Additionally, in the absence of receptors in the membrane, extraction of citrate occurs due to coextraction by the chromoionophore itself, according to:



The process is characterized by the coextraction constant K_{e2} according to:

$$K_{e2} = \frac{(3-n) \cdot (1-\alpha)}{\alpha^{3-n} \cdot C_C^{2-n} \cdot a_{H^+}^{3-n} \cdot a_{H_n A^{(3-n)-}}} \quad (2)$$

The membrane plasticizer exhibits a strong influence on the response of the membrane to citrate, in addition to the reaction rate and reversibility of the process in the order: phosphate esters > carboxylic esters > ethers;

namely TBP \gg TEHP $>$ NPOE $>$ DOP \gg DOS. With DOS, the membrane is not reversible and reacts very slowly with the others, except for TBP, which produces a fast and reversible response. TBP was selected for all subsequent experiments.

The response of the optical sensor based on coextraction depends on the proton activity [26]. An increase in proton activity displaces the response to lower citrate activity but also increases the coextraction of citrate in membranes without ionophore, which affects the selectivity.

The citrate species extracted to the sensing membrane containing the receptor in the studied pH interval (3.5–5.0) seems to be the doubly charged (HA^{2-}) judging by the agreement between the experimental data and the theoretical curve (Fig. 2B) and the acidity constants of citric acid (3.13; 4.76; 6.40 as pK_a). In the case of sensing membranes without a receptor, the extracted species seems to be monohydrogencitrate, too (Fig. 2A).

At pH values higher than 5, the response of the membranes to citrate diminishes strongly due to the smaller

proton concentration. A pH of 4.0 was selected as a compromise yielding maximum citrate recognition with the receptor and minimum extraction of citrate as ionic pair with a protonated chromoionophore.

Previous experiments showed that the selectivity for membranes that do not contain a citrate receptor follows the Hofmeister series according to: $\text{ClO}_4^- > \text{NO}_3^- > \text{Cl}^- > \text{PO}_4^{3-} > \text{SO}_4^{2-} > \text{citrate} > \text{benzoate} > \text{tartrate} > \text{CH}_3\text{COO}^-$. In the presence of a receptor, the displacement of the reaction is higher at pH 4.0, an idea supported by the increase in absorbance due to the protonated form of the chromoionophore, and furthermore, the selectivity sequence changes to: $\text{ClO}_4^- > \text{NO}_3^- > \text{citrate} > \text{benzoate} > \text{tartrate} > \text{Cl}^- > \text{PO}_4^{3-} > \text{CH}_3\text{COO}^- > \text{SO}_4^{2-}$, considerably increasing the selectivity towards citrate due to the selective interaction between the guanidinium receptor and citrate, which is consistent with data reported previously [13, 15]. Different buffers were tested as working buffer, including phosphate, chloroacetate, formiate, propionate, and acetate. 0.1 M acetate was selected as the buffer due to its good results and less interference compared to the others. A similar interference of phosphate buffer was found by Metzger et al. working at pH 7.4 with the same receptor in aqueous solution [13].

The percentage of plasticizer in the membrane was studied between 50 and 70% because with amounts higher than 70%, the physical properties were worse since the membrane is less homogeneous and the drying time increases. The response time of the one-shot sensor was measured with different membranes for an intermediate citrate concentration of 10^{-4} M. It was observed that the absorbance decreases rapidly due to recognition, but that the membrane then becomes slightly opaque due to the uptake of water, irrespective of the plasticizer content, causing an apparent increase of absorbance (Fig. 3). We selected 40 s as an adequate reaction time for different citrate concentrations to achieve maximum reaction while keeping the membrane transparent. Although the membrane responds in a reversible way, the response level decreases with successive measurements, and the membranes are thus only used once.

Additionally, it was shown that the percentage of plasticizer influences the selectivity, as seen in Fig. 4, which is why we decided to employ 60% TBP in the membrane.

The influence of ionophore on the membrane was tested based the ionophore/chromoionophore (C_L/C_C)

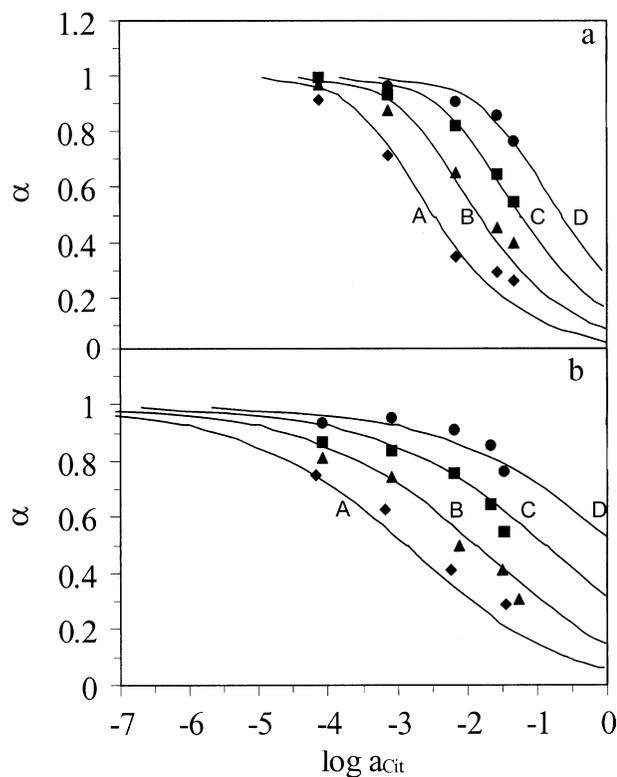


Fig. 2. Effect of pH on one-shot sensor response at pH = 3.5 (A); pH = 4.0 (B); pH = 4.5 (C); pH = 5.0 (D); (a) without ionophore; (b) with ionophore

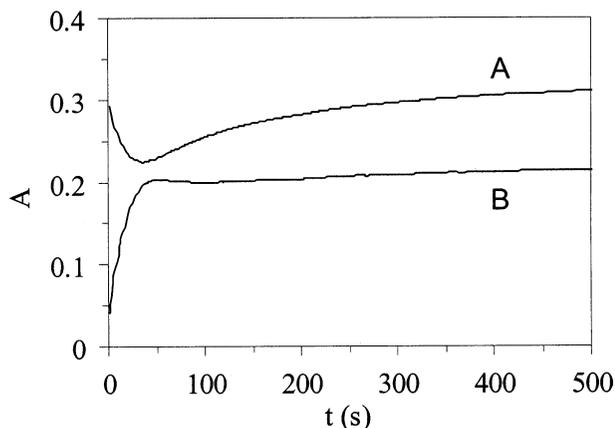


Fig. 3. Evolution of one-shot sensor signal with time. (A) Deprotonated form of chromoionophore (545 nm); (B) Protonated form of chromoionophore (660 nm)

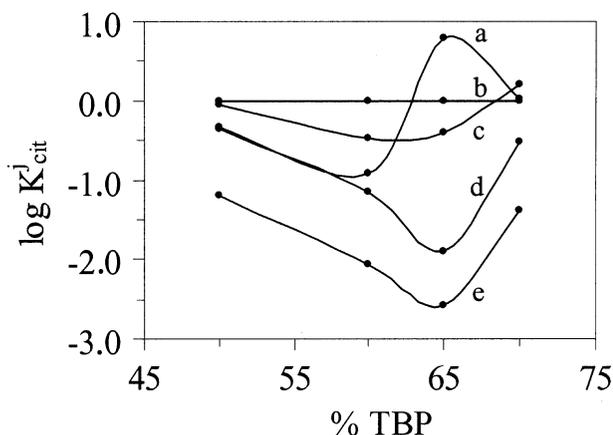


Fig. 4. Variation of selectivity coefficient (SSM method) with plasticizer percentage. (a) tartrate; (b) citrate; (c) benzoate; (d) chloride; (e) phosphate

ratio, maintaining an adequate quantity of the chromoionophore to minimize photometric error in the absorbance measurement. An increase in the C_L/C_C ratio causes a slight modification of the selectivity coefficient, so a membrane with a 1:1 ratio was selected because the lower slope of the response function shows a more extensive dynamic range to citrate.

