

TESIS DOCTORAL

Francisco Javier López González

**DESARROLLO DE SENSORES
ÓPTICOS PARA GASES Y
DISEÑO DE INSTRUMENTACIÓN
PORTÁTIL**



UNIVERSIDAD DE GRANADA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA



DESARROLLO DE SENSORES ÓPTICOS PARA GASES
Y DISEÑO DE INSTRUMENTACIÓN PORTÁTIL

TESIS DOCTORAL

FRANCISCO JAVIER LÓPEZ GONZÁLEZ
GRANADA, 2005

**DESARROLLO DE SENSORES ÓPTICOS PARA GASES
Y DISEÑO DE INSTRUMENTACIÓN PORTÁTIL**

por

FRANCISCO JAVIER LÓPEZ GONZÁLEZ

**Departamento de Química Analítica
Universidad de Granada**

VISADO en Granada, a 17 de Marzo
de 2005

MEMORIA presentada para aspirar
al Grado de Doctor en Ciencias
Químicas.
Granada, a 17 de Marzo de 2005

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

Prof. Dr. D. **Alberto José Palma López**,
Profesor Titular del Departamento
Electrónica y Tecnología de
Computadores.

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

Fdo.- **Francisco Javier López
González** Licenciado en Ciencias.
Sección Químicas.

A MIS PADRES

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi agradecimiento, en primer lugar a los directores de esta Tesis Dr. D. Luis Fermín Capitán Vallvey, Dra. Dña. M^a Dolores Fernández Ramos y Dr. D. Alberto José Palma López, quienes no solo la dirigieron sino que la impulsaron e inspiraron brindándome un apoyo continuo sin el cual hubiese sido imposible la realización de mi Tesis Doctoral.

Al Departamento de Química Analítica de la Universidad de Granada, por su soporte técnico, por su magnífica disponibilidad, acogida y hospitalidad.

Departamento Electrónica y Tecnología de Computadores, por su colaboración, por el interés mostrado en el desarrollo de esta Tesis y por la calidad humana del equipo que forman, con los que tuve la suerte de trabajar.

Al Departamento de Química Orgánica de la Universidad de Granada, por el interés que han mostrado cada vez que he necesitado cualquier cosa.

A cada uno de los Docentes e Investigadores del Departamento de Química Analítica por el apoyo y muestras de simpatía que hicieron mas acogedor y agradable el tiempo y lugar de trabajo y con los que compartí tantos buenos momentos. Especialmente mis compañeros de laboratorio que me han aguantado durante todo este tiempo.

De forma especial quiero expresar mi agradecimiento al Dr. D. Luis Fermín Capitán Vallvey por sus oportunos y sabios consejos de maestro, tanto laborales como personales.

ÍNDICE

CAPÍTULO 1 INTRODUCCIÓN	7
1. Gases y vapores	9
2. Sensores de gases.....	13
3. Sensores de oxígeno.....	23
4. Sensores de oxígeno basados en atenuación de luminiscencia.....	31
5. Sensores de dióxido de carbono	42
5.1. Tipos de sensores ópticos para dióxido de carbono.	43
CAPÍTULO 2 MATERIALES Y METODOLOGÍA	59
1. Materiales y equipos	61
1.1. Instrumentación y software.....	61
2. Productos químicos.....	67
2.1. Disolventes.....	67
2.2. Reactivos.....	68
2.3. Material de laboratorio.....	80
2.4. Material electrónico	81
2.5. Calibrado de instrumentación y equipos	82
3. Metodología	83
3.1. Preparación de membranas sensoras.....	84
3.2. Metodología de medida.....	87
3.3. Caracterización de la instrumentación desarrollada.....	91
4. Validación del método analítico	95

CAPÍTULO 3 PROTOTIPOS DESARROLLADOS.....	99
1. Introducción	101
2. Objetivos	101
3. Principio de medida	102
4. Prototipo P01	107
4.1. Diagrama de bloques.....	108
4.2. Zona sensora	110
4.3. Componentes relevantes.....	111
4.4. Limitaciones del prototipo P01	114
4.5. Esquemático y fotografías.....	114
5. Prototipos P02 y P03	115
5.1. Diagrama de bloques.....	116
5.2. Zona sensora	117
5.3. Componentes relevantes.....	118
5.4. Mejoras respecto al P01	119
5.5. Fotografías	120
6. Prototipo P04.....	121
6.1. Diagrama de bloques.....	122
6.2. Zona sensora	123
6.3. Nuevos componentes relevantes	124
6.4. Mejoras respecto a los prototipos anteriores	124
6.5. Esquemático y fotografías.....	125
6.6. Características técnicas	127

CAPÍTULO 4 DESARROLLO DE UN SENSOR ÓPTICO PARA OXÍGENO.	
CARACTERIZACIÓN DEL PROTOTIPO P01	134
1. Introducción	135
2. Atenuación de luminiscencia y relaciones cuantitativas	136
2.1. Ecuación de Stern-Volmer	136
2.2. Ecuación modificada de Stern-Volmer	140
3. Preparación de membranas	142
3.1. Luminóforo utilizado	143
3.2. Materiales poliméricos	146
3.3. Membranas sensoras de PVC	148
3.4. Membranas sensoras de silicona	153
3.5. Membranas sensoras de poliestireno	155
4. Caracterización de las distintas membranas	158
4.1. Caracterización de las membranas de PVC	158
4.2. Caracterización de membranas de silicona	162
4.3. Caracterización de membranas de poliestireno	166
4.4. Comparación de membranas	169
5. Caracterización del prototipo de instrumentación portátil P01	170
5.1. Con membranas de PVC	171
5.2. Con las membranas de PS	174
5.3. Comparación de resultados	177
6. Limitaciones.....	179

**CAPÍTULO 5 DESARROLLO DE UN SENSOR ÓPTICO PARA OXÍGENO.
CARACTERIZACIÓN DE LOS PROTOTIPOS P02 Y P03 181**

1. Introducción 183

2. Uso de polímeros fluorados 184

 2.1. Membranas sensoras de poli(isobutimetacrilato-co-tetrafluoroetilmetacrilato) 185

3. Atenuadores de oxígeno singlete 187

 3.1. El oxígeno singlete..... 187

 3.2. Eliminación del oxígeno singlete. 188

 3.3. Preparación de membranas sensoras de poliestireno con aditivo estabilizante 189

 3.4. Caracterización de las membranas 190

4. Caracterización en el prototipo P02 200

 4.1. Respuesta a oxígeno..... 200

 4.2. Capacidad de respuesta de la membrana. 201

5. Comparación de membranas 202

6. Influencia de la temperatura..... 203

7. Interferentes 206

 7.1. Interferencia del metano (CH₄) 206

 7.2. Interferencia de protóxido de nitrógeno (N₂O). 209

 7.3. Interferencia de dióxido de carbono..... 211

 7.4. Interferencia de dióxido de azufre (SO₂)..... 214

 7.5. Interferencia de sulfuro de hidrógeno (H₂S) 216

8. Conclusiones 218

CAPÍTULO 6 MEJORA DE LA ZONA SENSORA. CARACTERIZACIÓN DEL PROTOTIPO P04	221
1. Introducción	223
2. Preparación de fotodetectores recubiertos.....	224
3. Caracterización de los fotodetectores	225
3.1. Respuesta a oxígeno.....	225
3.2. Capacidad de respuesta.	239
3.3. Comparación de resultados	242
3.4. Parámetros analíticos	244
4. Influencia de la temperatura.....	248
4.1. Influencia sobre la ecuación de Stern-Volmer	249
5. Calibración en un punto: Autocalibración.	254

CAPÍTULO 7 SENSOR ÓPTICO PARA LA DETERMINACIÓN DE DIÓXIDO DE CARBONO	269
1. Introducción	269
2. Membranas colorimétricas para CO₂.....	271
2.1. Esquema químico	271
2.2. Indicadores de pH y polímeros.....	276
2.3. Preparación y caracterización de las membranas colorimétricas para CO ₂	
279	

3. Preparación y caracterización de membranas para CO₂ conteniendo luminóforo interno	292
3.1. Esquema químico.....	292
3.2. Tipos de sensores desarrollados.....	297
3.3. Membranas conteniendo donador y aceptor.....	298
3.4. Membranas dobles de donador y aceptor.....	301
3.5. Membranas bicapa de donador y aceptor.....	302
4. Preparación y caracterización de membranas para CO₂ conteniendo luminóforo interno e insensibles a oxígeno.	309
4.1. Membrana sensora bicapa para CO ₂	309
4.2. Membrana sensora con nanopartículas.....	317
4.3. Fotodiodos recubiertos con nanopartículas en EC.....	332
5. Conclusiones	335
 CONCLUSIONES	 339
 BIBLIOGRAFÍA	 347

La presente Tesis Doctoral se ha realizado en el marco de la colaboración entre dos grupos de investigación de la Universidad de Granada, “Espectrometría en Fase Sólida” (FQM-118) del Departamento de Química Analítica e “Investigación en Dispositivos Electrónicos” (TIC-105) del Departamento Electrónica y Tecnología de Computadores, bajo la dirección de los Drs. D. Luis Fermín Capitán Vallvey y D. Alberto J. Palma López, respectivamente. En este contexto se han planteado unos objetivos comunes, establecido una metodología de trabajo y desarrollado tanto la instrumentación necesaria como las membranas sensoras por parte de cada uno de los grupos implicados con las correspondientes sinergias y retroalimentaciones.

La financiación necesaria ha corrido a cargo de tres proyectos financiados por el Convenio Madoc-Universidad de Granada de título: 1) “Desarrollo de un prototipo de sensor para niveles de oxígeno en aire” (Proyecto 1.2000; duración: 1-10-2000 a 1-04-2001); 2) “Desarrollo de sensores para gases” (Proyecto: 2000-1; duración: 1-1-2002 a 31-12-2002); 3) “Desarrollo de nuevos sensores para gases” (Proyecto: 2000-1/2003; duración: 1-3-2003 a 30-3-2004), así como por un proyecto del Programa Nacional de Diseño y Producción Industrial. Programa de Fomento de de la Investigación Técnica (PROFIT) de título “Diseño y desarrollo del prototipo de un sistema electrónico portátil de medida de oxígeno con sensor químico de tipo óptico” (FIT-020100-2002-372; duración: 2002 a 2004). Proyectos que además han permitido la financiación de tres becas de investigación de personal adscrito al mismo.

Queremos agradecer la ayuda prestada al MADOC y al Vicerrectorado de Investigación de la Universidad de Granada.

OBJETIVOS

El objetivo general que se pretende en esta Tesis Doctoral es el desarrollo de sensores ópticos para la medida de gases como son oxígeno y dióxido de carbono, en conexión con el diseño y fabricación del prototipo de un sistema electrónico portátil de medida con las características de bajo coste y manejo sencillo, basado en medidas de atenuación de luminiscencia. Asimismo se desea que el esquema instrumental que se desarrolle sea válido para la determinación de diversas especies a través de la modificación de la zona sensora e incluso que pudiera servir para determinaciones multiparamétricas.

Como objetivos específicos señalamos:

- Diseño y puesta a punto de membranas sensoras para oxígeno: a) selección de luminóforo, materiales poliméricos, aditivos y soportes; b) sistema de preparación de membranas.
- Caracterización de las membranas sensoras mediante instrumentación de sobremesa en términos de respuesta, reversibilidad y estabilidad.
- Estrategias para la ubicación de las membranas sensoras en la instrumentación portátil desarrollada y su caracterización.
- Inclusión en el prototipo de una función de calibrado que, por un lado, corrija los efectos térmicos y, por otro, permita la calibración del instrumento en un solo punto.
- Selección de componentes para la preparación de membranas sensoras para dióxido de carbono de modo que se use el mismo principio de medida óptica que en caso del oxígeno.
- Caracterización de las membranas preparadas en instrumentación de sobremesa.
- Estudio de la respuesta del prototipo incluyendo las membranas desarrolladas para la detección de dióxido de carbono.

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1. Gases y vapores

Un gas es un estado de la materia caracterizado por una densidad y viscosidad relativamente bajas y una gran capacidad para sufrir expansiones y contracciones con los cambios de temperatura y presión. Su capacidad para difundirse con facilidad justifica su tendencia espontánea a distribuirse uniformemente en cualquier recipiente. La palabra gas posiblemente tiene su origen en la palabra griega *caos*.

En el caso de que un fluido gaseoso tenga una temperatura inferior a su temperatura crítica, su presión no aumenta al ser comprimido, sino que se transforma parcialmente en líquido. En este caso hablamos de vapor.

Actualmente la determinación de gases y vapores es una necesidad rutinaria en Química Analítica y existen multitud de situaciones en las que debe obtenerse información acerca de qué gases o vapores se encuentran presentes en una atmósfera determinada o disueltos en un líquido dado y en que proporción.

Lo más inmediato es la atmósfera, especialmente la atmósfera inferior, compuesta mayoritariamente por tres gases: nitrógeno (78%), oxígeno (21%) y argón (1%) y minoritariamente por otros gases como dióxido de carbono, monóxido de carbono, metano, ozono y otros. Existen además vapores como el de agua en proporción muy variable y diversos sólidos y líquidos.

Un problema especialmente grave relacionado con ciertos gases lo constituye el llamado efecto invernadero, por el que se conoce la subida de temperatura de la superficie terrestre y la atmósfera inferior debido a la presencia o aumento de concentración de ciertos

gases –gases invernadero- en la atmósfera, así agua, dióxido de carbono, óxido nitroso o metano entre otros, que absorben radiación infrarroja que en otro caso escaparía al espacio. Este efecto invernadero es importante, pues sin él la Tierra no dispondría de suficiente calor para permitir la vida, pero si llega a ser demasiado intenso, como ha comenzado a ser el caso, se originan problemas para toda la biosfera. La importancia de este problema ha exigido la adopción de acuerdos internacionales como el Protocolo de Kyoto, realmente llamado Kyoto Protocol to the United Nations Framework Convention on Climate Change, que este mismo año ha entrado en vigor para el control de la emisión de gases invernadero, como es el dióxido de carbono.