The response of the one-shot sensor to citrate activities between 0.166 M and $8.39 \cdot 10^{-7}\text{ M}$ in activities (0.5 M and 10^{-6} M in concentrations) at pH 4.0 is shown in Fig. 5 along with the theoretical response function using Eq. (1) for the stoichiometric ratio of ionophore/citrate $p = 1$ and supposing that the twice-charged species of citrate is extracted. The fit by least-squares of the experimental points, in the linear maximum slope zone (8 different concentration levels and 9 replicates

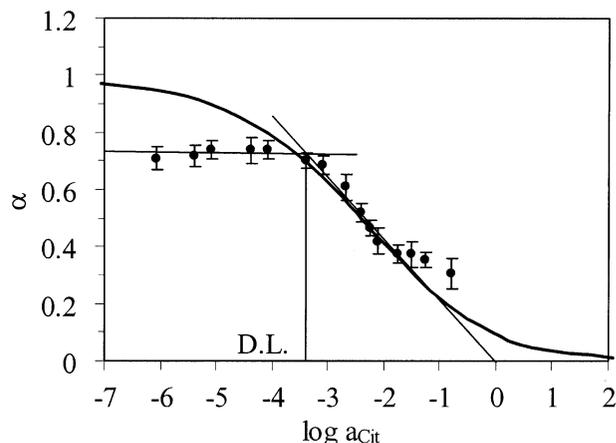


Fig. 5. Response curve. The solid line is the theoretical curve

of each one) of the response curve for citrate to the theoretical model indicated by Eq. (1), allows us to calculate the value of 9.96 ± 0.08 for $\log K_{e1}$.

The complex observed in this case between the guanidinium receptor and citrate as monohydrogencitrate differs from that studied by Anslyn's group, since they were working with water at neutral pH and consequently with totally deprotonated citrate. In that case the recognition reaction occurs in a low dielectric constant medium (plasticizer tributyl phosphate; $\epsilon \sim 8$ [30]) and with the citrate species extracted from a pH 4.0 aqueous solution (existing species H_2A^- and HA^{2-}). We assume that the HA^{2-} species is coextracted with a proton to membrane and the recognition occurs not only by charge pairing but by extensive hydrogen bonding with the preorganized host [13], but that a 1:1 complex (citrate:receptor) occurs in membrane [31].

It was observed in the response function that at low citrate concentrations the response moves away from that theoretically expected because of non-selective binding with acetate which is present in great excess due to the buffer. At citrate activities higher than $3 \cdot 10^{-2}$, a leaching of components from the membrane is observed which leads to deviation of the model as shown in Fig. 5.

Analytical Characterization and Applications

The measuring range and the detection limit of a one-shot sensor based on bulk optode membranes that exhibit a sigmoidal shape response function have been defined in different ways [22, 26, 32, 33]. In this case the linear relationship in the centre of the sigmoidal response function defined by means of a lack-of-fit test is used as the measuring range and the intersec-

tion of the linear calibration function and a linear function adjusted in the minimal slope zone (background) as the detection limit.

To characterize the analytical function of this one-shot sensor, two series of standards are used, one in the maximum slope zone (7 standards, 9 replicates each), between $4.17 \cdot 10^{-4}$ and $1.77 \cdot 10^{-2}$ in activities ($5.0 \cdot 10^{-4}$ and $2.5 \cdot 10^{-2}$ M in concentration), and another in the minimum slope zone of lower activity (5 standards, 9 replicates each), between $8.39 \cdot 10^{-7}$ and $8.38 \cdot 10^{-5}$ in activities ($1 \cdot 10^{-6}$ and $1 \cdot 10^{-4}$ M in concentration). The linearity of both series was tested by applying the lack-of-fit test [34], and the linear functions obtained were $\alpha = -0.00379 - 0.2149 \log a_{\text{cit}}$ and $\alpha = 0.71572 - 0.00235 \log a_{\text{cit}}$, respectively. The detection limit obtained by the interception of both functions is 0.412 mM in activities (0.483 mM in concentration; 91.3 mg L⁻¹) (Fig. 5). As the upper limit of the measuring range, the higher concentration (which statistically fits the linear function) was used; this was 17.7 mM (25.0 mM in concentration). Thus, the measuring concentration range for citrate determination is between 0.779 and 25.0 mM.

The precision expressed as sensor-to-sensor repeatability with different one-shot sensors, expressed as relative standard deviation, was obtained at three activity levels: $8.3 \cdot 10^{-4}$, $4 \cdot 10^{-3}$ and $7.7 \cdot 10^{-3}$ M ($1 \cdot 10^{-3}$, $5 \cdot 10^{-3}$ and $1 \cdot 10^{-2}$ M in concentrations) and ten replicates of each one, and had values of 4.2, 5.7 and 8.6% for $\log a_{\text{citrate}}$. Table 1 shows these and other analytical parameters. The lifetime of the one-shot sensors, tested with a series of membranes checked once a day at a medium-range citrate concentration and protected from light and humidity, is

Table 1. Analytical figures of merit

Parameter	Value; S
Intercept	-0.0038; 0.0179
Slope	-0.2149; 0.0069
Probability level % (lack-of-fit test)	6.2
Linear range (mg L ⁻¹)	91.29–4725
Detection limit (mg L ⁻¹)	91.29
RSD (%) ^a sensor-to-sensor	
$1.0 \cdot 10^{-3}$ M	4.2
$5.0 \cdot 10^{-3}$ M	5.7
$1.0 \cdot 10^{-2}$ M	8.6
Response time (s)	40
Cost (€/strip) ^b	0.03
Lifetime (weeks)	3

^a RSD for $\log a_{\text{cit}}$; ^b considering only cost of materials.

Table 2. Determination of citrate in soft drinks and drugs using an enzymatic test as a reference method

Matrix	One-shot procedure	S	Reference procedure	S	Pval (%)
Orange drink	3.3 g L ⁻¹	0.455	3.59 g L ⁻¹	0.066	32.2
Eno <i>Sal de frutas</i>	0.51 g g ⁻¹	0.056	0.47 g g ⁻¹	0.005	27.6
Uralyt-Urato	0.74 g g ⁻¹	0.017	0.71 g g ⁻¹	0.017	14.1
Citrocil	0.52 g g ⁻¹	0.019	0.50 g g ⁻¹	0.033	42.0
Micalax	0.057 g g ⁻¹	0.005	0.051 g g ⁻¹	0.002	14.0

Three replicate samples in both cases.

3 weeks on average. Table 2 shows these and other analytical parameters.

To test the usefulness of the proposed one-shot sensor, it was applied to soft drinks and drugs. The method was validated by comparison with the enzymatic test marketed by Boehringer Mannheim used as a reference method. Table 2 shows that the results obtained for both methods are statistically similar.

Conclusion

An optical one-shot sensor for citrate is presented. It uses a host-guest recognition system based on artificial guanidinium and is implemented in a transparent membrane that works by coextraction, offering an easy-to-measure analytical signal.

The described one-shot sensor makes it possible to perform *in situ* monitoring of citrate in soft drinks and drugs, with the advantages of a reduction in contamination, losses, and changes related to sample collection, reduced costs, and short response times. It is environmentally friendly and has a lifetime estimated at three weeks when protected from light. The use of different mass production techniques and the development of small, hand-held and battery-operated instruments which could make de-centralized analyses possible are now under investigation.

Acknowledgements. We acknowledge the financial support from *Ministerio de Educacion y Cultura, Dirección General de Enseñanza Superior* (Spain) (Project No. BQU2002-00353).

References

- [1] Fung Y S, Lau K M (2003) *Electrophoresis* 24: 3224
- [2] Escobal A, Gonzalez J, Iriondo C, Laborra C (1996) *Food Chem* 58: 381
- [3] Shirakawa N, Saini C, de Borba B, Kiser R (2004) *LC-GC Europe* September: 19