Las causas de este incremento en la concentración de gases invernadero son muy variadas, siendo la más importante la de dióxido de carbono como consecuencia del empleo de combustibles fósiles (carbón, petróleo y derivados, gases, etc.) para la obtención de energía, aunque la deforestación y el cambio en el uso de la tierra también han contribuido. Con objeto de comparar la capacidad de diferentes gases invernadero, se usa el concepto de potencial de calentamiento global (GWP) definido como el cociente entre el calor absorbido por unidad de masa de un gas dado y el de la unidad de masa del CO₂.

Otro gas invernadero de importancia es el óxido nitroso de larga persistencia en la atmósfera (120 años) y mucha mayor capacidad para absorber calor (GWP 310), el cual tiene su origen tanto en diversos procesos naturales como antropogénicos, así usos agrícolas, combustiones o producción de ácido nítrico. El metano es un gas invernadero originado en procesos biológicos que ocurren en ambientes anaeróbicos y es una importante fuente de energía. Aunque su vida media en la atmósfera es corta (12 años), su GWP es de 21.

Además de estos gases, existen otros de efecto invernadero más intenso, los cuales se pueden clasificar en tres grupos: los conocidos como hidrofluorocarbonos, realmente hidrocarburos fluorados, los perfluorocarbonos, realmente perfluorohidrocarburos, y el hexafluoruro de azufre.

Los hidrofluorocarbonos son un grupo de compuestos químicos de gran uso industrial, comercial y de consumo, muchos de los cuales se han desarrollado como alternativa a compuestos del tipo clorofluorocarbonos. Compuestos estos últimos que tienen gran incidencia en la disminución en la concentración de ozono en las capas altas de la atmósfera. El

GWP de los hidrofluorocarbonos varía entre amplios márgenes que va desde 140 (HFC-152a) hasta 11.700 (HFC-23), con unos valores de vida media que oscilan entre un año para el HFC-152a a 260 años para el HFC-23.

Los perfluorocarbonos tienen su origen en diversos procesos industriales como la producción de aluminio y la fabricación de semiconductores, siendo las más habituales el tetrafluorometano y el hexafluoroetano (GWP 6.500 y 9.200, y una vida media de 50.000 y 10.000 años, ambos respectivamente). El hexafluoruro de azufre es el gas invernadero más potente con un GWP de 23.900 y su concentración en la atmósfera se incrementa debido a su uso como aislante eléctrico, también en la fabricación de magnesio para aislarlo de la atmósfera cuando está fundido y en la industria de semiconductores.

No obstante lo dicho acerca de gases que presentan el problema específico de actuar como gases invernadero, existen otra multitud de situaciones en las que se pueden generar gases que originan otros tipos de problemas.

Uno de ellos es el relativo a procesos de combustión que aparecen implicados en muy diversas situaciones y que generan diversos tipos de gases de los que algunos, principalmente CO_2 , está implicado en el efecto invernadero. Se utilizan procesos de combustión principalmente en plantas energéticas de combustión, vehículos, calefacciones industriales y domésticas, y los problemas que originan no son solo ambientales.

Por ejemplo, en procesos de combustión en el hogar que tienen su origen en cocinas y hornos tanto eléctricos como de gas o aceite y, en menor medida aunque no despreciable, leña o carbón. Como consecuencia de los procesos de cocinado y preparación de alimentos en general, se generan toda una serie de gases y vapores, algunos de los cuales presentan problemas para la salud, entre los que se encuentran monóxido de carbono, hidrocarburos, hidrocarburos aromáticos policíclicos, aldehídos, dióxido de azufre, sulfuro de hidrógeno, óxidos de nitrógeno y partículas. El problema en este caso, no son los gases que escapan a la atmósfera sino los que permanezcan en el edificio por su incidencia sobre la salud a corto o largo plazo.

Un caso aparte lo constituyen los gases industriales cuyas principales usos se encuentran en la industria, medicina y aplicaciones ambientales. La razón del uso de estos gases reside en su reactividad, en su inercia o bien como gases licuados por su capacidad para producir frío. Entre los primeros se encuentra el oxígeno, hidrógeno, metano, monóxido de carbono y dióxido de carbono usados en diferentes procesos industriales como procesados de metales o síntesis química. El nitrógeno y el argón son los más usados como gases inertes para el almacenamiento de productos inflamables bajo atmósfera de ellos o bien de productos degradables al aire como aceites vegetales o fragancias. Igualmente, el CO₂ se usa por su inercia química para la extinción de incendios. Como gases licuados se usan nitrógeno y dióxido de carbono que combinan una frialdad intensa con gran inercia por lo que se usan para congelación industrial, así en alimentación o estudios biomédicos, de forma que no se altere la calidad del producto o se minimice el daño celular.

En medicina tiene gran importancia la determinación de gases en sangre, principalmente en sangre arterial y más raramente en sangre venosa. Estos gases son oxígeno y su producto de desecho celular, el CO₂. La determinación de la presión parcial de ambos gases, junto con el valor del pH, permite obtener información de gran interés acerca de las funciones respiratorias del paciente.

Otro aspecto que no hay que olvidar es el empleo de multitud de productos químicos, muchos de los cuales no son en sí gases, aunque vaporizan con facilidad o se usan en forma de aerosoles y que presentan gran incidencia en la salud. Así podemos citar el uso de plaguicidas en la agricultura, especialmente en la intensiva o la proyección de aislantes térmicos y impermeabilizantes en la construcción de edificios.

Un caso especial del empleo de gases y vapores, y no por ello menos insidioso, es su uso en la guerra química y también para control de manifestaciones, donde encontramos desde gases letales como los neurotóxicos, entre los que se encuentran los conocidos sarín y tabún, a incapacitantes como los lacrimógenos, estornudógenos o nauseosos.

Con este breve repaso, hemos querido poner de manifiesto que en nuestra sociedad, los gases y vapores están siempre presentes y, como siempre, con una intencionalidad que depende del ser humano. Por ello, es necesario tanto el conocimiento como el control de estos compuestos.

Para el análisis tanto de gases como vapores y sus mezclas existen gran número de técnicas diferentes que no se van a referenciar en esta Introducción. Solo nos vamos a centrar en el empleo de sensores por el extraordinario desarrollo que han tenido, su amplio uso y el gran número de empresas que se dedican a ello y que constituyen por sí mismo un amplio campo de negocio.

2. Sensores de gases

Una de las tendencias actuales de la Química Analítica es la búsqueda de tecnologías que permitan desarrollar métodos de análisis rápidos, baratos, con instrumentación sencilla y a ser posible portátil que posibiliten el análisis *in situ*, en tiempo real, que simplifiquen todo el proceso analítico y descongestionen la realización de los análisis en el laboratorio que no sean realmente necesarios. Dentro de esta línea, la tecnología de sensores químicos ofrece un elevado potencial¹. La primera cuestión que surge es establecer que es un sensor. Desde hace bastante tiempo se vienen utilizando en el laboratorio sensores como puede ser el caso del electrodo de pH, que da lugar, mediante el uso del pH-metro, al mejor método que existe para medir la acidez.

Los sensores pretenden de alguna manera emular o sustituir a los sentidos mediante los cuales los seres vivos interaccionan y se relacionan con el medio ambiente. En el cuerpo humano existen, al menos, cinco sensores diferentes, los situados en nuestra nariz, nuestra lengua, nuestros oídos, nuestros ojos y nuestros dedos. Los oídos, los ojos y los dedos se pueden considerar como sensores físicos, ya que ellos detectan sensaciones físicas de sonido, luz, calor y presión, respectivamente. Con la nariz podemos detectar el olor proveniente de la presencia de gases y vapores en el medio en concentraciones que pueden ser muy bajas. La nariz es un sensor extremadamente sensible y selectivo, el cual es muy difícil de emular artificialmente, puede distinguir cualitativamente entre muchas sustancias químicas diferentes e incluso puede dar idea de la magnitud llegando a límites de detección muy bajos. Estas sustancias químicas pasan a través de las membranas olfativas al bulbo olfativo que contiene

¹ J. Janata, M. Jasowicz P. Vanysev y D.M. De Vaney, Anal. Chem, 70, 179R (1998).

receptores biológicos. La respuesta es una señal eléctrica que es transmitida al cerebro vía nervios olfativos, siendo transducida por el cerebro en una sensación que conocemos como olor. La lengua opera de forma similar con sustancias en disolución².

El establecimiento de la definición de sensor unánimemente aceptada ha dado lugar a muchos debates, controversias y a diferentes definiciones. Una de las definiciones que en nuestra opinión mejor caracteriza el concepto y que se encuentra muy próxima a la definición de la IUPAC, es considerarlo un dispositivo capaz de registrar de forma directa, continua y reversible un parámetro físico (sensor físico) o la concentración o presencia de una especie química (sensor químico)³.

Los sensores químicos constan de un conjunto de elementos que se pueden agrupar en tres bloques básicos (Figura 1.1) que son: 1) el elemento de reconocimiento capaz de interactuar de forma selectiva con el analito o analitos; interacción que no tiene porque ser a través de una reacción química; 2) el elemento transductor mediante el cual se transforma la información química en información física, generalmente eléctrica; c) un sistema electrónico para la amplificación y procesado de la señal que nos genera resultados en las unidades químicas (molaridad, porcentaje) o físicas (presión) de interés.

² B.R. Eggins, *Chemical Sensors and Biosensors*, John Wiley & Son, 2002.

³ C. Pérez Conde, *Sensores Ópticos*, 1 ed., Servicio de Publicaciones Universidad de Valencia (1996).

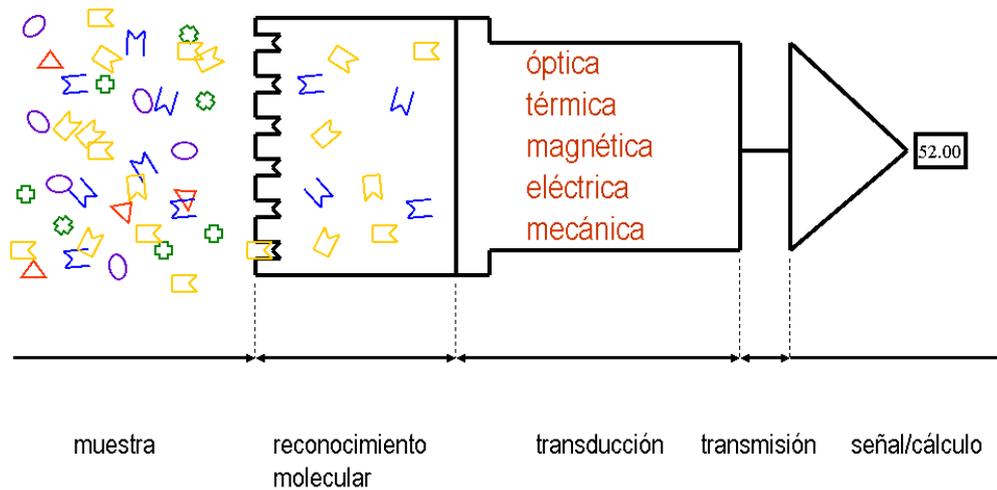


Figura 1.1. Diagrama de bloques de un sensor químico

La determinación de gases tiene gran importancia en diversos campos como puede ser medicina, medioambiente, biología, agricultura, seguridad en el trabajo, defensa, transporte o industria, así en la industria automovilística, aeroespacial, agroalimentaria o minera. De manera muy general y no excluyente, se pueden clasificar en tres grandes grupos las necesidades de determinación de gases: a) sensores de oxígeno relacionados con atmósferas respirables (concentraciones del 20%) y con el control de procesos de combustión en calderas y motores de explosión interna (concentraciones entre 0 y 5%); b) sensores para gases inflamables que protejan de fuego o explosión y que deben operar por debajo del límite inferior de explosión, lo que supone un bajo porcentaje de gas; c) sensores para gases tóxicos, capaces de determinar concentraciones por debajo de las dosis máximas admisibles (TLV), que frecuentemente se encuentran entre 1 y 100 ppm.

Los tipos de sensores para gases más usados comercialmente son los de estado sólido, los electroquímicos y los de infrarrojos. Dentro de los primeros, los sensores de estado sólido, hay tres tipos bien conocidos y de amplio uso: a) los de electrolito sólido, los catalíticos y los de óxidos semiconductores.

Los primeros de ellos emplean electrolitos sólidos⁴, materiales que permiten la conducción de iones pero no la de electrones, cumpliendo un papel similar a la de los electrolitos en disolución permitiendo el funcionamiento de las células electroquímicas. El papel esencial del electrolito sólido es separar dos regiones de diferente actividad en el analito y permitir una alta movilidad de un ión de ese analito entre las dos regiones. La medida de potencial, intensidad o carga se usa como señal analítica y para ello, es necesario que el electrolito presente una alta conductividad iónica. Los sensores más habituales dentro de los de electrolito sólido son los potenciométricos⁵, de los que existen diversos tipos. En los primeros, el ión móvil en el electrolito sólido participa directamente en un equilibrio con la especie química que fija el potencial; en un segundo tipo, el ión móvil en el material electrolítico no está en equilibrio con la especie a determinar, sino que el ión relacionado con el analito está disuelto en ese electrolito sólido, permitiéndose su equilibrado con la atmósfera. En la tercera categoría, ocurre más de una reacción en el electrodo de forma que se origina un potencial mixto; como electrolito sólido se ha utilizado en este caso fosfato de circonio para el sensado de hidrógeno o ácido antimónico para monóxido de carbono.

Los sensores catalíticos se basan en el denominado pellistor que esencialmente es un microcalorímetro catalítico, consistente en una superficie catalítica situada sobre un sensor de temperatura, junto con un sistema de calentamiento, que frecuentemente es el mismo sensor de temperatura, un arrollamiento de platino, que mantiene el catalizador a una temperatura lo suficientemente alta (~500 °C). Por ello, el pellistor suele ser un simple alambre de platino recubierto de una pasta catalítica de un material inerte, así alúmina, y un catalizador que acelera la oxidación. De esta forma, se asegura una rápida combustión de cualquier gas

⁴ P.T. Moseley, *Meas. Sci. Technol.*, 8, 223 (1997).