- [4] Izco J M, Tormo M, Harris A, Tong P S, Jimenez-Flores R (2003) *J Dairy Sci* 86: 86
- [5] Moreno-Cid A, Yebra M C, Santos X (2004) *Talanta* 63: 509
- [6] Möllering H (1985) *Citrate*. Verlag Chemie, Weinheim/Academic Press, New York, p 328
- [7] Velterop J S, Vos F (2001) *Phytochem Anal* 12: 299
- [8] Lin Z, Wu M, Schäferling M, Wolfbeis O S (2004) *Angew Chem Int Ed* 43: 1735
- [9] Beer P D, Gale P A (2001) *Angew Chem Int Ed* 40: 486
- [10] Gale P A (2000) *Coord Chem Rev* 199: 181
- [11] Schmidtchen F P, Berger M (1997) *Chem Rev* 97: 1909
- [12] Fitzmaurice R J, Kyne G M, Douheret D, Kilburn J D (2002) *J Chem Soc Perkin Trans 1* 841
- [13] Metzger A, Lynch V M, Anslyn E V (1997) *Angew Chem Int Ed* 36: 862
- [14] Snowden T S, Anslyn E V (1999) *Curr Op Chem Biol* 3: 740
- [15] Metzger A, Anslyn E V (1998) *Angew Chem Int Ed* 37: 649
- [16] Anslyn E V, Metzger A (2001) Receptor and method for citrate determination. Patent no. US 6,048,732
- [17] McCleskey S C, Metzger A, Simmons C S, Anslyn E V (2002) *Tetrahedron* 58: 621
- [18] Cabell L A, Best M D, Lavigne J J, Schneider S E, Perreault D M, Monahan M-K, Anslyn E V (2001) *J Chem Soc Perkin Trans 2* 315
- [19] Morf W E, Seiler K, Rusterholz B, Simon W (1990) *Anal Chem* 62: 738
- [20] Mundla S R, Wilson L J, Klopfenstein S R, Seibel L, Nikolaides N N (2000) *Tetrahedron Lett* 41: 6563
- [21] Arroyo E, Fernandez-Ramos M D, Capitán-Vallvey L F (2003) A coextraction-based optical test strip for the determination of nitrate in waters. Proceedings of the Colloquium Spectroscopicum Internationale XXXIII. Granada (Spain), September 7–12
- [22] Seiler K, Simon W (1992) *Anal Chim Acta* 266: 73
- [23] Capitán-Vallvey L F, Fernández-Ramos M D, Alvarez de Cienfuegos P, Santoyo-Gonzalez F (2003) *Anal Chim Acta* 481: 139
- [24] Meier P C (1982) *Anal Chim Acta* 136: 363
- [25] Capitán-Vallvey L F, Fernández-Ramos M D, Alvarez de Cienfuegos P (2002) *Anal Chim Acta* 451: 231
- [26] Bakker E, Bühlmann P, Pretsch E (1997) *Chem Rev* 97: 3083
- [27] Bühlmann P, Pretsch E, Bakker E (1998) *Chem Rev* 98: 1953
- [28] He H, Li H, Uray G, Wolfbeis O S (1992) *Talanta* 40: 453
- [29] He H, Uray G, Wolfbeis O S (1992) *Fresenius J Anal Chem* 343: 313
- [30] Negishi T, Nakatani K (2003) *Phys Chem Chem Phys* 5: 594
- [31] Bisson A P, Lynch V M, Monahan M K, Anslyn E V (1997) *Angew Chem Int Ed* 36: 2340
- [32] Bakker E, Willer M, Pretsch E (1993) *Anal Chim Acta* 282: 265
- [33] Lerchi M, Bakker E, Rusterholz B, Simon W (1992) *Anal Chem* 64: 1534
- [34] Analytical Methods Committee (1994) *Analyst* 119: 2363

Logit linearization of analytical response curves in optical disposable sensors based on coextraction for monovalent anions

L.F. Capitán-Vallvey*, E. Arroyo-Guerrero,
M.D. Fernández-Ramos, L. Cuadros-Rodríguez

*Department of Analytical Chemistry, Faculty of Sciences, Campus Fuentenueva,
University of Granada, Granada 18071, Spain*

Received 28 September 2005; received in revised form 11 December 2005; accepted 29 December 2005

Available online 3 February 2006

Abstract

The application of a decimal logistic transformation to the sigmoidal calibration curve of ion-selective bulk optodes for the determination of anions based on hydrophobic membranes containing neutral ionophore and chromoionophore is formally established and, consequently, a wide linear calibration function is obtained. The problems derived from the use of a sigmoidal curve in the calibration are therefore solved and the linear dynamic range is increased.

The general equation resulting from the logistic transformation is discussed considering the stoichiometric factors for monovalent anions, and the linearization of the theoretical fit to experimental data was checked for two real cases. The strategy was applied to the determination of chloride and nitrate using disposable sensors for different types of waters (tap, well, stream, rain, snow and sea), validating the results against a reference procedure. This new linear calibration proposed for anion determination increases the linear dynamic range up to six orders of magnitude. The main advantage is that it is possible to directly quantify samples with very different analyte contents in a fast and simple way. The methods are easy to use and eliminate the need for prior treatment of the sample.

© 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Linearization; Anion determination; Disposable optical sensor; Ionophore–chromoionophore chemistry; Water analysis

1. Introduction

Bulk ion-selective optodes are conceptually and compositionally similar to carrier-based ion selective electrodes but mechanistically different. With optodes based on a second component, also known as bulk optodes [1], the analyte recognition event accomplished by means of ionophores is shown by a separate compound also placed in membrane and called a chromoionophore, through a coupled reaction into an optical transduction. A plasticized polymeric membrane contains all the necessary compounds for extraction and recognition of the analyte and for the transduction of the recognition event into an optical signal.

In the case of the second component membranes for anions, optical sensing is based on the coextraction of the anionic analyte

due to the ionophore present in the membrane next to a reference cation, usually a hydrogen ion, which is recognized by an acid–base indicator also in the lipophilic membrane. Since these membranes respond to the product of the activities of the anion and the coextracted cation (hydrogen ion), the measurement or fixation of pH makes it possible to determine analyte activity or concentration working at a constant ionic strength. Different chemical sensors for relevant anions have been designed and characterized, such as for chloride [2–5], nitrate [6–8], nitrite [9,10], thiocyanate [11], sulphite [12] and carbonate [13].

This sensing element can be implemented in different ways, i.e. fibre-optic probes [2], flow sensors [11], test strips and disposable sensors [14,8], or microsphere-based optical sensors [4], which serve as examples for various practical realizations. However, the technical aspects are different and the working principles are also unique with respect to the versatility of the sensors, which can be constructed.

The characteristic response function of such sensors – analytical parameter versus logarithm of analyte activity – have a

* Corresponding author. Tel.: +34 958248436; fax: +34 958243328.

E-mail address: lcapitan@ugr.es (L.F. Capitán-Vallvey).

sigmoidal shape [15]. This means a problem for calibration purposes, since only the central zone of the sigmoid, which can be assimilated to a straight line, is used as the calibration function, and a part of the analytical information that the whole sigmoidal dependence takes is lost.

The transformation of the non-linear relationship into a linear one was made using a logistic regression, a type of generalized linear model, making it possible to predict a discrete outcome from a set of variables that may be continuous, discrete, dichotomous, or a combination of any of these.

In the logit regression model, the predicted values for the response variable will never be ≤ 0 or ≥ 1 , regardless of the values of the independent variables. This is accomplished by applying the regression Eq. (1) which always produce predicted values in the range of 0–1

$$y = \frac{\exp(b_0 + b_1x_1 + \dots + b_nx_n)}{1 + \exp(b_0 + b_1x_1 + \dots + b_nx_n)} \quad (1)$$

If we consider a dependent variable y ranging from 0 to 1 (for example, a probability), we can transform (logit or logistic transformation) that variable y as:

$$y' = \ln\left(\frac{y}{1-y}\right) \quad (2)$$

This transformed variable y' can theoretically assume any value between minus and plus infinity. Since the logit transform solves the issue of the 0/1 boundaries for the original dependent variable, we can use those the logit transformed values in an ordinary linear regression equation. Namely, if we perform the logit transformation on both sides of the logit regression equation, we obtain the standard linear multiple regression model from Eq. (3):

$$y' = (b_0 + b_1x_1 + \dots + b_nx_n) \quad (3)$$

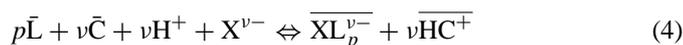
This type of transformation has been used in analytical chemistry for very different purposes, such as to linearize the sigmoidal shape response in immunoassay, both radioimmunoassay [16] and ELISA [17]. It has also been used for the evaluation of test kits [18] and dipstick tests [19] of dichotomous response. Additionally, logistic transformation has been applied to other analytical situations such as to model capacity factors as a function of the pH in HPLC optimization [20] and to model mobility as a function of pH in capillary zone electrophoresis [21].

The use of logistic linearization can improve the use of optodes in different ways: (1) by notably increasing the dynamic range, and (2) by making direct quantification of samples possible without the need for dilution or preconcentration, if possible. In this paper, this new methodology was applied to anion optical sensors, namely to optical disposable sensors previously developed by us for the determination of chloride [5] and nitrate [8] in different types of water. To validate the methodology, different real water samples coming from different provenances and with analyte concentration levels in the extreme zones of new calibration functions were analysed comparing the results with an ion chromatography reference method.

2. Theory

2.1. General model

The working mechanism of coextraction membranes, as much probe, as flow or as in disposable format, relies on concentration changes inside the bulk of an hydrophobic separate phase and is theoretically well understood [15,22,23]. The anion recognition is due to ionophore present in the membrane and the optical transduction is usually implemented through the coupling of a chromoionophore carrying auxochromic groups such as a lipophilic acid–base indicator. The electroneutrality condition in the hydrophobic membrane implies the phase transfer equilibrium of two ions, analyte X^{v-} and reference ion M^{z+} , usually a proton, as an ionophore-mediated coextraction equilibrium that makes the optical response possible, according to Eq. (4) in which barred species are in membrane phase:



The charge of ionophore L or chromoionophore C present in the membrane determines in some instances the need for a large cationic R^+ or anionic R^- lipophilic salt to produce the required ion-exchange properties to the membrane [15,24].

The response characteristic description of the disposable sensor can be accomplished through the absorbance or luminescence changes of the protonated species of the proton-selective ionophore or chromoionophore, which is the optical measurable species in membrane phase, as a normalized parameter α [15,22]

$$\alpha = \frac{A - A_{HC}}{A_C - A_{HC}} \quad (5)$$

The α value, defined as the degree of deprotonation, is obtained by using the absorbance, or luminescence, of the fully protonated (A_{HC}) and deprotonated (A_C) chromoionophore and problem (A) according to Eq. (6) and is related to the overall coextraction constant K_{coext} , the analytical concentrations of ionophore C_L and chromoionophore C_C and the activities of analyte X^{v-} and H^+ in the aqueous phase through the intrinsically sigmoidal response function:

$$K_{coext}(a_{H^+})^v(a_{X^{v-}}) = \frac{(1-\alpha)^{1+v}}{\alpha^v \left[\left(\frac{C_L}{C_C} - (1-\alpha)\frac{p}{v} \right)^p vC_C^{p-1} \right]} \quad (6)$$

derived from a thermodynamic equilibrium reaction although involving some non-thermodynamic assumptions, such as constant activity coefficients within the membrane phase, among others [1].

These equations show the dependence between the activity of the analyte anion, $a_{X^{v-}}$, and the degree of deprotonation of chromoionophore, α , since all the other terms are constant for each analytical system. Using Eq. (6) in logarithmic form (Eq. (7)) and plotting α versus $\log a_{X^{v-}}$, a sigmoidal curve (Fig. 1) is obtained

$$\log a_{X^{v-}} = \log \frac{(1-\alpha)^{1+v}}{\alpha^v \left(\frac{C_L}{C_C} - (1-\alpha)\frac{p}{v} \right)^p vC_C^{p-1} \times 10^{-v\text{pH}} K_{coext}} \quad (7)$$

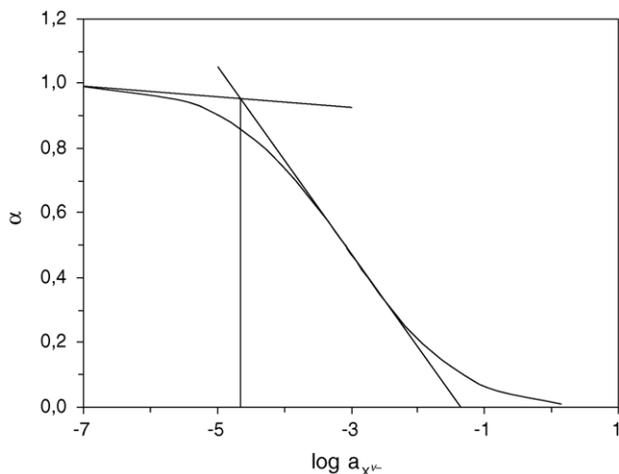


Fig. 1. Dynamic linear range in sigmoidal-type response using previous methodology.

For optode membranes, the middle portion of the sigmoidal curve is nearly linear and it is habitually used as a linear calibration curve for analytical purposes. The useful measuring range typically covers 2–4 orders of magnitude of the analyte concentration and depends, at a constant pH value, on the membrane composition, the charge of the analyte anion and the stoichiometry of the formed complex in the polymeric film; thus the working range increases for higher analyte charges and/or higher complex stoichiometries [15,1].

The linear interval is defined between a lower and upper limit [25]. The lower limit can be calculated using different approximations based on: (i) the loss of sensitivity due to the sigmoidal shape of the response function at low anion concentrations, and (ii) interference from other ions [15]. The first approximation, loss of sensitivity, has been defined through: (a) the standard deviation of background signal [26], (b) the variation of a given fraction of maximum slope of response function [27], and (c) the intersection point of two linear functions of maximum and minimum slope, this one in the zone of minimum concentration of the sigmoidal function [28] (Fig. 1). As the sensitivity decreases continuously with increasing analyte activity, the upper detection limit can be described in analogy with previous definitions (b) and (c). In the latter case, it is necessary to be able to define a linear function with minimum slope in the zone of high activity. If this is not possible, as is usual, due to some problem, such as lack of solubility of the corresponding salt, a practical upper detection limit is obtained from the intercept of the linear calibration function with the axis of abscise [29].

This way of defining the measuring range of optode membranes means a loss of potential analytical information, since the measuring range for the analyte is various orders shorter than the whole dynamic range. However, as seen in Fig. 1, the analytical response (α) is a logistic function having values in the range (0,1), for which reason it can be linearized by a logit transformation.

The aim of this paper is to study the use of the whole sigmoidal function to extract analytical information through its transformation into a linear function and thus obtain a wider application

range that makes it possible to measure samples containing any analyte concentration without needing to dilute or concentrate the sample beforehand.

To find a linear function of the type $Y=A+BX$ from the sigmoidal theoretical model, Eq. (7) is rewritten as:

$$\begin{aligned} \log \frac{(1-\alpha)^{1+\nu}}{\alpha^{\nu} \left(\frac{C_L}{C_C} - (1-\alpha) \frac{p}{\nu} \right)^p} \\ = \log(\nu C_C^{p-1} \times 10^{-\nu \text{pH}} K_{\text{coext}}) + \log a_{X^{v-}} \end{aligned} \quad (8)$$

and regrouped in the following form:

$$\begin{aligned} \log \left(\frac{1-\alpha}{\alpha} \right)^{1+\nu} + \log \left(\frac{\alpha}{\left(\frac{C_L}{C_C} - (1-\alpha) \frac{p}{\nu} \right)^p} \right) \\ = \log(\nu C_C^{p-1} \times 10^{-\nu \text{pH}} K_{\text{coext}}) + \log a_{X^{v-}} \end{aligned} \quad (9)$$

In the case of monovalent anions ($\nu=1$), the following Eq. (10) results in:

$$\begin{aligned} \log \left(\frac{1-\alpha}{\alpha} \right) + \frac{1}{2} \log \left[\frac{\alpha}{\left(\frac{C_L}{C_C} - (1-\alpha)p \right)^p} \right] \\ = \frac{1}{2} \log(C_C^{p-1} \times 10^{-\text{pH}} K_{\text{coext}}) + \frac{1}{2} \log a_{X^{v-}} \end{aligned} \quad (10)$$

This last equation can be rewritten in a simplified way as:

$$Y(\alpha) + D(\alpha) = A + BX \quad (11)$$

where $Y(\alpha)$ is the inverse of the decimal logit of α , X the decimal logarithm of the activity of the considered anion, A the independent term that remains constant for each analytical system, and B is the linear coefficient or slope:

$$Y(\alpha) = \log \left(\frac{1-\alpha}{\alpha} \right) \quad (12)$$

$$X = \log a_{X^{v-}} \quad (13)$$

$$\begin{aligned} A &= \frac{1}{2} \log(C_C^{p-1} \times 10^{-\text{pH}} K_{\text{coext}}) \\ &= \frac{p-1}{2} \log C_C + \frac{1}{2} (\log K_{\text{coext}} - \text{pH}) \end{aligned} \quad (14)$$

We apply a decimal logarithm instead of a neperian logarithm in order to maintain the usual formalism in the analytical equations that imply constants of equilibrium and concentrations. In addition, we use the inverse of the decimal logit in order to avoid a negative slope.

Eq. (11) is similar to a straight line equation ($Y(\alpha)$ versus X), except for the introduction of a disturbance term $D(\alpha)$, defined as:

$$D(\alpha) = \frac{1}{2} \log \left[\alpha \left(\frac{C_L}{C_C} - (1-\alpha)p \right)^{-p} \right] \quad (15)$$

When $Y(\alpha)$ is plotted versus X , if $D(\alpha)$ is zero or constant, a straight line with slope $B=0.5$ will be found, while if $D(\alpha)$ is a

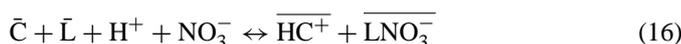
linear function of α , a straight line with a slope different than 0.5 will be yield. In any other case, a curve will be obtained for the $D(\alpha)$ function.

A similar logit transformation, named by Rodbard and Hutt [30] as a fully specified logit–log model, has been previously applied to describe an algebraically equivalent expression for the logistic function which is effectively linearized through the equation: $\text{logit } Z = a + b \log(\text{concentration})$, this being the fully specified logit of Z equal to: $\text{logit } Z = \log[(Z - Z_{\min})/(Z_{\max} - Z)]$.

To verify the validity of this proposition, we selected two disposable sensors for anions previously developed by us, namely for chloride [5] and nitrate [8]. The general equation was adjusted for each particular case and checked experimentally.