⁵ H.D. Wiemhofer y W. Gopel, *Sens. Actuators B*, 4, 365 (1991).

inflamable que se encuentre en las proximidades. La medida de las variaciones de resistencia como consecuencia del aumento de temperatura producido por la combustión permite la monitorización de cambios en la concentración.

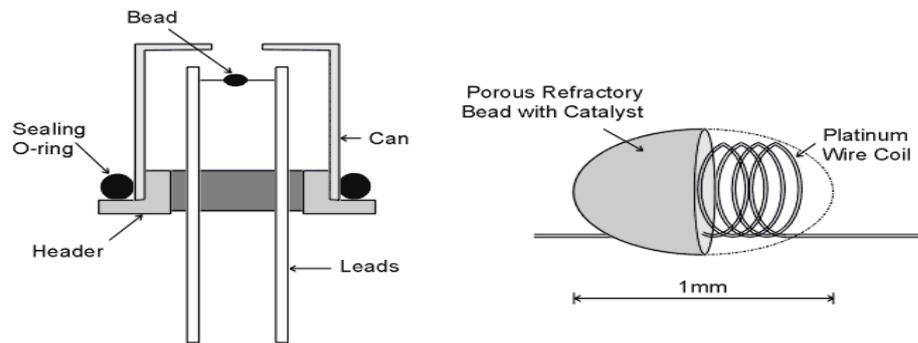


Figura 1.2. Diagrama esquemático de un pellistor y su montaje

El sensor consiste en un par de elementos idénticos, denominados detector y compensador, pues no contiene material catalítico, ambos situados en un puente de Wheatstone, lo que origina una señal de salida si la resistencia del detector difiere de la del compensador.

La respuesta que originan estos sensores no es selectiva pues depende además de la concentración del gas inflamable, de su calor de combustión y de la velocidad de difusión del gas al sensor. El voltaje de salida depende del tipo de gas detectado, pero muestra una buena linealidad con la concentración de gas. Estos sensores dan una medida general aproximada de cualquier gas inflamable; siendo esta medida de explosividad de mezclas, a veces se denominan explosímetros, una de sus aplicaciones de mayor interés. Como inconveniente puede citarse que la sensibilidad de los sensores catalíticos se puede ver comprometida por envenenamiento del catalizador por gases ambientales, así por ejemplo en la detección de metano, los hidrocarburos halogenados envenenan reversiblemente el catalizador. Tampoco son adecuados para medidas *in situ* durante largo tiempo y para realizar el muestreo del gas es necesario una bomba interna.

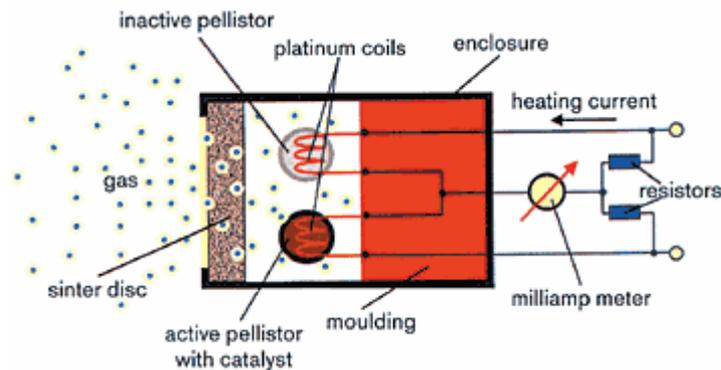


Figura 1.3. Esquema de funcionamiento del sensor catalítico Polytron 2 XP Ex de Dräger Safety AG & Co.

El tercer grupo de sensores de gases de estado sólido son los basados en óxidos metálicos semiconductores, los cuales se introducen a partir del descubrimiento en 1953 de que la adsorción de un gas en la superficie de un semiconductor de óxido metálico origina un gran cambio en su resistencia eléctrica^{5,6}. Existen pocos óxidos usados comercialmente en esta tecnología debido a los requerimientos combinados de resistividad, sensibilidad y efecto de la humedad, entre ellos se encuentran ZnO_2 , TiO_2 , Cr_2TiO_3 , WO_3 y SnO_2 .

El cambio en resistencia se debe a la pérdida o ganancia de electrones superficiales como resultado de que el oxígeno adsorbido reacciona con el analito gaseoso. Si el óxido semiconductor es de tipo n, ocurrirá una ganancia de electrones, si el gas es reductor, o pérdida, si el gas es oxidante, desde la banda de conducción del semiconductor. Los óxidos tipo n aumentan su resistencia cuando el analito es un gas oxidante como NO_2 o O_3 , mientras que la disminuyen si es reductor como ocurre para CO , CH_4 o C_2H_5OH . La inversa es cierta para óxidos tipo p como el Cr_2TiO_3 .

⁶ D.E. Williams, Sens. Actuators B, 57, 1 (1999).

Como el cambio en la resistencia eléctrica del óxido debido al analito gaseoso se debe a una reacción superficial, los sensores de gases comerciales emplean capas de óxido muy porosas que están impresas o depositadas sobre chips de alúmina, al objeto de proporcionar la máxima superficie. Una banda de calentamiento situada en la otra cara del chip minimiza la interferencia de la humedad e incrementa la velocidad de respuesta.

Estos sensores de óxido metálico no discriminan habitualmente entre diferentes gases, por lo que es necesario considerar la microestructura del óxido y optimizar su espesor y temperatura de trabajo para mejorar la selectividad. Por otra parte, la selectividad puede mejorarse con el uso de aditivos catalíticos, recubrimientos protectores y filtros de carbón activo. Se utilizan para numerosos gases operando en el intervalo de las ppm, siendo relativamente baratos, simples, robustos y con una larga vida útil. Como ya se ha mencionado presentan baja selectividad y los gases de base pueden originar lecturas erróneas. Por otra parte, la señal de salida del sensor no es lineal lo que hace la calibración más complicada y es sensible a la presencia de humedad, lo que dificulta su uso en subsuelo^{7,4}.

Los sensores electroquímicos son similares a los sensores de electrolito sólido antes comentados. Bajo condiciones adecuadas, un sensor electroquímico puede oxidar o reducir a gases o vapores que se difunden a través de una membrana hidrofóbica o bien a través de un capilar. La reacción de electrodo es de tipo catalítico, lo que origina una señal eléctrica. En ocasiones se incorpora un tercer electrodo integrado en un circuito potencioestático, que mantiene el voltaje del sensor constante, y permite que la intensidad de corriente sea proporcional a la concentración de gas. Para compensar la influencia de la temperatura se incluye en el sensor un resistor con coeficiente de temperatura negativo.

Los sensores electroquímicos de gases pueden ser de dos tipos: sensores basados en células de combustible y sensores de tipo galvánico. Los primeros son células de combustible miniaturizadas, pues consumen como combustible un gas, que es el analito, y como comburente oxígeno. En este caso, consumen muy pequeñas cantidades de gas cuya absorción está controlada por una barrera de difusión. Consisten en una cátodo, un ánodo y un electrolito adecuadamente seleccionados para el gas de interés, el cual se difunde a la célula donde

⁷ C.K. Ho, M. Kelley, I. Tamura y R.C. Hughes, SAND2001-0643 (2001).

ocurre la reacción química que genera un valor de intensidad de corriente usado como parámetro analítico. Las células usadas tienen la difusión limitada, de manera que la velocidad a la que entra el gas es exclusivamente dependiente de la concentración del gas.

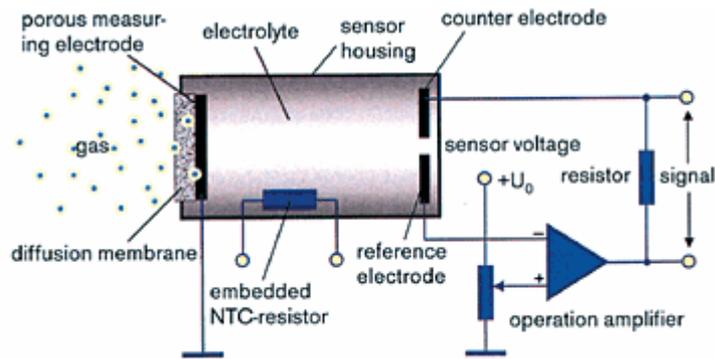


Figura 1.4. Esquema de funcionamiento de un sensor de gases electroquímico

En la mayoría de los casos ocurre la oxidación del gas a analizar con lo que el electrodo de trabajo se vuelve negativo, así ocurre con el CO o el H₂S, teniendo lugar la reducción del oxígeno en el contraelectrodo. En algunas ocasiones, sin embargo, ocurre la reducción del gas, así para el NO₂ o el Cl₂. Dado que no consumen ningún compuesto interno, estos sensores deben tener vida larga, que en la práctica es de 3 a 4 años.

Los sensores galvánicos consumen los electrodos o el electrolito presente, pudiendo ser usados para diferentes gases como oxígeno, gases ácidos, amoníaco o cianuro de hidrógeno, por ello, la vida de estos sensores está gobernada por la cantidad de gas que utiliza, lo que hace que, en general, sea corta. Los sensores electroquímicos pueden ser más selectivos que los anteriormente citados, aunque presentan problemas relacionados con el alto valor de la corriente residual, deriva y lentitud en la respuesta.

El uso de tecnología SAW (Surface Acoustic Wave)⁸ esta permitiendo el desarrollo de nuevos tipos de sensores basado en la modificación de propiedades de semiconductores por adsorción de moléculas gaseosas. Un dispositivo SAW consiste en un transductor de entrada, una película de un adsorbente del analito y un transductor de salida situado sobre un sustrato piezoeléctrico que suele ser de cuarzo. La onda acústica, de unos 1000 Hz, originada por el transductor de entrada, viaja a través de la película, y es detectada por el transductor de salida. Dado que la velocidad y atenuación de la señal depende de la viscoelasticidad y de la masa de la película, la retención de un analito sobre esta película originara señales que podran permitir su determinación

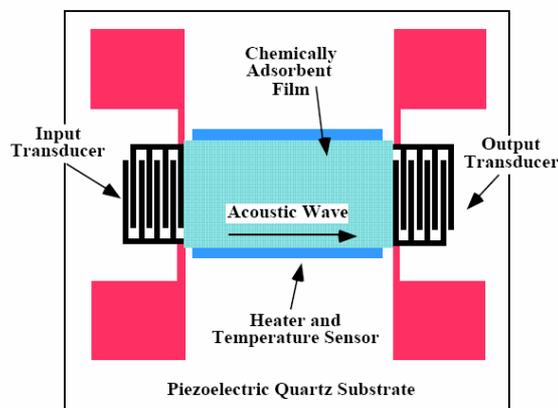


Figura 1.6. Esquema de un sensor SAW.

Así es posible distinguir entre organofosfatos, hidrocarburos clorados, cetonas, alcoholes, hidrocarburos aromáticos y saturados y agua⁷.

Los sensores de tipo óptico para gases⁹ pueden utilizar propiedades intrínsecas como es el caso de dióxido de carbono, metano, dióxido de azufre u otros, basado en su absorción

⁸ M. Koji, S. Hiroyuki y S. Yasuo, *Bunseki Kagaku*, 54, 83 (2005).

⁹ C. Kolle, W. Gruber, W. Trettnak, K. Biebmik, C. Dolezal, F. Reininguer, P. O. Leary, *Sens. Actuators B*, 38, 141 (1997).

IR y menos frecuentemente en su absorción UV. La medida de absorción infrarroja por parte de gases da lugar a sensores simples, robustos, con tiempo de respuesta corto, inmune a envenenamiento y con buena estabilidad. Es habitual que las medidas utilicen un sistema de doble haz, un haz de radiación de frecuencia adecuada atraviesa una distancia fija en la atmosfera donde se puede encontrar el gas, mientras que el haz de referencia es de una frecuencia no absorbida por el gas en cuestión.

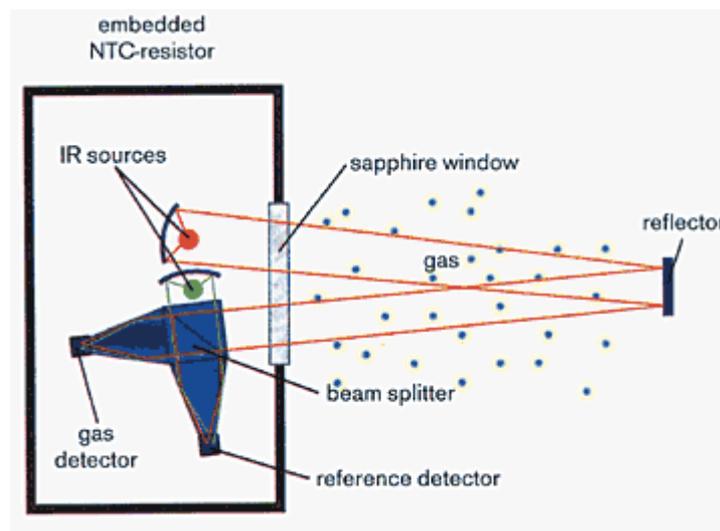


Figura 1.5. Principio de funcionamiento de un sensor IR para gases de doble haz.

Otras estrategias usadas para el desarrollo de sensores para gases se basan en la fotoionización mediante radiación UV usadas para la detección de vapores orgánicos⁷; o el empleo de la ionización de llama que presenta una considerable sensibilidad. Los detectores fotoacústicos basados en la combinación de radiación IR y sensores de cambios transitorios de presión permiten la determinación precisa de concentraciones.

Un grupo de sensores ópticos de gran interés son los basados en la atenuación de luminiscencia de un luminóforo por parte de atenuadores dinámicos como puede ser el

oxígeno, dióxido de azufre¹⁰, óxidos de nitrógeno¹¹, halotano, cloruros¹², cloro¹³, en este caso mediante atenuación por cloruro originado en disolución, u otros. De todos ellos, los más interesantes y demandados con mucho son los sensores de oxígeno.