2.2. Model for nitrate disposable sensor

In this case, the following coextraction equilibrium holds:



in which the acidic form of chromoionophore is positively charged. As $C_L/C_C = 1$ [8], Eq. (10) could be written in the form:

$$\log\left(\frac{1-\alpha}{\alpha}\right) + \frac{1}{2} \log\left[\frac{\alpha}{(1-p(1-\alpha))^p}\right] = A + \frac{1}{2} \log a_{X^-} \quad (17)$$

In order to know how $D(\alpha)$ varies with X and when $Y(\alpha)$ is a linear function of X , a plot of $D(\alpha)$ versus X for different values of stoichiometric factor p are obtained. Fig. 2 shows that only when p is 1, the disturbance factor $D(\alpha)$ is 0. $D(\alpha)$ depends also on the analyte activity, but for $\log a_{NO_3^-}$ lower than -4 , $D(\alpha)$ is nearly zero, while when the anion concentration increases, the $D(\alpha)$ term moves away from zero value dramatically. Therefore, $Y(\alpha)$ is a linear function of $\log a_{NO_3^-}$ for coextraction systems with $p = 1$, or when $\log a_{NO_3^-}$ is less than -4 for any value of p .

2.3. Model for chloride disposable sensor

In contact with an aqueous solution containing chloride, the following coextraction equilibrium holds in the disposable mem-

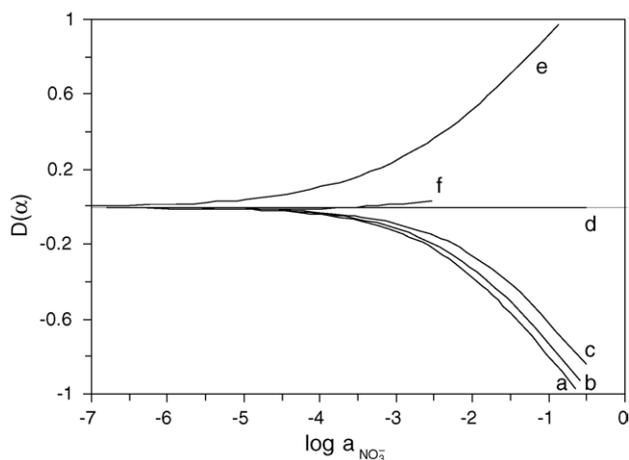


Fig. 2. Influence of stoichiometry on D term for nitrate disposable sensor. (a) $p = 0.33$; (b) $p = 0.5$; (c) $p = 0.66$; (d) $p = 1$; (e) $p = 1.5$; (f) $p = 2$.

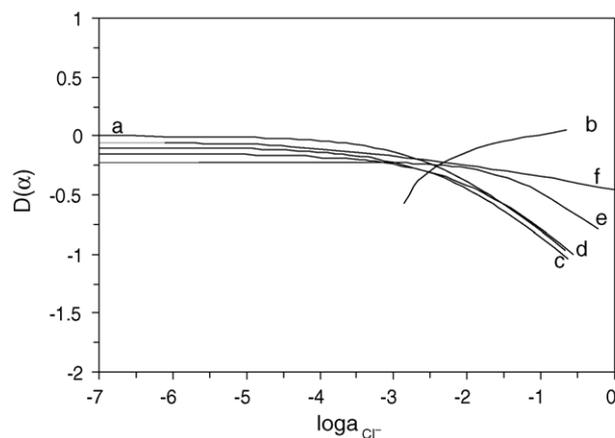
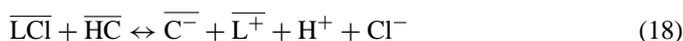


Fig. 3. Influence of stoichiometry on D term for chloride disposable sensor. (a) $p = 0.33$; (b) $p = 0.5$; (c) $p = 0.66$; (d) $p = 1$; (e) $p = 1.5$; (f) $p = 2$.

brane:



Since in this case the chromoionophore, that show a neutral acidic form, cannot be fully deprotonated ($\alpha \cong 0.9$) at the working pH (2.0), it is practically difficult to determine the absorbance for $\alpha = 1$, the problem being solved using an effective α value, α_{eff} , in which A_C is measured in buffer as indicated in Section 3. Additionally, for this analytical system, $C_L/C_C = 2$ [5], so the usable equation can be:

$$\log\left(\frac{1-\alpha_{\text{eff}}}{\alpha_{\text{eff}}}\right) + \frac{1}{2} \log\left[\frac{\alpha_{\text{eff}}}{(2-p(1-\alpha_{\text{eff}}))^p}\right] = A + \frac{1}{2} \log a_{X^-} \quad (19)$$

As in the previous case, the corresponding plots of $D(\alpha)$ and $Y(\alpha)$ versus X from several values of p are obtained, showing (Fig. 3) that the $D(\alpha)$ term varies with analyte activity independently of the value of stoichiometric factor, in such a way that for $\log a_{Cl^-}$ values lower than -3 , the $D(\alpha)$ term is constant and near zero; in these conditions $Y(\alpha)$ always varies linearly with $\log a_{Cl^-}$. For $\log a_{Cl^-}$ values higher to -3 , the $D(\alpha)$ term leave to be constant and the curve deviates from linearity. Nonetheless, $D(\alpha)$ varies only between 0 and -1 , while $Y(\alpha)$ can accept values from $+2$ to -2 , which means that the deviations of linearity introduced, in this case, are not excessively large and the linear model can be applied in a rough form.

2.4. Estimation of the overall coextraction constant

The overall equilibrium constant of bulk optode membranes is usually calculated by fitting the experimental data to the theoretical model by simple fit [25], using a least squares approximation to the central points of the sigmoid [29] or by iterative calculation [31]. With the data transformation proposed here, it is possible to calculate the overall coextraction constant K_{coext} from the intercept of linearized Eq. (11). It is only necessary to know the pH value and the analytical concentrations of the components in the membrane.

3. Experimental

3.1. Reagents

The chemicals used were of analytical-reagent grade and all aqueous solutions were prepared using reverse-osmosis type quality water produced by a Milli-RO 12 plus Milli-Q purification system (Millipore, Bedford, MA).

Chloride and nitrate stock solutions (1000 M) were prepared in water by weighing dry potassium chloride (Sigma–Aldrich Química S.A., Madrid, Spain) and dry potassium nitrate (Merck, Darmstadt, Germany), respectively. Solutions of lower concentration were prepared by dilution with water. Buffers: 0.02 M pH 6.0 from sodium dihydrogen phosphate and sodium monohydrogen phosphate and 0.1 M pH 2.0 from orthophosphoric acid/sodium dihydrogen phosphate (all from Sigma–Aldrich).

For preparing the optode films, poly(vinyl chloride) (PVC; high molecular weight), tributylphosphate (TBP), bis-(2-ethylhexyl)-sebacate (DOS), and tetrahydrofuran (THF) were purchased from Sigma (Sigma–Aldrich) and trioctyltin chloride (TOT) were purchased from Fluka (Fluka, Madrid, Spain). The chromoionophores and ionophore were synthesized, purified and identified by us according to references: dibromofluorescein octadecyl ester (BFE) [3]; (1,2-benzo-7-(diethylamino)-3-(octadecanoylimino)-phenoxazine [32] and 2,16,18,32,45,47-hexaethyl-5,13,21,29,34,42,44,46,48-nonaaza heptacyclo [15.15.11.1^{3,31}.1^{7,11}.1^{15,19}.1^{23,27}.1^{36,40}]-octatetraconta-1,3(45),7(48),8,10,15(47),16,18,23(46),26,31,36,37,39-pentadecaene-6,12,22,28,35,41-hexone (HNOPH) [33,8]. Sheets of polyester type Mylar (Goodfellow, Cambridge, UK) were used as support.

3.2. Preparation of disposable membranes and measurement set-up

The membranes were produced on a polyester substrate using a spin-coating technique [34]. Mixtures for the preparation of chloride-sensitive membranes were made from a batch of 40.0 mg (32.7 wt.%) of PVC, 80.0 mg (65.4 wt.%) of DOS, 1.33 mg (1.08 wt.%) of TOT and 1.0 mg (0.82 wt.%) of BFE and for nitrate-sensitive membranes were made from a batch

of 29.20 mg (32.2 wt.%) of PVC, 58.80 mg (65.0 wt.%) of TBP, 1.50 mg (1.7 wt.%) of HNOPH and 1.00 mg (1.1 wt.%) of *N,N*-diethyl-5-(octadecanoylimino)-5H-benzo[*a*]phenoxazine-9-amine, in both cases dissolved in 1 mL of freshly distilled THF. The disposable sensors were cast by placing 15 and 20 μ L, for chloride and nitrate membranes, respectively, on a 14 mm \times 4 cm \times 0.5 mm thick polyester sheet by means of a laboratory-made spin-on device and stored in a vacuum dryer at room temperature to enable slow solvent evaporation.