3. Sensores de oxígeno

En esta sección se comentan las distintas aplicaciones que tienen estos sensores y algunos de los diferentes tipos de sensores de oxígeno existentes, ocupándonos más detenidamente los sensores de oxígeno de tipo óptico basados en atenuación de luminiscencia.

La determinación de oxígeno, tanto presente en mezclas de gases como disuelto en agua, mediante el empleo de sensores tiene una gran importancia en diversos campos¹⁴ como puede ser automoción, medicina, biología, transporte, industria, seguridad, aeroespacial y otros. En la siguiente Tabla 1.1 se recogen algunas de las aplicaciones más usuales.

El fomento de la tecnología de sensores de oxígeno en las pasadas décadas ha conducido a grandes progresos en el control de la contaminación y, por tanto, en la protección ambiental¹⁵. Un excelente ejemplo es el campo de la automoción en el que los sensores de oxígeno se han convertido en un componente clave en los actuales sistemas de control de motores de combustión. Se pueden clasificar los sensores de oxígeno para automoción en dos grupos: los que miden la concentración de oxígeno en los gases de combustión y los que miden la concentración de este gas en el interior del automóvil. Los primeros, y más habituales, están instalados en el sistema de control para reducir la emisión de gases tóxicos y, al mismo tiempo, mejorar la eficiencia de la combustión y el consumo de combustible.

¹⁰ T. M. A. Razek, M. J. Miller, S. S. M. Hassan y M. A. Arnold, *Talanta* 50, 491 (1999).

¹¹ D.Y. Sasaki, S. Singh, J.D. Cox y P.I. Pohl., *Sens. Actuators B*, 72, 51 (2001).

¹² C. Huber, T. Werner, O.S. Wolfbeis, D.E. Bell y S. Young, *Optical-chemical Sensor*, U.S. Patent 20020034826 (2003).

¹³ S. Kar y M.A. Arnold, *Talanta*, 42, 663 (1995).

¹⁴ A.E. Colvin, T.E. Phillips, J.A. Miragliotta, R.B. Givens, C.B. Bargeron., *John Hopkins Apl. Technical Digest*, 17, N4 (1996).

¹⁵ R. Ramamoorthy, P.K. Dutta y S.A. Akbar, *J. Mat. Sci.* 38, 4271 (2003).

Tabla 1.1 Aplicaciones de sensores de oxígeno

Área	Aplicación
Militar/ Gubernamental	
Espacios interiores	Vehículos blindados personales, cabinas de mando
Nuclear	Agua de refrigeración de reactores
Industria aeroespacial	Control de atmósferas artificiales
Residuos tóxicos	Monitorización de campo
Medicina	
Gas en sangre	Chequeos no invasivos
Ventiladores	Control del ciclo respiratorio
Quirófanos	Mezclas oxígeno nitrógeno, otras mezclas
Unidades de quemados	Control de oxígeno en unidades de recuperación
Medio ambiente	
Contaminación del aire	Agencias de protección ambiental
Aguas superficiales y subterráneas	DBO, monitorización de contaminación
Aguas municipales	DBO, calidad de aguas, plantas depuradoras
Procesos industriales	
Biológicos	Síntesis, fermentaciones
Químicos	Catálisis, craqueo del petróleo
Aguas calientes	Control de corrosión
Plantas nucleares	Monitorización del agua de refrigeración
Alimentos	Carbonatación, procesos de control, alimentos empaquetados
Semiconductores	Procesos de baño
Proveedores de gases	Preparación, fugas, control de mezclas
Seguridad	
Trabajo	Minas, silos, túneles, control de alcantarillado
Edificios	Calefacciones, aire acondicionado, ventiladores

Tabla 1.1 Aplicaciones de sensores de oxígeno (continuación).

Transporte	
Productos perecederos	Monitorización en contenedores
Buques	Control de explosiones y ambiente
Emisiones	Sensores en tubos de escape
Vehículos	Control de motores de explosión
Otros	
Equipos de submarinismo	Sistemas de recuperación de gas
Acuicultura	Control en piscifactorías, acuarios

Los vehículos actuales van equipados con convertidores catalíticos de tres vías (TWC) que ayudan a reducir las emisiones de CO, hidrocarburos y NOx usando catalizadores tanto de reducción como de oxidación, tales como Pt, Rh y/o Pd. Para lograr esa reducción, es necesario controlar la cantidad de combustible, tratando de mantener la relación aire/combustible lo más próxima posible al valor estequiométrico, que para motores de gasolina es de 14,7/1. Para ello, se utiliza un sensor de oxígeno (conocidos como sensores Lambda) a la salida de los gases de combustión, el cual mide la presión de oxígeno en el tubo de escape y corrige la relación combustible/aire al valor óptimo.

Existen de diversos tipos de sensores de oxígeno, pero los más habituales son los de electrolito sólido, entre los que se encuentran los de circonio¹⁶ y, en menor proporción, los de titanio¹⁷.

Los de circonio se basan en una célula galvánica en la que una capa de dióxido de circonio actúa de electrolito, operando a unos 700 °C, entre dos electrodos de platino, puestos

¹⁶ A. D. Brailsford y E. M. Logothetis, Sens. Actuators B, 52, 195 (1998).

¹⁷ M. Li y Y. Chen, Sens. Actuators B, 32, 83 (1996).

en contacto con los gases de combustión y con la atmósfera externa, respectivamente, como se ve en la Figura 1.6.

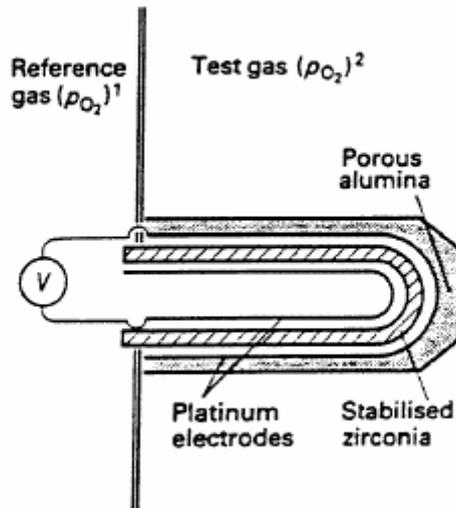
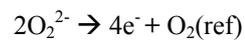


Figura 1.6. Esquema de un sensor para O_2 de ZrO_2 usado para control de combustión en automóviles.

La pila electroquímica que se forma es: pO_2 (ref), $Pt|Y_2O_3-ZrO_2|Pt$, pO_2 (test) y las reacciones semirreacciones que ocurren son las siguientes:



Operando a un valor de potencial adecuado, la intensidad de corriente originada depende de la concentración de oxígeno en los gases de combustión a través de la ecuación de Nernst:

$$E = \frac{RT}{4F} \ln \left(\frac{P_{O_2(\text{ref})}}{P_{O_2(\text{test})}} \right)$$

Para que funcione el sensor, el óxido de circonio debe permitir el movimiento del ión óxido, lo cual se consigue dopando dicho óxido con óxido de itrio (III) y calentando¹⁵ a 450 °C (Figura 1.7).

Existen diversos diseños que pretenden limitar la cantidad de oxígeno que llega al sensor al objeto de alargar su vida útil; así tenemos los de poro, los de recubrimiento poroso o los de película delgada. El sensor de circonio es un sensor estable, de duración alta y buena exactitud, aunque el platino de los electrodos puede envenenarse por plomo u otros elementos, necesita operar a temperatura alta y constante y la respuesta del sensor depende de diversos parámetros como son: composición del gas, temperatura, flujo de gas, actividad catalítica del electrodo y diseño del sensor. Por otra parte, presentan un rango de respuesta corto, el tamaño del sensor es comparativamente grande y necesita un gas de referencia. Son los más usados por las empresas automovilísticas.

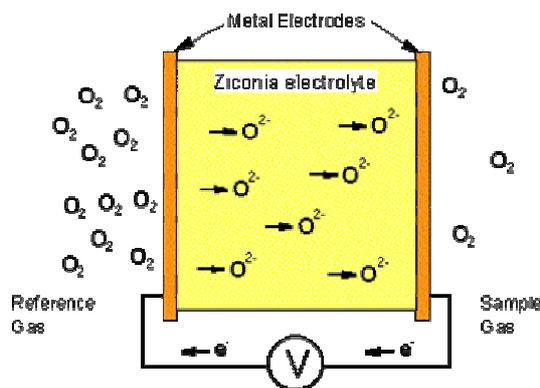


Figura 1.7. Actuación del electrolito sólido

Los sensores de dióxido de titanio no producen un valor de potencial como lo hacen los de dióxido de circonio. Por el contrario, se basan en que la resistencia eléctrica del dióxido de titanio cambia, debido a que la presencia de defectos en la estructura induce cambios de conductividad por procesos de oxidación-reducción, dependiendo de la proporción de oxígeno del medio. El cambio es especialmente significativo en las inmediaciones de relación estequiométrica aire/gasolina. Este sensor es de estructura simple, pequeño tamaño y bajo costo y no requiere la referencia al aire como necesita el de circonio. Estos sensores se

usan menos que los citados de circonio pues son menos exacto y duran menos. Son muy utilizados por las empresas automovilísticas Nissan y Toyota para algunos modelos.

Estos tipo de sensores de oxígeno para automoción son fabricados por gran número de empresas, entre ellas destacan: Robert Bosch GMBH, Stuttgart (Alemania); Enmet Corporation, AnnArbor, Michigan (USA); NGK Spark Plugs, USA; Cambridge Sensotec Ltd., St. Ives, Cambs (Inglaterra); Electrovac Ges.M.B.H., Klosterneuburg (Austria); Fujikura Ltd. (Japón) y Volvo & Saab, Estocolmo (Suecia).

Los sensores de circonio también se emplean para el control de procesos industriales en hornos, incineradoras, soldadura, quemadores de fuel, pureza de gases, etc.

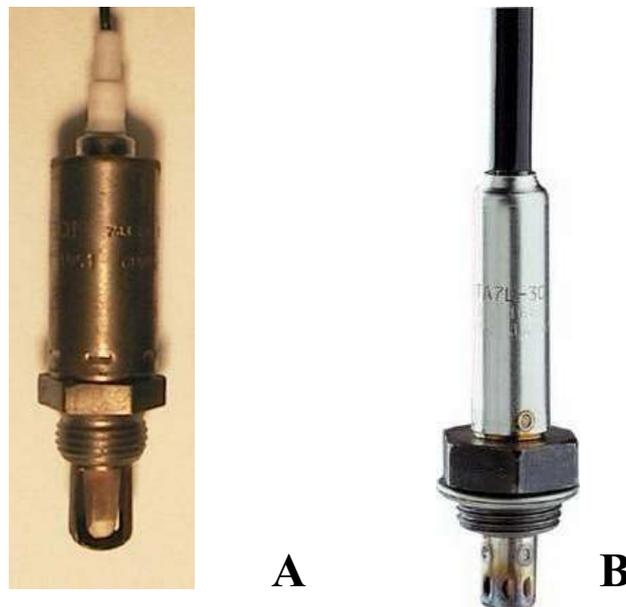


Figura 1.8. Sensores de oxígeno. A: de ZrO_2 ; B: de TiO_2 .

Los sensores para oxígeno disuelto son de gran uso e interés en diversas áreas como acuicultura, tratamiento de aguas residuales, tratamientos industriales especialmente en cal-

deras en relación con corrosión y pérdidas por transmisión de calor, así como en estudios biológicos y clínicos.

Para oxígeno disuelto se usan tanto sensores eléctricos como ópticos. Dentro de los de tipo eléctrico encontramos los galvánicos y los polarográficos. Ambos tipos de sensores usan un sistema de electrodos en el que el oxígeno disuelto reacciona en el cátodo para originar una intensidad de corriente. Si los materiales del electrodo se seleccionan de manera que la diferencia de potencial entre cátodo y ánodo sea mayor o igual a $-0,5$ V, no se requiere la aplicación de una diferencia de potencial externa y el sistema se denomina galvánico. Si se necesita aplicar un potencial externo, el sistema es polarográfico. Los sensores galvánicos son más estables y más exactos a bajos niveles de oxígeno que los polarográficos. Por otra parte, los galvánicos pueden operar durante varios meses sin reemplazar el electrolito o la membrana, lo que hace que sean más baratos de mantenimiento. Los polarográficos, por el contrario, necesitan ser recargados tras pocas semanas de uso.

El sensor de oxígeno en disolución de tipo polarográfico más conocido es el llamado electrodo de Clark¹⁸, y consisten en una membrana semipermeable, que permite el paso de oxígeno y no de especies iónicas u otros, un electrodo de trabajo hecho en un metal noble tal como oro o platino y un electrodo de referencia de plata sumergido en un electrolito básico. Cuando se aplica un voltaje de 800 mV, el oxígeno que difunde en el sensor sufre una reacción electroquímica convirtiéndose en oxhidriloiones, lo que produce un flujo neto de corriente eléctrica proporcional a la concentración de oxígeno. Las reacciones de electrodo son:

reacción en el cátodo (Pt)



reacción en el ánodo (Ag)



Este electrodo presenta diversos problemas como son: a) consumo de oxígeno formando OH^- , lo que origina que el electrolito se vuelva más alcalino; b) el recubrimiento de

¹⁸M. Carano, K.B. Holt y A.J. Bard, Anal. Chem. 75, 5071 (2003).

AgCl del electrodo de Ag que se va formando, disminuye el área de reacción y al final impide dicha reacción; c) suele presentar problemas a bajos niveles de oxígeno por el alto valor de la corriente residual y por problemas de deriva; d) la presencia de contaminantes traza influyen de forma considerable en la respuesta; e) el dióxido de carbono afecta a la respuesta y f) en el caso de usarlo para oxígeno gaseoso, interfieren los halógenos.