The response of the disposable sensors for nitrate was evaluated by adding 8 mL of test solution to a polyethylene plastic tube together with 2 mL of pH 6.0 buffer solution. The disposable sensor was then introduced for 5 min into the tube without shaking. In the case of chloride, 8 mL of test solution was added to a plastic tube with 2 mL of pH 2.0 buffer solution. In this case, the disposable sensor was then introduced for 6 min into the tube without shaking. After reaching equilibrium, the absorbance of the membranes was measured at 660 and 534 nm for nitrate and chloride, respectively, in a Hewlett Packard diode array spectrophotometer (model 8453; Nortwalk, CT, US) provided with a 44 mm high, 12 mm wide homemade membrane cell holder made of a matte black painted iron block [35]. The absorbance values, corresponding to the fully protonated (A_{HC^+}) and deprotonated (A_{C}) forms of the chromoionophore necessary for calculation of α values, were measured by conditioning the disposable sensors in 10^{-2} M HNO_3 and 2×10^{-2} M NaOH , respectively, for nitrate membranes and in 10^{-2} M HCl and 10^{-2} M buffer, respectively, for chloride membranes. Activities were calculated according to the two-parameter Debye–Hückel formalism [36]. To correct for the background absorbance, the measurements were made against a Mylar polyester strip. All measurements were carried out at room temperature. The membranes were not conditioned before use.

4. Results and discussion

4.1. Verification of the theoretical model: establishment of linear calibration curves

To verify the reliability of the theoretical models (Eqs. (17) and (19)), two sets of 15 standard solutions of nitrate and

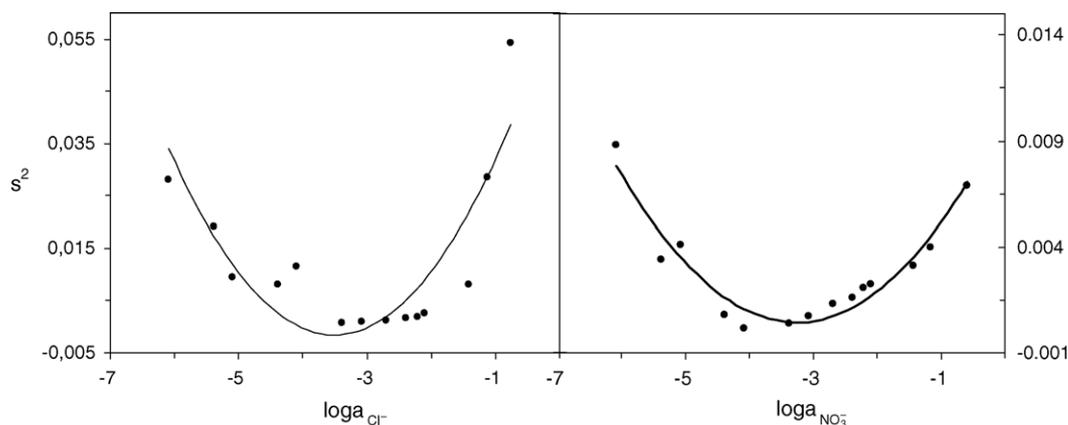


Fig. 4. Decimal logit of α variance curves as a function of decimal logarithm of chloride (A) and nitrate (B) activities.

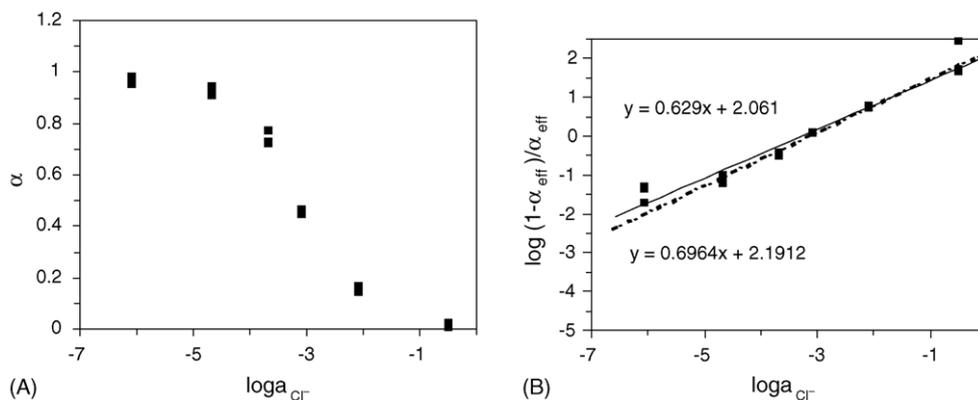


Fig. 5. Comparison between the calibration curves for chloride. (A) Traditional calibration plot (prior to linearization); (B) proposed calibration plot (logit linearization). Filled line: (OLS) regression; Dotted line: (WLS) regression.

chloride ions were independently prepared containing between 8.37×10^{-4} and 2.59×10^2 mM in activities (1×10^{-3} and 5×10^2 mM in concentrations) of nitrate and 8.59×10^{-4} and 3.25×10^2 mM in activities (1×10^{-3} and 5×10^2 mM in concentrations) of chloride, respectively. We analysed nine replicates of each standard solution with a new disposable sensor each time, according to the procedure indicated above in Section 3 and the corresponding α values (Eq. (5)) were obtained.

In addition, the precision of the $\text{logit}(\alpha)$ parameter was studied in the entire application range observing that variance increases towards the extremes of the analytical range. Fig. 4 shows the obtained variance curves, which follow a parabolic profile for both cases studied. The experimental values are fitted by a ordinary curvilinear (parabolic) regression.

Next, experimental data were fitted to the theoretical linear model by using two types of regressions: (i) a linear ordinary least squares (OLS) regression, and (ii) a linear weighted least squares (WLS) regression. For this last regression, the inverse of the corresponding variances were used as weights. These variances were obtained from the predicted values for the fitted variance curves noted in the preceding paragraph.

In addition, a theoretical calibration function was obtained from Eqs. (17) and (19) for nitrate and chlorides, respectively, using the same activity data tested experimentally. From those

Table 1

Comparison between theoretical, experimental OLS-fitted and experimental WLS-fitted calibrations for nitrate and chloride disposable sensors

	Chloride	Nitrate
Theoretical calibration		
Intercept	1.939	1.530
Slope	0.613	0.500
Correlation coefficient	0.990	1.000
OLS-fitted calibration		
Intercept	1.946	1.648
Slope	0.650	0.552
Correlation coefficient	0.980	0.995
WLS-fitted calibration		
Intercept	1.939	1.723
Slope	0.683	0.563
Correlation coefficient	0.978	0.994

data the theoretical y -values were calculated and fitted by means of an OLS calibration. Figs. 5 and 6 show the calibration plots with traditional and proposed methodology for Cl^- and NO_3^- , respectively, and Table 1 shows the results obtained comparing the calibration features between the theoretical model and the fitted experimental data for each disposable sensor.

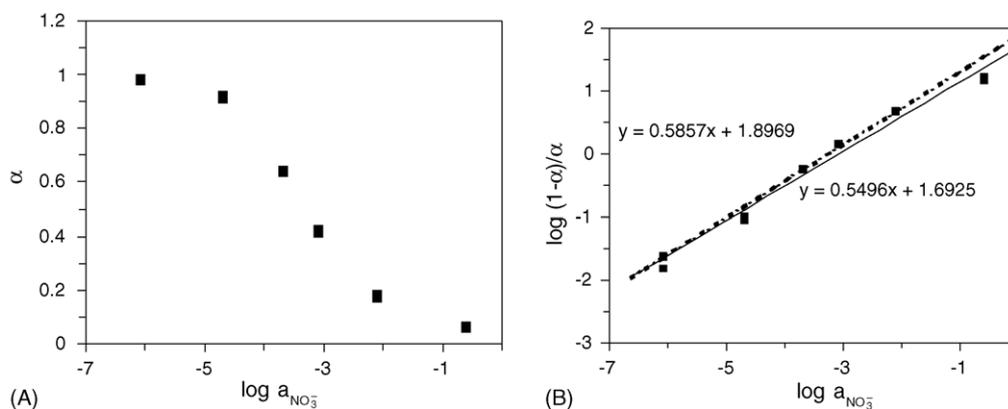


Fig. 6. Comparison between the calibration curves for nitrate. (A) Traditional calibration plot (prior to linearization); (B) proposed calibration plot (logit linearization). Filled line: (OLS) regression; Dotted line: (WLS) regression.

Table 2

Comparison between the applicable analytical concentration intervals for disposable sensors when calibration is performed: (a) using the central portion of the α vs. $\log(\text{activity})$ curve (preceding methodology), and (b) the whole decimal $\log(\alpha)$ vs. $\log(\text{activity})$ curve (proposed methodology)

Disposable sensors	Preceding methodology	Proposed methodology
Nitrate (mg L^{-1})	1.6–620 ^a	0.06–31000
Chloride (mg L^{-1})	6.2–360 ^b	0.2–17800

^a From Ref. [8].

^b From Ref. [5].

As can be seen, there is no significant difference between the calibration curve features when ordinary and weighted least squares are applied with the theoretical calibration.

In addition, Table 2 defines the applicable analytical concentration interval for each disposable sensor procedure when the calibration is performed from both traditional and proposed methodologies. The dynamic linear range for nitrate using the previous methodology was from 1.6 to 620 mg L^{-1} (two orders of magnitude) and is now from 0.06 to 31,000 mg L^{-1} (six orders). In the case of chloride, the previous methodology used gave an analytical range from 6.2 to 360 mg L^{-1} (two orders), which changes to 0.2–17,800 mg L^{-1} (five orders) with this methodology. The considerable increase in the obtained linear dynamic range means a serious advantage for the proposed methodology.

One possible drawback of this methodology is the fact that the precision of the measurements decreases with the parabolic profile towards the edge of linear dynamic range, although these values are acceptable for disposable-type sensors.

The overall coextraction constants, as $\log K_{\text{coext}}$, calculated from the intercept of linearized Eqs. (17) and (19) were 9.3 for nitrate and 5.9 for chloride. The values were calculated using the least squares approximation to the central points of sigmoid [29] were 9.06 and 4.41, respectively). The difference between

the values found in the case of chloride can be attributed to the disturbance value that in this case was different from zero, producing a not strictly linear function.

4.2. Analytical applications

In order to assess the usefulness of the proposed linearization method for anion optical sensors, we applied it to two disposable sensors previously designed and characterized by us for the determination of chloride and nitrates. To do this, we selected samples of waters coming from diverse provenance (tap, well, stream, snow and sea) whose nitrate and chloride content were in the new zones of the linear dynamic range obtained by the proposed linearization method. Table 3 shows the results obtained using the disposable sensor procedures described here for chloride and nitrate compared to an ion chromatography method [37,38] used as a reference method. Table 3 also includes the mean values from three determinations of each sample and the standard deviation of these measurements.

In addition, and due to the wide interval of concentrations studied in the validation, the RMSRE (root mean squared relative error) was used as a standard feature to evaluate the capacity of prediction of the proposed calibration in relation to the reference concentrations. The RMSRE was calculated from the expression

$$\text{RMSRE} = \sqrt{\frac{1}{N} \sum \left(\frac{\text{conc}_{\text{estimated}} - \text{conc}_{\text{reference}}}{\text{conc}_{\text{reference}}} \right)^2} \quad (20)$$

where N refers to the number of references in the test set. The obtained values from the data set collected in Table 3 are 0.35 and 0.28 for the NO_3^- and Cl^- analytical systems, respectively. In conclusion, the results obtained for both methods agree, which corroborates the validity of the assumptions made in this linearization methodology.

Table 3

Determination of chloride and nitrate in different types of water using ion chromatography as a reference method

Sample	Disposable sensor Cl^- (mg L^{-1})	s^a	Reference method Cl^- (mg L^{-1})	s
Tap water (Granada)	1.52	0.51	3.14	0.02
Snow (Sierra Nevada, Granada)	0.52	0.13	0.49	0.00
Stream water (Chauchina, Granada)	333.52	149.70	436.44	1.01
Stream water (Láchar, Granada)	118.33	16.45	157.26	0.41
Seawater (Almuñecar, Granada)	23313	4322.20	21585.20	85.19
Seawater (Almería)	15639	7069	22735.82	105.41
River water (Malahá, Granada)	1820	334	1484.75	4.95
Rain water (Granada)	0.34	0.11	1.00	0.01
Sample	Disposable sensor NO_3^- (mg L^{-1})	s	Reference method NO_3^- (mg L^{-1})	s
Tap water (Granada)	1.16	0.18	1.41	0.02
Snow (Sierra Nevada, Granada)	0.14	0.04	0.14	0.03
Well water (Valderrubio)	207.76	24.23	154.08	0.50
Well water (Illora, Granada)	115.51	47.64	77.77	0.91
Well water (Otura, Granada)	27.86	3.72	30.89	0.06

All results were obtained from three replicate analyses.

^a Standard deviation from the three replicates.

5. Conclusion

We have established a simple mathematical linear model applicable to sensor membranes for anions based on the use of ionophore–chromoionophore chemistry working by coextraction. This methodology makes direct and fast determination of the samples possible without the need for preliminary operations, as the application range increases up to six orders of magnitude of analyte concentration, permitting the direct measurement of samples with extreme contents of analytes. In the two examples studied here, disposable sensors for nitrate and chloride, it was possible to analyse samples from snow water to seawater. The new curve response linearization for optical disposable sensors increases the analytical feasibility of that type of optical sensors. Additionally, this linearization methodology could be of interest for all sensing formats based on ionophore–chromoionophore chemistry such as flow through sensor probes.

Acknowledgement

We acknowledge financial support from the Ministerio de Educacion y Cultura, Dirección General de Enseñanza Superior (Spain) (Project No. BQU2002-00353).

References

- [1] U.E. Spichiger-Keller, Optical sensors, optodes, in: *Chemical Sensors and Biosensors for Medical and Biological Applications*, Wiley-VCH, Weinheim, 1998, p. 259.
- [2] U.E. Spichiger-Keller, D. Freiner, E. Bakker, T. Rosatzin, W. Simon, *Sens. Actuators B* 11 (1993) 263.
- [3] S.S.S. Tan, P.C. Hauser, K. Wang, K. Fluri, K. Seiler, B. Rusterholz, G. Suter, M. Krüttli, U.E. Spichiger-Keller, W. Simon, *Anal. Chim. Acta* 255 (1991) 35.
- [4] A. Ceresa, Y. Quin, S. Peper, E. Bakker, *Anal. Chem.* 75 (2003) 133.
- [5] L.F. Capitán-Vallvey, E.A. Guerrero, C.B. Merelo, M.D.F. Ramos, *Anal. Bioanal. Chem.* 380 (2004) 563.
- [6] S.S.S. Tan, P.C. Hauser, N.A. Chaniotakis, G. Suter, W. Simon, *Chimia* 43 (1989) 257.
- [7] R. Lump, J. Reichert, H.J. Ache, *Sens. Actuators B* 7 (1992) 473.
- [8] L.F. Capitán-Vallvey, E. Arroyo-Guerrero, M.D. Fernández-Ramos, F. Santoyo-Gonzalez, *Anal. Chem.* 77 (2005) 4459.
- [9] C. Demuth, U.E. Spichiger-Keller, *Anal. Chim. Acta* 355 (1997) 259.
- [10] T. Nezel, G. Zhylyak, G.J. Mohr, U.E. Spichiger-Keller, *Anal. Sci.* 19 (2003) 551.
- [11] Y.K. Hong, G.S. Cha, D.S. Shin, H. Nam, *Bull. Korean Chem. Soc.* 15 (1994) 836.
- [12] M. Kuratli, M. Badertscher, B. Rusterholz, W. Simon, *Anal. Chem.* 65 (1993) 3473.
- [13] C. Behringer, *Anal. Chim. Acta* 233 (1990) 41.
- [14] H. Hisamoto, N. Miyashita, K. Watanabe, E. Nakagawa, N. Yamamoto, K. Suzuki, *Sens. Actuators B* 29 (1995) 378.
- [15] E. Bakker, P. Bühlmann, E. Pretsch, *Chem. Rev.* 97 (1997) 3083.
- [16] C. Laba, H. Haas, J. Jodkowski, A. Lange, *Arch. Immun. Ther. Exper.* 34 (1986) 111.
- [17] B.D. Plikaytis, S.H. Turner, L.L. Gheesling, G.M. Carlone, *J. Clin. Microbiol.* 29 (1991) 1439.
- [18] J.A. Clark, A. El Shaarawi, *Appl. Environ. Microbiol.* 59 (1993) 380.
- [19] T.A. Hurlbut III, B. Littenberg, *Am. J. Clin. Pathol.* 96 (1991) 582.
- [20] P.F. de Aguiar, B. Bourguignon, M.S. Khots, W. Penninckx, D.L. Massart, *Quim. Anal.* 12 (1993) 177.
- [21] P.F. de Aguiar, M. Jimidar, D.L. Massart, *Acta Chromatogr.* 7 (1997) 35.
- [22] P. Bühlmann, E. Pretsch, E. Bakker, *Chem. Rev.* 98 (1998) 1953.
- [23] U.E. Spichiger-Keller, *Chemical Sensors and Biosensors for Medical and Biological Applications*, Wiley-VCH, Weinheim, 1998, p. 259.
- [24] S.L.R. Barker, M.R. Shortreed, R. Kopelman, *Anal. Chem.* 69 (1997) 990.
- [25] K. Seiler, K. Wang, E. Bakker, W.E. Morf, B. Rusterholz, U.E. Spichiger-Keller, W. Simon, *Clin. Chem.* 37 (1991) 1350.
- [26] M. Lerchi, E. Bakker, B. Rusterholz, W. Simon, *Anal. Chem.* 64 (1992) 1534.
- [27] K. Seiler, W. Simon, *Sens. Actuators B* 6 (1992) 295.
- [28] E. Bakker, M. Willer, E. Pretsch, *Anal. Chim. Acta* 282 (1993) 265.
- [29] L.F. Capitán-Vallvey, M.D. Fernández-Ramos, P. Alvarez de Cienfuegos, *Anal. Chim. Acta* 451 (2002) 231.
- [30] D. Rodbard, D.M. Hutt, Radioimmunoassay and related procedures in medicine, in: *Proceedings of the Symposium, Istanbul, 1973, 1974*, p. 165.
- [31] S. O'Neill, S. Conway, J. Twellmeyer, O. Egan, K. Nolan, D. Diamond, *Anal. Chim. Acta* 398 (1999) 1.
- [32] W.E. Morf, K. Seiler, B. Rusterholz, W. Simon, *Anal. Chem.* 62 (1990) 738.
- [33] K. Niikura, A.P. Bisson, E.V. Anslyn, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* (1999) 1111.
- [34] K. Seiler, W. Simon, *Anal. Chim. Acta* 266 (1992) 73.
- [35] L.F. Capitán-Vallvey, M.D. Fernández-Ramos, P. Alvarez de Cienfuegos, F. Santoyo-Gonzalez, *Anal. Chim. Acta* 481 (2003) 139.
- [36] P.C. Meier, *Anal. Chim. Acta* 136 (1982) 363.
- [37] M.A. Tabatabai, W.A. Dick, *J. Environ. Qual.* 12 (1983) 209.
- [38] U. Lessig, *Lebensmittel. Gericht. Chem.* 39 (1985) 135.