La instrumentación electrónica para el procesado de sensores químicos para gases se ha desarrollado básicamente a partir de sensores amperométricos como el sensor de oxígeno tipo Clark¹⁹ que acabamos de citar y de sensores de baja selectividad como los sensores de óxidos metálicos²⁰ que precisaban de sistemas auxiliares y de procesado que hacían muy difícil la fabricación de instrumentos portátiles. A pesar de ello, Dräger comercializa equipos portátiles basados en sensores electroquímicos que presentan algunos inconvenientes: largo tiempo de estabilización para medida, envenenamiento del sensor, vida corta de las baterías, que hacen que su utilización sea costosa debido a los frecuentes recambios necesarios. Estos inconvenientes aparecen en el equipo portátil desarrollado por H. Yan²¹. Otra empresa comercializa un sistema cuasi-portátil para dióxido de carbono pero con la necesidad de gran cantidad de accesorios para una medida precisa y para su calibración²². Además de lo dicho, diversas empresas comercializan sensores electroquímicos de diversa complejidad para oxígeno disuelto, entre las que se encuentran: Campbell Scientific Inc., Logan, UTA (USA); Oxigen Sensors Inc., Frazer, Pennsylvania (USA); Sensorex, California (USA); Innovative Sensors, Inc., Anaheim, California (USA); Rosemount Analytical Inc., Uniloc División, Irvine, California (USA); Qubit Systems Inc. y Kingston, Ontario (Canadá)

Un sensor miniaturizado del tipo célula de combustión se ha usado para la determinación de oxígeno en atmósfera en ensayos de vuelo, en concreto en el programa Linear Aeropike SR-71 Experiment (LASRE) y ha sido comercializado por la empresa Dryden Flight Research Center, Edwards, California (USA).

¹⁹ C.L. Clark, *Trans. Am. Soc.*, 2, 41 (1956).

²⁰ W. Göpel y K.D. Schierbaum, *Sens. Actuators B*, 26, 1 (1995).

²¹ H. Yan y J. Lu, *Field Anal.Chem.Tech.*, 1, 175 (1997).

²² Analyticon Instrument Corporation, www.analyticon.com (2005).

Los sensores ópticos de oxígeno se desarrollaron en la pasada década y presentan diversas ventajas sobre los electroquímicos, entre las que podemos destacar: pequeño tamaño, bajo precio, respuesta rápida, no consumen oxígeno, pueden realizar tanto detección remota como detección invasiva para medidas *in vivo*, no necesitan electrodo de referencia ni conexiones eléctricas, están libres de interferencias electromagnéticas, presentan inercia frente a la variación de velocidad de flujo y agitación, así como frente a presiones externas altas, no presentan sensibilidad cruzada a dióxido de carbono y sulfuro de hidrógeno, entre otros gases, no sufren contaminación en la membrana y no se envenenan con facilidad.

Dentro de este tipo, están los sensores basados en absorción de radiación láser a 510 nm y los basados en la desactivación de emisión luminiscente, fluorescencia o fosforescencia, de luminóforos. Este proceso de atenuación de luminiscencia, que es de atenuación dinámica, obedece la ecuación de Stern-Volmer, se da con gran eficacia y es un proceso que no consume oxígeno. Por otra parte, permiten el acoplamiento a fibra óptica, ofreciendo la posibilidad de miniaturización del sistema, monitorización remota y multianálisis. Este proceso se ha aplicado a diversos analitos además del ya citado oxígeno como son dióxido de azufre¹⁰, óxidos de nitrógeno¹¹, halotano, cloruros¹² y cloro¹³.

En esta Tesis Doctoral se desarrollan sensores de tipo óptico para oxígeno y dióxido de carbono basados en atenuación de luminiscencia, por ello, abordamos a continuación el estado del arte en este tipo de sensores.

4. Sensores de oxígeno basados en atenuación de luminiscencia

En los últimos años se han desarrollado gran variedad de sensores de oxígeno basados en la atenuación de luminiscencia para su empleo en estudios ambientales, como es el caso del análisis de demanda biológica de oxígeno o en cirugía, para la determinación de oxígeno en sangre *in vivo*, parámetro de gran importancia y en la que los sensores eléctricos o no ofrecen buenos resultados o no se pueden emplear. Otros usos se encuentran en el laboratorio clínico para la determinación de gases en sangre; en la industria para estudio de procesos de

combustión e incluso en otros campos^{23,24,25,26,27,28}, tal es el caso de ensayos aerodinámicos en túneles de viento y en pruebas de vuelo, mediante pinturas sensibles a presión, debido a que proporcionan datos de presión con gran resolución espacial y con gran velocidad de adquisición^{29,30,31}. En estos últimos, usando un gas de composición fija, tal como el aire, la concentración de oxígeno es linealmente proporcional a la presión del gas y la intensidad de luminiscencia es una medida de la presión parcial de oxígeno.

Los sensores basados en atenuación de fosforescencia ofrecen ventajas sobre los basados en atenuación de fluorescencia. Así, el mayor tiempo de vida de la fosforescencia aumenta considerablemente las posibilidades de choques entre las especies reactivas (luminóforo y analito). Por otra parte, la señal analítica medida es una emisión fosforescente que presenta bajo nivel de ruido, pues se ha obtenido después de cesar la radiación excitante y la débil luminiscencia de fondo. Además, en la medida de fluorescencia influyen cambios en las características de dispersión o absorción de radiación por parte de la muestra. Por ello, los sensores basados en fosforescencia presentan mayor sensibilidad. Por último, la gran separación entre estados singletes y tripletes, los altos valores de longitudes de onda de excitación y emisión, y los elevados tiempos de vida permiten el diseño de instrumentación óptica simple y de bajo precio.

Los luminóforos más utilizados suelen pertenecer a alguno de los siguientes grupos:
a) hidrocarburos aromáticos policíclicos, tales como pireno, ácido pirenobutírico, fluorante-

²³E. Singer, G.L. Duveneck, M. Ehrat y H.M. Widmer, *Sens. Actuators A*, 41, 542 (1994).

²⁴P. Hartmann, M.P.J. Leiner y M.E. Lippitsch, *Anal. Chem.*, 67, 88 (1995).

²⁵W. Xu, R. Schmidt, M. Whaley, J.N. Demas, B.A. DeGraff, E.K. Karikari y B.L. Farmer, *Anal. Chem.*, 67, 3172 (1995).

²⁶J.R. Bacon y J.N. Demas, *Anal. Chem.*, 59, 2780 (1987).

²⁷E.R. Carraway, J.N. Demas, B.A. DeGraff y J.R. Bacon, *Anal. Chem.*, 63, 332 (1991).

²⁸J.M. Vanderkooi, G. Maniara, T.J. Green y D.F. Wilson, *J. Biol. Chem.*, 262, 5476 (1987).

²⁹I. Troyanovsky, N. Sadovskii, M. Kuzmin, V. Mosharov, A. Orlov, V. Radchenko y S. Phonov, *Sens. Actuators B*, 11, 201 (1993).

³⁰M.J. Morris, J.F. Donovan, J.T. Kegelman, S.D. Schwab, R.L. Levy y R.C. Crites, *AIAAJ*, 31, 419 (1993).

³¹B.G. McLachlan y J.H. Bell, *Exp. Therm. Fluid. Sci.*, 10, 470 (1995).

no, difenilantraceno u otros. Son atenuadores eficientes, con tiempos de vida (τ) del orden de 200 ns, aunque presentan el inconveniente de absorber radiación solo en la región ultravioleta, lo que supone mayor problema para el diseño de instrumentación. Además, su corto tiempo de vida hace que la instrumentación sea más compleja y cara; b) Colorantes que absorben a longitudes de onda largas, así tripaflavina, benzoflavina, safranina, porfirinas o eritrosina (τ : 250 μ s). Presentan una absorción y emisión favorables aunque baja fotoestabilidad; c) complejos organometálicos de los que destacan varios grupos: quelatos de rutenio con ligandos tipo bipyridilo (τ : 0,1 – 7 μ s), quelatos de lantánidos (τ : 1 μ s – 2 ms) y metaloporfirinas (τ : 20 μ s – 1 ms). Aunque presentan diferentes mecanismos de excitación, estos complejos suelen mostrar absorción en el visible, un gran desplazamiento Stokes (150-200 nm) y largos tiempos de vida. De manera general, en estos sensores ópticos el luminóforo se incorpora a una membrana permeable al gas y se mide la luminiscencia que muestra esa membrana. El material de membrana tiene una gran importancia, determinando tanto la permeabilidad del oxígeno como el tiempo de vida del estado excitado del luminóforo^{32;33;15}.

Se han utilizado diversas estrategias para el desarrollo de sensores de atenuación de luminiscencia; principalmente, los basados en medidas de intensidad y los de tiempo de vida (tiempo resuelto).

Los sensores basados en medida de la intensidad de luminiscencia utilizan instrumentación convencional como pueden ser espectrómetros de luminiscencia provistos de: 1) célula de flujo en la que se encuentra el luminóforo dispuesto en una membrana o en un sólido particulado³⁴; 2) sistema de fibra óptica en cuyo extremo distal se encuentra dispuesto el luminóforo^{35;36}. Esta instrumentación es de aplicabilidad limitada para el desarrollo de sensores por tamaño y precio. Alternativamente, se ha desarrollado instrumentación portátil de bajo costo basada en medidas de intensidad que usa electrónica de estado sólido (LED, foto-

³² K.A. Kneas, W. Xu, J.N. Demas y B.A. DeGraff, *App.Spec.*, 51, 1346 (1997).

³³ R.E. Slovacek y K.J. Sullivan, *US Patent* 6,074,607 (2000).

³⁴ A. Sanz-Medel, R. Pereiro-García, M.E. Diaz-Garcia y Y.M. Liu, *EP* 065355 (1994).

³⁵ T.B. Hirschfeld, *US Patent* 4,577,109 (1986).

³⁶ J. Kane, *US Patent* 4,785,814 (1988).

diodos y componentes analógicos y digitales) junto con sonda de fibra óptica, especialmente para medidas de oxígeno disuelto³⁷ o con la membrana insertada en el circuito para medida en gases^{38;39}. Se han patentado diversos sistemas basados en este principio para la determinación de oxígeno tanto en gases como en disolución acuosa^{40;41;42}.

La atenuación de luminiscencia tiene lugar de acuerdo con la ecuación de Stern-Volmer, siendo necesario medir la disminución de intensidad de emisión I respecto a la intensidad en ausencia de oxígeno I_0 . Es habitual observar curvaturas en las gráficas de Stern-Volmer que se pueden justificar considerando que existen diferentes tipos de posiciones de atenuación en la membrana, pues el polímero matriz no es un medio estructuralmente homogéneo, lo que da como resultado que el luminóforo se inmoviliza heterogéneamente. Para justificar los datos experimentales se usan diferentes modelos, así el de dos posiciones de atenuación o el de multiposición^{43;44}.

La medida de esta intensidad en ausencia de oxígeno se puede obtener de diversas formas; así Stevens⁴⁵ la obtiene usando dos membranas conteniendo el mismo luminóforo, pireno, permeable a oxígeno la una e impermeable la otra. Lubbers⁴¹ y Peterson⁴⁶ proponen estimar I_0 a partir de la propia radiación de excitación dispersada. Este sistema presenta una limitación intrínseca pues no tiene en cuenta la posible fotodegradación del luminóforo. Una segunda forma de medir la concentración de oxígeno es medir la velocidad de decaimiento, para lo que se mide la intensidad a diferentes retardos. En el caso de un decaimiento

³⁷ W. Trettnak, W. Gruber, F. Reiningner y I. Klimant, *Sens. Actuators B*, 29, 219 (1995).

³⁸ D. Xiao, Y. Mo y M.M.F. Choi, *Meas. Sci. Technol.*, 14, 862 (2003).

³⁹ D.B. Papkovsky, G.V. Ponomarev, V. Ogurtsov y A. Dvornikov, *Biochem. Med. Sens.*, 54, 2085 (1993).

⁴⁰ C.C. Stanley y J.L. Kropp, US Patent 3,725,658 (1971).

⁴¹ D.W. Lubbers y N. Opitz, US Patent 4,003,707 (1977).

⁴² J.R. Bacon y J.N. Demas, US Patent 5,030,420 (1991).

⁴³ J.N. Demas y B.A. DeGraff, *Sens. Actuators B*, 11, 35 (1993).

⁴⁴ A. Mills, *Sens. Actuators B*, 51, 60 (1998).

⁴⁵ B. Stevens, US Patent 3,612,866 (1971).

⁴⁶ J.I. Peterson y R.V. Fitzgerald, US Patent 4,476,870 (1984).

exponencial simple solo serán necesarios dos puntos, mientras que en el caso de que no lo sea, serán necesarios ajustes a exponenciales dobles o multiexponenciales, lo que complica el establecimiento de las funciones de calibrado⁴⁷. Esta forma de medida presenta la ventaja de ser menos dependiente de la configuración del sensor o variaciones en el camino óptico.

Los métodos basados en medidas de intensidad presentan una serie de inconvenientes relacionados con la calibración y con la estabilidad a largo plazo. Ello es debido a que la intensidad de luminiscencia puede venir afectada por cambios en la intensidad de la fuente luminosa, por variación en la eficiencia de transmisión de la óptica, por fotooxidación o lixiviación del luminóforo, por fluorescencia intrínseca de la muestra o bien por otras características ópticas de la misma. Uno de los principales problemas de los colorantes habitualmente usados es su fotolabilidad, pues la radiación electromagnética induce reacciones fotoquímicas que conducen a la descomposición del indicador, reduciendo la vida útil del sensor. La fotodescomposición origina una disminución concomitante de la señal, la fotoderiva.

Las fluctuaciones de intensidad debidas a la fuente y a la transmisión se pueden corregir utilizando configuraciones de doble haz. Los problemas de fotodescomposición, que dan lugar a deriva, se pueden evitar usando luminóforos más estables y minimizando la exposición a la luz, bien reduciendo la intensidad luminosa de la fuente, la duración de cada ciclo de medida o bien empleando señales relativas.

La introducción ya antes comentada de componentes fotónicos de altas prestaciones (disponibilidad de muchas longitudes de onda, alta intensidad luminosa) ha permitido en los últimos años usar los sensores con respuesta luminiscente dentro de equipos de menor tamaño⁴⁸. Tanto el desarrollo tecnológico de nuevos diodos emisores de luz⁴⁹ como el de elementos fotodetectores con un consumo de potencia reducido abre un nuevo campo a la miniaturización de esta clase de sistemas de medida. Los primeros resultados en esta línea

⁴⁷ G.E. Khalil, M.P. Gouterman y E. Green, US Patent 4,810,655 (1989).

⁴⁸ P.K. Dasgupta, I.Y. Eom, K.J. Morris y J. Li, *Anal. Chim. Acta*, 500, 337 (2003).

⁴⁹ Z.Z. Chen, J. Zhao, Z.X. Qin, X.D. Hu, T.J. Yu, Y.Z. Tong, Z.J. Yang, X.Y. Zhou, G.Q. Yao, B. Zhang y G.Y. Zhang, *Phys. Stat. Sol. B*, 241, 2664 (2004).

son mayoritariamente para la detección de gases en disolución, sobre todo oxígeno, pero con equipos para sobremesa y no realmente portátiles⁵⁰ junto con algunos equipos comerciales. En concreto, se han desarrollado algunos instrumentos disponibles comercialmente para la medida de oxígeno basados en la medida de intensidad luminiscente como es el caso de Ocean Optics⁵¹ y Fluorometrix⁵², aunque presentan el inconveniente de su alto costo (1700-2500 \$), tamaño relativamente grande, sistema sensor complejo y necesidad de un ordenador para el control y adquisición de datos. Sólo recientemente se ha publicado un sistema portátil de medida de oxígeno disuelto de reducidas dimensiones³⁸ basado en microcontrolador, aunque presentando un procedimiento tedioso de calibrado y sin corrección térmica.

Los métodos de tiempo resuelto se han utilizado para tratar de evitar los problemas que presentan las medidas de intensidad, ya que en una primera aproximación, el tiempo de vida es independiente tanto de la intensidad de radiación de la fuente (fluctuaciones, envejecimiento) como de la radiación ambiente y de la fotooxidación o lixiviación del luminóforo, lo que reduce los requerimientos de los componentes ópticos de la instrumentación y precisa una recalibración menos frecuente que los sistemas basados en intensidad.

Para las medidas de tiempo resuelto, los dos tipos de métodos mas usados son los que trabajan en el dominio del tiempo y en el dominio de la frecuencia. El tiempo de decaimiento de luminiscencia se puede medir directamente usando una fuente de luz pulsada y detectores de alta velocidad; así es frecuente el empleo combinado de láser, fotomultiplicador y osciloscopio, lo que da lugar a instrumentación de gran tamaño y alto precio, que es poco útil para muchos propósitos. Son mucho más interesantes y utilizados los métodos de modulación de fase dentro de los del dominio de la frecuencia. Para ello, se emplea en vez de una fuente pulsada, una fuente de radiación modulada, habitualmente de forma sinusoidal. Como consecuencia, la intensidad de emisión luminiscente variará sinusoidalmente a la misma frecuencia que la señal de excitación, pero con un desplazamiento de fase relacionado con el tiempo de

⁵⁰ A.N. Watkins, B.R. Wenner, J.D. Jordan, W. Xu, J.N. Demas y F.V. Bright, *Appl. Spec.*, 52, 750 (1998).

⁵¹ Ocean Optics, <http://www.oceanoptics.com/products/foxytheory.asp#how> (2001).

⁵² Fluorometrix, <http://www.fluorometrics.com/Default.asp> (2004).

relajación. La emisión modulada se mide con un detector convencional (fotodiodo o fotomultiplicador) y se analiza con un detector sensible a fase, así un amplificador lock-in.

Los métodos de modulación de fase se pueden llevar a cabo de forma univariante o multivariante. En los primeros, se origina el parámetro dependiente de la concentración de atenuador cuando se trata la muestra con la señal de excitación, así podemos medir: a) desplazamiento de fase a frecuencia de modulación constante; b) factor de demodulación a frecuencia de modulación constante; c) frecuencia de modulación a desplazamiento de fase constante ó d) frecuencia de modulación a factor de demodulación constante.

Las medidas de desplazamiento de fase han sido las más utilizadas para el diseño de sensores de oxígeno, tanto basados en la atenuación de fluorescencia ($\tau \sim 5 \mu\text{s}$) usando LED como fuente luminosa y fotomultiplicador como detector^{53;54}, como en atenuación de fosforescencia. Aquí, el empleo de luminóforos con mayores tiempos de vida (10-100 μs) ha permitido disminuir las frecuencias de modulación necesarias y simplificar el sistema electrónico (uso de LED y fotodiodos)^{55;56;57;58}. También se ha propuesto utilizar como parámetro analítico la frecuencia de modulación de forma que el desplazamiento de fase se mantenga constante a 45°⁵⁹. Ha sido desarrollado un sistema comercial para la determinación de oxígeno basado en medidas de frecuencia de modulación^{60;61}.

⁵³ M.E. Lippitsch, J. Pusterhofer, M.J.P. Leiner y O.S. Wolfbeis, *Anal. Chim. Acta*, 205, 1 (1988).

⁵⁴ G. Holst, T. Köster, E. Voges y D.W. Lübbers, *Sens. Actuators B*, 29, 231 (1995).

⁵⁵ W. Trettnak, C. Kolle, F. Reninger, C. Dolezal y P. O'Leary, *Sens. Actuators B*, 35-36, 506 (1996.)

⁵⁶ C. McDonagh, C. Kolle, A.K. McEvoy, D.L. Dowling, A.A. Cafolla, S.J. Cullen y B.D. MacCraith, *Sens. Actuators B*, 74, 124 (2001).

⁵⁷ A.E. Colvin, T.E. Phillips, J.A. Miragliotta, R.B. Givens y C.B. Barger, *John Hopkins APL Tech. Digest* 17, 377 (1996).

⁵⁸ A.E. Colvin, US Patent 5,910,661 (1999).

⁵⁹ J.N. Dukes, W.F. jr Carlsen y R.J. Pittaro, US Patent 4,716,363 (1987).

⁶⁰ J.D.S. Danielson, US Patent 6,157,037 (2000).

⁶¹ PhotoSense LLC, Optical Oxygen Sensor, <http://www.photosense.com/products.html>. (2004).

El empleo de técnicas de demodulación de fase presenta el problema de la gran influencia que ejerce la radiación de fondo, el cual se ha obviado midiendo la amplitud de la señal a dos frecuencias de modulación diferentes⁶².

En los sistemas multivariantes, la señal de excitación contiene un amplio rango de frecuencias y es el desplazamiento de fase o bien el factor de demodulación a diversas frecuencias lo que se emplea para la determinación del analito, previa deconvolución de la señal obtenida^{63;64}. Este tipo de sensores multivariantes presentan el inconveniente de la mayor complejidad de los sistemas de excitación y detección.

Al objeto de evitar los problemas que suelen presentar los sensores de atenuación de luminiscencia debido a fluctuaciones o bien deriva de la señal por cambios en la intensidad de la fuente luminosa, variación en la eficiencia de transmisión de la óptica, fotooxidación o lixiviación del luminóforo, fluorescencia intrínseca de la muestra o bien por otras características ópticas de la misma, se han usado diversas estrategias. Uno de los problemas más importantes lo origina la fotooxidación del luminóforo, pues afecta a las intensidades de emisión ya que los parámetros de tiempo de vida no se modifican al no emitir radiación los fotoproductos y no inducirse cambios en el microambiente del luminóforo.

Una de las soluciones utilizadas consiste en el empleo de señales relativas en vez de absolutas, para lo cual se emplea una molécula de referencia. La molécula de referencia puede ser el propio luminóforo, pues algunas moléculas poseen bandas de emisión que muestran diferente, poca o ninguna atenuación por oxígeno, con lo que el cociente de señales es escasamente dependiente de la fotodescomposición de la molécula. Así, se han utilizado con luminóforos tipo hidrocarburo aromático policíclico^{65;66;67}. La limitación que presenta este sistema es que no sirve para otros luminóforos de amplio uso como son los complejos orga-

⁶² D. Andrzejewski, I. Klimant y H. Podbielska, *Sens. Actuators B*, 84, 160 (2002).

⁶³ R.J. Alcalá, EP 442276 (1991).

⁶⁴ J.G. Bentsen, US Patent 5,518,694 (1996).

⁶⁵ G. Allen, H.K. Hui y A. Gottlieb, US Patent 5,094,959 (2004).

⁶⁶ S.M. Klainer, K. Goswami, US Patent 5,094,958 (1992).

⁶⁷ E.D. Lee, T.C. Werner y W.R. Seitz, *Anal.Chem.*, 59, 279 (1987).

metálicos de transición que no muestran ninguna banda que sea poco atenuable por oxígeno. Una alternativa propuesta por Kostov y Rao⁶⁸ es emplear sustancias que tienen la propiedad de emitir simultáneamente fluorescencia y fosforescencia y aprovechan que la atenuación del estado triplete depende en gran medida de la concentración de oxígeno, mientras que la intensidad singlete apenas se ve afectada. El sistema de cociente de ambas señales lo usan tanto con intensidades como con tiempos de vida, usando técnicas en el dominio de la frecuencia, y también con medidas de polarización de fluorescencia.

Un segundo grupo de sistemas propone emplear moléculas de referencia distintas de las indicadoras (luminóforo), que cumplan la condición de ser insensibles al ambiente y que fotodescompongan a la misma velocidad que el luminóforo, aunque esto último es lo más difícil y supone una de las limitaciones de estos sistemas. Así, Kane y colaboradores⁶⁹ proponen usar complejos de rutenio-fenantrolina como indicador luminóforo y derivados del perileno como indicador de referencia ya que cumplen la condición de que la constante de Stern-Volmer, K_{SV} , de este último es $\leq 5\%$ de la del luminóforo y con máximos de emisión diferenciados. Hauenstein y col.⁷⁰ emplean cociente de señales procedentes de una membrana conteniendo dos complejos de lantánidos con bases de Schiff o β -dicetonas, de los que uno muestra fosforescencia atenuable por oxígeno y el otro no, planteamiento muy similar al usado por Nestor y col.⁷¹. Xu y col.⁷² utilizan un esquema parecido encapsulando en nanopartículas un luminóforo sensible a oxígeno, un complejo de rutenio-fenantrolina, y un colorante fluorescente insensible, Oregon Green 488. También se han inmovilizado conjuntamente parejas de indicadores fluorescente (referencia) y fosforescente⁷². El problema que presentan estos procedimientos es que suele haber variaciones en la velocidad de fotodescomposición de ambas moléculas, lo que los hace poco útiles. Cuando la proximidad de las

⁶⁸ Y. Kostov y G. Rao, *Sens. Actuators B*, 90, 139 (2003).

⁶⁹ J. Kane, R. Martin y A. Perkovich, US Patent 5,728,422 (1998).

⁷⁰ B.L. Hauenstein, R. Picerno, H.G. Brittain y J.R. Nestor, US Patent 4,861,727 (1989).

⁷¹ J.R. Nestor, J.D. Schiff y B.H. Priest, US Patent 4,900,933 (1990).

⁷² H. Xu, J.W. Aylott, R. Kopelman, T.J. Miller y M.A. Philbert, *Anal.Chem.*, 73, 4124 (2001).

longitudes de onda de excitación y emisión supone un problema, se ha propuesto el empleo de mezclas de indicadores capaces de transferir energía de uno a otro⁷³.

Otra estrategia usada para reducir el problema de la fotoderiva debida a procesos de fotooxidación del luminóforo, es el empleo de aditivos estabilizantes. El producto más abundante originado en el proceso de atenuación de luminiscencia por oxígeno es el oxígeno singlete, especie muy reactiva que puede provocar la fotooxidación de luminóforos. El empleo de diferentes procedimientos para eliminar, por reacción química, o desactivar, por atenuación física, el oxígeno singlete es un procedimiento muy efectivo para proteger polímeros y luminóforos de fotooxidación. Un sistema utilizado es la adición de aminas terciarias⁷⁴ y cíclicas⁷⁵.

No obstante todo lo dicho, la fotoderiva no es el único problema que se presenta en estos sensores, pues el frecuente empleo de fibra óptica origina como antes se ha indicado problemas de pérdida de señal. Se han usado diversos procedimientos para compensar éstas pérdidas. Lo y col.⁷⁶ emplean una señal modulada que tras excitar la fluorescencia regresa al sistema y es comparada con la señal fluorescente originada. De esta manera, se compensan posibles pérdidas y con el uso de técnicas de modulación-demodulación se elimina la luz ambiente.

Es bien conocido que la temperatura afecta a la intensidad de luminiscencia y al tiempo de vida del estado excitado. Tanto la frecuencia de colisiones entre el analito y el luminóforo como el coeficiente de difusión del analito están influenciados por la temperatura; cuanto mayor sea el número de colisiones mayor será la desactivación no radiante y, por tanto, menor será la luminiscencia emitida por el luminóforo⁷⁷. En consecuencia, la variación de temperatura provoca la modificación de la pendiente de la función de calibrado. Se han em-

⁷³ C.C. Nagel, J.G. Bentsen, M. Yafuso, A.R. Katritzky, J.L. Dektar y C.A. Kipke, US Patent 5,498,549 (1996).

⁷⁴ R.S. Atkinson, D.R.G. Brimage, R.S. Davidson y E. Gray, J.C.S. Perkin Trans., 960 (1973).

⁷⁵ P. Hartmann y M.J.P. Leiner, US Patent 6,254,829 (2001).

⁷⁶ K.P. Lo, US Patent 6,207,961 (2001).