MINISTERIO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA

Oficina Española de Patentes y Marcas

INSTANCIA DE SOLICITUD

NUMERO DE SOLICITUD: 2005000799

FECHA Y HORA DE PRESENTACIÓN EN LA O.E.P.M.

FECHA Y HORA PRESENTACIÓN EN LUGAR DISTINTO O.E.P.M.

(4) LUGAR DE PRESENTACIÓN: GRANADA CÓDIGO 18

NACIONALIDAD	CÓDIGO PAÍS	DN/CIF	CNAE	PYME
ESPAÑOLA	ES	Q-1818002F		

(1) MODALIDAD:
 PATENTE DE INVENCION MODELO DE UTILIDAD

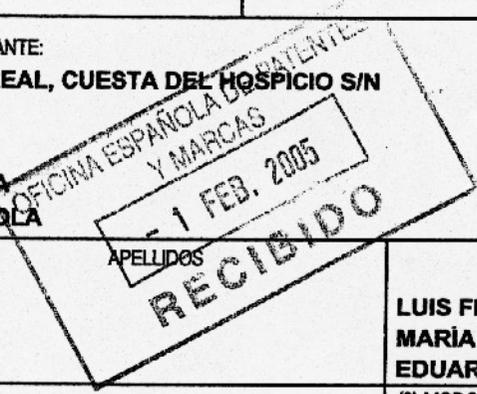
(2) TIPO DE SOLICITUD:
 ADICIÓN A LA PATENTE
 SOLICITUD DIVISIONAL
 CAMBIO DE MODALIDAD
 TRANSFORMACIÓN SOLICITUD PATENTE EUROPEA
 PCT: ENTRADA FASE NACIONAL

(3) EXP. PRINCIPAL O DE ORIGEN:
 MODALIDAD
 N° SOLICITUD
 FECHA SOLICITUD

(5) SOLICITANTE (S): APELLIDOS O DENOMINACIÓN SOCIAL: UNIVERSIDAD DE GRANADA
 NOMBRE

(6) DATOS DEL PRIMER SOLICITANTE:
 DOMICILIO HOSPITAL REAL, CUESTA DEL HOSPICIO S/N
 LOCALIDAD GRANADA
 PROVINCIA GRANADA
 PAÍS RESIDENCIA ESPAÑA
 NACIONALIDAD ESPAÑOLA

TELÉFONO 958 244336
 FAX 958 244301
 CORREO ELECTRÓNICO otri@invest.ugr.es
 CÓDIGO POSTAL 18071
 CÓDIGO PAÍS ES
 CÓDIGO PAÍS ES



(7) INVENTOR (ES):
 APELLIDOS: CAPITÁN VALLVEY FERNÁNDEZ RAMOS ARROYO GUERRERO
 NOMBRE: LUIS FERMÍN MARÍA DOLORES EDUARDO
 NACIONALIDAD: ESPAÑOLA ESPAÑOLA ESPAÑOLA
 CÓDIGO PAÍS: ES ES ES

(8) EL SOLICITANTE ES EL INVENTOR
 EL SOLICITANTE NO ES EL INVENTOR O ÚNICO INVENTOR

(9) MODO DE OBTENCIÓN DEL DERECHO:
 INVENC. LABORAL CONTRATO SUCESIÓN

(10) TÍTULO DE LA INVENCION:
 ELEMENTO PARA LA DETERMINACIÓN DE NITRATO

AGENCIA DE INNOVACION Y DESARROLLO DE ANDALUCIA IDEA
 JUNTA DE ANDALUCIA Granada
 ENTRADA IF 24/01/2005 13:51 0018

(11) EFECTUADO DEPÓSITO DE MATERIA BIOLÓGICA: SI NO

(12) EXPOSICIONES OFICIALES: LUGAR FECHA

PAÍS DE ORIGEN	CÓDIGO PAÍS	NÚMERO	FECHA

(14) EL SOLICITANTE SE ACOGE AL APLAZAMIENTO DE PAGO DE TASAS PREVISTO EN EL ART. 162. LEY 11/86 DE PATENTES

(15) AGENTE /REPRESENTANTE: NOMBRE Y DIRECCIÓN POSTAL COMPLETA. (SI AGENTE P.I., NOMBRE Y CÓDIGO) (RELLENÉSE, ÚNICAMENTE POR PROFESIONALES)

(16) RELACIÓN DE DOCUMENTOS QUE SE ACOMPAÑAN:

<input checked="" type="checkbox"/> DESCRIPCIÓN N° DE PÁGINAS: 22	<input type="checkbox"/> DOCUMENTO DE REPRESENTACIÓN
<input checked="" type="checkbox"/> N° DE REIVINDICACIONES: 6	<input type="checkbox"/> JUSTIFICANTE DEL PAGO DE TASA DE SOLICITUD
<input checked="" type="checkbox"/> DIBUJOS. N° DE PÁGINAS: 3	<input type="checkbox"/> HOJA DE INFORMACIÓN COMPLEMENTARIA
<input type="checkbox"/> LISTA DE SECUENCIAS N° DE PÁGINAS:	<input type="checkbox"/> PRUEBAS DE LOS DIBUJOS
<input checked="" type="checkbox"/> RESUMEN	<input type="checkbox"/> CUESTIONARIO DE PROSPECCIÓN
<input type="checkbox"/> DOCUMENTO DE PRIORIDAD	<input type="checkbox"/> OTROS:
<input type="checkbox"/> TRADUCCIÓN DEL DOCUMENTO DE PRIORIDAD	

FIRMA DEL SOLICITANTE O REPRESENTANTE
 (VER COMUNICACIÓN)

FIRMA DEL FUNCIONARIO

NOTIFICACIÓN SOBRE LA TASA DE CONCESIÓN:
 Se le notifica que esta solicitud se considerará retirada si no procede al pago de la tasa de concesión; para el pago de esta tasa dispone de tres meses a contar desde la publicación del anuncio de la concesión en el BOPI, más los diez días que establece el art. 81 del R.D. 2245/1986.

MOD. 31011 - 2 - EJEMPLAR PARA EL SOLICITANTE

NO CUMPLIMENTAR LOS RECUADROS ENMARCADOS EN ROJO



MINISTERIO
DE CIENCIA
Y TECNOLOGÍA



Oficina Española
de Patentes y Marcas

NÚMERO DE SOLICITUD

P200500199

FECHA DE PRESENTACIÓN

RESUMEN Y GRÁFICO

RESUMEN (Máx. 150 palabras)

ELEMENTO PARA LA DETERMINACIÓN DE NITRATO en diversos problemas que no exige tratamiento de la muestra o bien que este es mínimo y permite una determinación simple y económica. El elemento se basa en el empleo de receptores sintéticos para nitrato y la señal óptica se consigue mediante el acoplamiento en la membrana sensora hidrófoba de un indicador ácido-base lipofilizado. La medida u observación del cambio de color de rojo a azul dependiendo de la cantidad de nitrato en el problema permite su determinación en un amplio rango de concentraciones, con buena precisión y selectividad frente a aniones concomitantes con nitrato. El presente elemento analítico puede ser una alternativa con ventajas en cuanto a rapidez, precisión y costo sobre los métodos analíticos tradicionales y sobre las tiras reactivas comerciales de empleo habitual en análisis de aguas y agrícolas.

AGENCIA DE INNOVACION Y DESARROLLO
DE ANDALUCIA IDEA
JUNTA DE ANDALUCIA Granada
ENTRADA IF 24/01/2005 13:51 001B6

GRÁFICO

(VER INFORMACIÓN)