⁷⁷ W. Trettnak, Optical Sensors Based on Fluorescence Quenching, in O.S. Wolfbeis, ed., Fluorescence Spectroscopy - New Methods and Applications, Springer, Berlin, 1993, p. 79.

pleado diversas soluciones para compensar el efecto de la temperatura. Frecuentemente se han utilizado instrumentos termostatados tanto de sobremesa como portátiles^{37;41}. En diversas ocasiones se ha estudiado la dependencia de la temperatura, así los estudios realizados por Demas y col.^{43;78}, aunque estos autores no indican como es posible corregir dicha influencia. Se han usado dos tipos de soluciones: a) mediante medida óptica de temperatura usando emisiones de luminiscencia insensibles al oxígeno, pero altamente dependientes de la temperatura, bien de complejos quelatos o de materiales inorgánicos⁷⁹; b) mediante medida eléctrica de la temperatura y modelado de la dependencia de ésta para establecer su corrección. Así, Colvin⁵⁷ establece los coeficientes de variación entre 23 y 33°C y propone la corrección aplicando dichos coeficientes. En otra ocasión⁸⁰, se establece y modela la dependencia con la temperatura en un intervalo más amplio (0-75°C) sugiriendo que cuando se obedece la ecuación de Stern-Volmer tanto la intensidad inicial como la constante de Stern-Volmer muestran una dependencia cuadrática con la temperatura, lo que obliga a conocer 6 constantes de proporcionalidad. En el caso de que la relación de Stern-Volmer presente curvatura y se use una ecuación de segundo orden, tanto la intensidad inicial como la primera y segunda constante dependerán de la temperatura de forma cuadrática, lo que obliga a establecer y emplear 9 constantes de proporcionalidad.

Es de gran interés el desarrollo de instrumentación portátil y autónoma que permita la calibración con un solo punto y corrija la influencia de la temperatura.

Las curvas de calibración representan la expresión matemática, o la tabla de valores, que permite calcular la concentración de analito a partir de la información detectada por la zona sensora y la temperatura (ésta última en los casos de sistemas con corrección térmica). Típicamente, se requieren los procedimientos de calibración del sensor en dos puntos y la recalibración. La calibración inicial se realiza tras el montaje del sensor o inmediatamente de su primer uso. La recalibración se precisa habitualmente durante la vida útil del sensor para mantener el grado de exactitud requerido en las medidas. La calibración habitual en sensores

⁷⁸ J.N. Demas, y B.A. DeGraff, Proc. SPIE, 1796, 71 (1993)

⁷⁹ I. Klimant y G. Holst, US Patent 6,303,386 (2001).

⁸⁰ FOXY Fiber Optic Oxygen Sensor System Manual, Ocean Optics (2002).

de atenuación utiliza la ecuación de Stern-Volmer y precisa de la determinación de la señal, intensidad o tiempos de vida, tanto en ausencia como en presencia de diferentes concentraciones conocidas de analito. Es frecuente el empleo de calibraciones con dos o tres puntos, de los que uno de ellos es en ausencia de analito⁴⁶. Se han utilizado diversos procedimientos para lograr la calibración con un punto, tanto usando medidas de tiempos de vida⁶⁴ como de intensidad; así Choi y Xiao⁸¹ proponen una modificación de la ecuación de Stern-Volmer que permite la calibración con un punto al no ser esencial el valor de I_0 . Sin embargo, todos estos sistemas operan a temperatura constante y lo habitual, salvo para aplicaciones concretas, como la medida de oxígeno en sangre *in vivo*, es que pueda variar la temperatura de la muestra.

La calibración en temperatura que es necesaria para evaluar la respuesta al ensayar distintos compuestos luminiscentes no es deseable cuando, una vez caracterizado un determinado sensor y construida su curva de calibración, se utiliza dentro de un sistema de medida. Por tanto, un instrumento de medida que permita la recalibración más sencilla posible, en un solo punto, sería muy deseable.

5. Sensores de dióxido de carbono

El dióxido de carbono es uno de los gases minoritario en la atmósfera (0,03%) aunque juega un papel de gran importancia en los procesos vitales de plantas y animales, tales como fotosíntesis y respiración. Debido principalmente a las actividades industriales humanas, la cantidad de CO₂ liberada a la atmósfera ha estado aumentando considerablemente durante los últimos 150 años. Como resultado, ha excedido la cantidad absorbible por la biomasa, los océanos y otros sumideros, por lo que ha habido un aumento en su concentración en la atmósfera de unas 280 mg/L en 1850 a 364 mg/L en 1998. Esto ha supuesto un considerable aumento del proceso conocido como efecto invernadero, ya citado en las primeras páginas de esta Introducción.

Por otra parte, el dióxido de carbono juega un papel esencial en la respiración celular y en la regulación del pH fisiológico, por lo que la monitorización de CO₂ en pacientes se

⁸¹ M.M.F. Choi y D. Xiao, *Analyst*, 124, 695 (1999).

realiza de manera rutinaria en hospitales y especialmente en las unidades de cuidados intensivos. Por las mismas razones anteriores es de gran importancia en muchos procesos industriales bioquímicos y microbiológicos, como pueden ser los procesos de fermentación donde su control es crítico para obtener altos rendimientos y mínima formación de subproductos.

Por todo ello, los sensores de dióxido de carbono son de gran importancia tanto en procesos fisiológicos como industriales, así: a) en procesos de combustión, para el control de emisiones de vehículos o para la protección automática contra incendios; b) en investigaciones biológicas y médicas, el dióxido de carbono es uno de los parámetros clave para el conocimiento de la homeostasis de seres vivos y para determinar el estado fisiológico de pacientes críticos, como niveles de exhalación bajo anestesia general y durante terapias de ventilación de pacientes en procesos clínicos; c) en la determinación de la calidad ambiental del aire y en la ventilación de recintos cerrados; y d) en numerosos procesos industriales de control.

La determinación habitual de CO₂, especialmente en disolución, en la industria, medicina y aplicaciones ambientales se ha llevado a cabo tradicionalmente mediante el electrodo de Severinghaus⁸². Se trata de un electrodo de vidrio sensible a pH recubierto con una membrana de PTFE o silicona que lo aísla del exterior y que es impermeable a iones y permeable a CO₂, que detecta cambios en el pH de una disolución tampón interna de hidrógenocarbonato causados por ese gas. Tiene una serie de inconvenientes como interferencias por gases ácidos y básicos, tiempos de respuesta alto y efectos de presión osmótica causada por las variables características de salinidad de las muestras.

5.1. Tipos de sensores ópticos para dióxido de carbono.

Los sensores ópticos para CO₂ basados en propiedades intrínsecas más usados son los de infrarrojos. El CO₂ puede ser medido por espectrofotometría infrarroja^{83;84}, pues presenta una intensa banda de absorción extendida desde 4,2 a 4,4 μm.

⁸² A. Severinghaus y B. Freeman, *J. Appl. Physiol.*, 13, 515 (1958).

⁸³ O.S. Wolfbeis, *Fiber Optical Sensors and Biosensors*, CRC Press, Ann Arbor, 1991.

Estos dispositivos usan fuentes de radiación infrarroja y en ellos se compara la cantidad de luz emitida por la fuente con la cantidad de luz que llega al detector. Para ello, utilizan filtros de paso de banda elegidos de manera que sólo dejen pasar radiación de determinada frecuencia, evitando de este modo las bandas de absorción debidas a otros gases, siendo posible integrar todo estos elementos en instrumentación de pequeño tamaño. La absorción infrarroja esta limitada en su aplicación a disoluciones acuosas debido a la intensa absorción intrínseca del agua y a las largas longitudes de onda requeridas.



Figura 1.9. Termopila micromecanizada Bosch para detección IR de CO₂.

Figura 1.10. Analizador IR 2820 para CO₂ de Bacharach.

⁸⁴ H. Saari, R. Mannila, J. Antila, M. Blomberg, O. Rusanen, J. Tenhunen, L. Wolf y B. Harnisch, Preparing for the Future 10, 4 (2000).

Como inconvenientes adicionales cabe citar los largos caminos ópticos necesitados, el precio relativamente alto de la instrumentación y su falta de estabilidad mecánica. No obstante, este tipo de sensores de infrarrojos son muy usados para CO₂ y son fabricados por un gran número de empresas entre las que podemos citar ControlDepot, Manning System y Status-Scientific Control, entre otras. Algunas empresas han desarrollado soluciones para los problemas que presentan los sensores IR como la termopila con detección IR de la empresa Robert Bosch GmbH, para sistemas de aire acondicionado de automóviles y caracterizada por su pequeño tamaño, robustez, sensibilidad e impermeabilidad (Figura 1.9). También se puede citar el analizador IR portátil desarrollado por la empresa Bacharach que opera entre el 0,1 y el 60% de CO₂ (Figura 1.10).

En general, la determinación de CO₂ mediante sensores ópticos extrínsecos es difícil debido a que es una molécula relativamente inerte. No se conocen datos de que un compuesto fluorescente sea sensible directamente a CO₂, en contraste con la gran variedad de cationes, aniones y gases que sí son capaces de modificar directamente las propiedades de distintos luminóforos. El CO₂ no actúa como atenuador colisional de fluorescencia y no hay complejos quelatos conocidos para esta molécula. Debido a estas dificultades para la determinación óptica directa de CO₂, la mayoría de los sensores de tipo óptico cuantifican este indirectamente, a partir del cambio de pH producido en una disolución tampón, al igual que el electrodo de Severinghaus. Una de las aplicaciones más interesantes de este tipo de sensores para CO₂ ha sido su determinación en sangre^{85;86;87}.

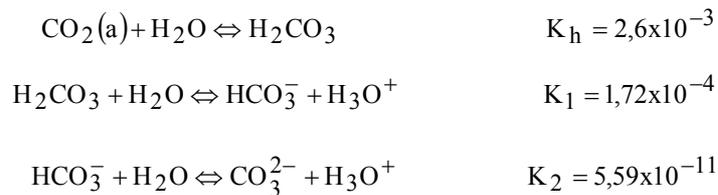
Esta detección de CO₂ se basa en el carácter ácido que presenta al disolverse en agua y reaccionar en la forma esquematizada en los siguientes equilibrios:



⁸⁵ J.L. Gehrich, D.W. Lubbers, N. Opitz, D.R. Hansmann, W.W. Miller, J.K. Tusa y M. Yafuso, IEEE Trans. Bio-Med. Eng., 33, 117 (1986).

⁸⁶ D.W. Lubbers y N. Opitz, Zeitsch. Natur. C, 30c, 532 (1975).

⁸⁷ W.W. Miller, M. Yafuso, C.F. Yan, H.K. Hui y S. Arick, Clin.Chem., 33, 1538 (1987).



La modificación de pH que origina la presencia de CO_2 se pone de manifiesto mediante un indicador ácido base que cambia su color o su emisión luminiscente al variar este. Se han utilizado diversas estrategias para la preparación de membranas sensibles a CO_2 que contienen el indicador ácido-base, éstas son: a) sensores de disolución recubierta; b) sensores de disolución dispersa y 3) sensores de membrana homogénea.

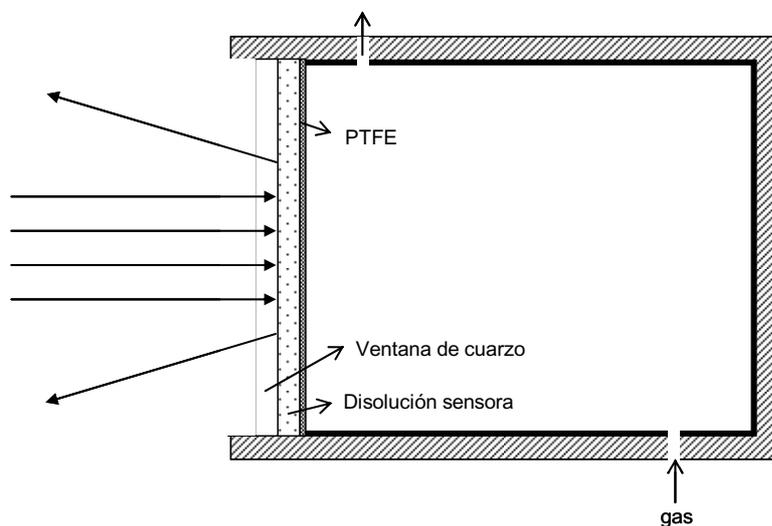


Figura 1.11. Esquema del sensor de CO_2 de disolución recubierta de Lubbers y Opitz.

Los sensores de disolución recubierta fueron los primeros que se prepararon y consistían en una disolución acuosa del indicador ácido-base en una disolución de hidrógenocarbonato, denominada disolución tampón interna, aislada del exterior mediante una membrana permeable a CO_2 e impermeable a especies iónicas. De este modo, el gas podía entrar, modi-

ficar el pH del tampón interno y, por tanto, la absorbancia o fluorescencia del indicador. Como vemos, en muchos aspectos, son similares al electrodo de Severinghaus antes citado. La razón de emplear una membrana de recubrimiento en el caso de sensores para CO₂ en gases es minimizar la pérdida de agua por evaporación, lo que impediría el funcionamiento del sensor.

Uno de los indicadores fluorescentes usados ha sido la β -metil umbiliferona^{86,88} disuelta en hidrógenocarbonato 5 mM con un 1% de agarosa para mejorar la estabilidad mecánica, todo ello separado de la disolución o gas mediante una membrana de PTFE (Figura 1.11). Este diseño presenta el inconveniente de un tamaño excesivamente grande lo que impide su uso para aplicaciones *in vivo*, por ello, ha sido mucho más usados los diseños basados en fibra óptica. Así, un sensor similar, aunque colorimétrico en este caso, fue propuesto usando rojo fenol como indicador en disolución de hidrógenocarbonato situado en el extremo de una fibra óptica y recubierto con una membrana de silicona⁸⁹.

A partir de este primer sensor de Lubbers y Opitz, se desarrollaron diferentes variantes tanto usando sensores de flujo como sensores de sonda con fibra óptica. Brevemente: a) uso de una disolución de rojo fenol en una disolución de hidrógenocarbonato que circula por un tubo de silicona permeable a gases situado en un recipiente donde se hace llegar la sangre a analizar mediante una bomba peristáltica⁹⁰; b) incorporar la disolución de hidrógenocarbonato en cápsulas de poliacrilamida de 150-250 nm⁹¹; c) Entrapamiento de la disolución en una membrana; así se ha hecho con una disolución del indicador ácido 8-hidroxi-1,3,6-pirenotrisulfónico en tampón hidrógenocarbonato en una membrana de PTFE expandido (Gore-Tex™)⁹²; d) Adsorción de esa misma disolución anterior en gránulos de celulosa, los cuales a su vez se cohesionan mediante un hidrogel con el que se forma la membrana⁹³; e)

⁸⁸ D.W. Lubbers y N. Opitz, *Adv. Exp. Med. Biol.*, 75, 65 (1976).

⁸⁹ G.G. Vurek, P.J. Feustel y J.W. Severinghaus, *Ann. Biomed. Eng.*, 11, 499 (1983).

⁹⁰ C.G. Cooney y B.C. Towe, *Biosensors Bioelectron.*, 12, 11 (1997).

⁹¹ D.W. Lubbers y N. Opitz, *Anal. Chem. Symp. Ser.*, 17, 609 (1983).

⁹² M. Uttamlal y D.R. Walt, *Bio. Technology*, 13, 597 (1995).

⁹³ O.S. Wolfbeis, L.J. Weis, M.J.P. Leiner y W.E. Ziegler, *Anal. Chem.*, 60, 2028 (1988).

Retención del indicador (ácido 8-hidroxi-1,3,6-pirenotrisulfónico) en una membrana de cambio aniónico saturada de tampón⁹⁴; f) Inmovilización covalente del indicador en poli hidroxietil metacrilato el cual se sitúa en el extremo de una fibra óptica y se cubre con una membrana de permeable a gases, después de haber saturado la membrana indicadora con hidrógenocarbonato. Se ha usado como indicador acrilofluoresceína⁹⁵ y también fluoresceína y el citado ácido 8-hidroxi-1,3,6-pirenotrisulfónico⁹⁶; g) Inmovilización del indicador (diclorofluoresceína) por adsorción en una microesfera de tamaño de poro controlado en presencia de LiNO_3 para mantener un nivel constante de humedad⁹⁷. La microesfera se fija en el extremo de una fibra óptica como se ve en la Figura 1.12.

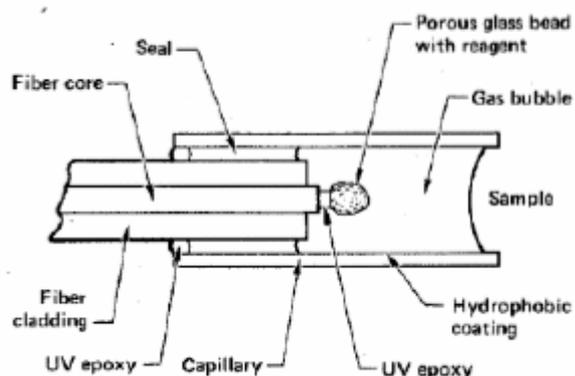


Figura 1.12. Sensor de CO_2 basado en una microesfera de vidrio.

Un segundo tipo de sensores son de disolución dispersa y pretenden desarrollar una única membrana que cumpla la doble función de ser permeable a CO_2 y responder a variaciones de pH. Esto se ha realizado a través de la dispersión de la disolución acuosa del indi-

⁹⁴ Z. Zhujun y R. Seitz, *Anal. Chim. Acta*, 160, 305 (1984).

⁹⁵ J.A. Ferguson, B.G. Healey, K.S. Bronk, S.M. Barnard y D.R. Walt, *Anal. Chim. Acta*, 340, 123 (1997).

⁹⁶ C. Munkholm, D.R. Walt y F.P. Milanovich, *Talanta* 35, 109 (1988).

⁹⁷ T. Hirschfeld, F. Miller, S. Thomas, H. Miller, F. Milanovich y R. Gaver, *J. Lightwave Tech.*, 5, 1027 (1987).

cador junto con hidrógenocarbonato en un polímero de membrana. De esta manera, la acción sensora de la membrana tiene lugar principalmente en las pequeñas gotas de agua dispersas en el polímero de membrana. Entre los sistemas descritos se puede citar: a) emulsión de una disolución del ácido 8-hidroxi-1,3,6-pirenotrisulfónico e hidrógenocarbonato en silicona; presenta el inconveniente de que la deshidratación que sufre al exponerse a gas seco afecta su estabilidad de forma considerable^{98,99}. Una membrana similar se ha propuesto usando poliuretano¹⁰⁰; b) una emulsión parecida para un sensor colorimétrico, emplea rojo fenol que junto con el hidrógenocarbonato es preparado en una mezcla de un polímero tipo polimetil metacrilato y de polietilenglicol de 600 D¹⁰¹; c) estabilización de las pequeñas gotas de la disolución acuosa formando micelas; así se ha usado polivinilpirrolidona para estabilizar micelas de hidrógenocarbonato y seminaftorodamina como indicador luminiscente, todo ello disperso en un polímero tipo siloxano¹⁰²; d) uso de un material de membrana completamente soluble en agua como es el polietilenglicol junto con fluoresceína como indicador. En este caso, no añaden hidrógenocarbonato, pero ajustan el pH del polietilenglicol con NaOH antes de formar la membrana, de forma que la película final contiene pequeñas gotas de agua con el indicador al pH adecuado para responder al gas¹⁰³. Evidentemente, este sensor, también de fibra óptica, no sirve para determinar CO₂ en agua.

El inconveniente que presentan este tipo de membranas sensoras es que la respuesta del sensor se modifica si la tensión de vapor de agua del problema, en el caso de medidas en fase gas, o la presión osmótica, para medidas de CO₂ disuelto, difieren significativamente de la del sensor. Esto, a su vez, exige que la calibración del sensor se haga con disoluciones con presiones osmóticas o de vapor similares a las del sensor.

⁹⁸ H.J. Marsoner, H. Kroneis y O.S. Wolfbeis, Austrian Patent 386.078 (1986).

⁹⁹ M.J.P. Leiner, *Anal. Chim. Acta*, 255, 209 (1991).

¹⁰⁰ S. Hahn, A. Nelson, M. Bennett y H.K. Hui, EP 0601816 (1994).

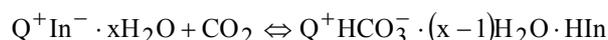
¹⁰¹ J.B. Yim, T.W. Hubbard, L.D. Melkerson, M.A. Sexton y B.M. Fieggen, US Patent 5,047,627 (1991).

¹⁰² J.W. Parker, O. Laksin, C. Yu, M.L. Lau, S. Klima, R. Fisher, I. Scott y B.W. Atwater, *Anal. Chem.*, 65, 2329 (1993).

¹⁰³ Y. Kawabata, T. Kamichika, T. Imasaka y N. Ishibashi, *Anal. Chim. Acta*, 219, 223 (1989).

El tercer tipo lo constituyen los sensores de membrana homogénea, en los que el indicador está directamente atrapado en la membrana permeable a gases e impermeable a iones y responde a CO₂. Fueron descritos por primera vez por Raemer y col. en una patente para indicación visual de CO₂ en tubos endotraqueales usados en anestesia¹⁰⁴. Sugirieron la adición de hidróxidos de amonio cuaternario, al que llamaron agente de transferencia de fase, sugiriendo que su papel era acelerar el intercambio de CO₂ con la fase líquida sensora, a las membranas que contenían el indicador, coloreado en este caso como rojo fenol o azul de bromotimol.

El primer sensor al que realmente se puede considerar de membrana homogénea es el descrito por Mills y col.^{105;106} en el que utilizan hidróxido de tetraoctilamonio (Q⁺) para solubilizar el indicador de pH (In⁻), púrpura de m-cresol, en forma de par iónico en el material de membrana que es relativamente hidrófobo, así etilcelulosa o polivinilbutiral. Para ayudar a la difusión de CO₂ en la membrana, se añade algún plastificante, como por ejemplo tributilfosfato¹⁰⁷. La actuación de esta membrana se justifica por la presencia de moléculas de agua de hidratación en el par iónico, las cuales permitirían la hidratación necesaria del CO₂ para que actúe como ácido frente al agua como base conjugada en la forma:



Una de las ventajas que tiene este tipo de sensores es que la membrana hidrófoba puede actuar por sí misma como una barrera a los iones por lo que no se necesita disponer ninguna membrana adicional. Por ello, también se han denominado sensores desnudos a este tipo de sensores de CO₂.

Se han usado diferentes indicadores, así para sensores colorimétricos de CO₂ el indicador dianiónico rojo cresol^{108;109;110} y para sensores luminiscentes el ácido 8-hidroxi-

¹⁰⁴ D.B. Raemer, D.R. Walt y C. Munkholm, US Patent 5,005,572 (1991).

¹⁰⁵ A. Mills, Q. Chang, N. McMurray, Anal. Chem., 64, 1383 (1992).

¹⁰⁶ A. Mills y N. McMurray, US Patent 5,472,668 (1995).

¹⁰⁷ A. Mills y L. Monaf, Analyst, 121, 535 (1996).

¹⁰⁸ B.H. Weigl y O.S. Wolfbeis, Sens. Actuators B, 28, 151 (1995).

1,3,6-pirenotrisulfónico^{111;112}. En ambos casos, se ha empleado además del hidróxido de tetraoctilamonio, etilcelulosa como polímero y tributilfosfato como plastificante. Con este mismo esquema químico se ha propuesto el empleo de Teflon AF 1600 como recubrimiento altamente permeable a gases para evitar interferencias iónicas; sistema que se ha aplicado como microsensar para la determinación en agua de mar¹¹³. Otras alternativas empleando el mismo indicador luminiscente, han consistido en: a) fijar electrostáticamente el par iónico 8-hidroxi-1,3,6-pirenotrisulfonato de tetraoctilamonio en la superficie de partículas de aminocelulosa que a continuación son dispersadas en una silicona para formar la membrana, al objeto de aumentar su estabilidad y tiempo de vida¹¹⁴; b) la incorporación del par iónico en un vidrio hidrofóbico, en concreto en una sílice modificada orgánicamente (ormosil), que da lugar a un material sol-gel con buenas propiedades sensoras de CO₂¹¹⁵; c) la preparación del par iónico azul de timol-tetrametilamonio en vidrio sol-gel a partir de tetraetoxisilano y metiltrietoxisilano¹¹⁶; d) el uso de silicona de dos componentes de alta hidrofobicidad presenta ventajas en cuanto a menor lixiviación de indicador e interferencias¹¹⁷.

Aunque se han propuesto diversos sensores para CO₂ de tipo luminiscente, la mayoría usan el mismo indicador, ácido 8-hidroxi-1,3,6-pirenotrisulfónico, pues no existen gran número de indicadores fluorescentes que tengan propiedades adecuadas para ese gas. Una alternativa propuesta ha sido emplear el efecto de filtro interno de manera que se incorpore en la membrana un compuesto fluorescente que tenga la característica de emitir radiación a una longitud de onda correspondiente a una de las formas, ácida o básica, del indicador colorimétrico de CO₂. De esta manera, parte de la radiación emitida será absorbida por el indica-

¹⁰⁹ F. Baldini, A. Falai, A.R. De Gaudio, D. Landi, A. Lueger, A. Mencaglia, D. Scherr y W. Trettnak, *Sens. Actuators B* 90, 132 (2003).

¹¹⁰ B.H. Weigl y O.S. Wolfbeis, *Anal. Chim. Acta*, 302, 249 (1995).

¹¹¹ A. Mills y Q. Chang, *Analyst*, 118, 839 (1993).

¹¹² B. Müller y P.C. Hauser, *Analyst*, 121, 339 (1996).

¹¹³ G. Neurauder, O. Kilmant y O.S. Wolfbeis, *Fresenius J. Anal. Chem.*, 366, 481 (2000).

¹¹⁴ O.S. Wolfbeis, B. Kovacs, K. Goswami y S.M. Klainer, *Mikrochim. Acta*, 129, 181 (1998).

¹¹⁵ C. Malins y B.D. MacCraith, *Analyst*, 123, 2373 (1998).

¹¹⁶ H. Segawa, E. Ohnishi, Y. Arai y K. Yoshida, *Sens. Actuators B*, 94, 276 (2003).

¹¹⁷ X. Ge, Y. Kostov y G. Rao, *Biosen. Bioelectron.*, 18, 857 (2003).

dor y la disminución de señal se relacionará con la concentración del gas. Se ha propuesto la α -naftoftaleína como indicador fijado como par iónico en una membrana de etilcelulosa en una cara de una lámina de cuarzo, mientras que en la opuesta se ha situado tetrafenilporfirina en poliestireno como fluoróforo¹¹⁸. De forma similar, se ha estudiado el uso del rojo cresol en combinación con el complejo tris(tenoiltrifluoroacetato) de europio(III) dihidrato¹¹⁹.

Estos sensores de membrana homogénea son muy rápidos de respuesta en fase gas, pues valores de 4 y 7 segundos no son raros¹⁰⁵. Por otra parte, presentan ventajas en cuanto al mayor tiempo de vida en atmósferas secas, al perder el agua de hidratación con mayor dificultad. Para la determinación de CO₂ en disolución presentan la ventaja de ser menos sensibles a los cambios en presión osmótica que los sensores de disolución recubierta, aunque para un uso prolongado es necesario usar una membrana de recubrimiento impermeable a iones¹²⁰. Estos sensores presentan el inconveniente del efecto irreversible que les originan gases ácidos como NO₂ y SO₂ debido a su reacción con el indicador en forma básica. Con respecto a su estabilidad, se han descrito tiempos de vida de las membranas sensoras de hasta un año, sobre todo si se conservan en bolsas selladas, refrigeradas y en la oscuridad, aunque lo habitual es que con un uso continuo su vida sea de pocas semanas, habiéndose sugerido que la degradación de Hofmann del amonio cuaternario puede justificar su baja estabilidad¹⁰⁵. Todos los problemas citados unidos a los que origina la lixiviación del indicador constituyen las principales limitaciones de los sensores de CO₂. Unas de las soluciones dadas consiste en usar un reservorio en el que se sumerge el extremo de la fibra óptica sensora, el cual contiene indicador en tampón, de forma que por difusión se regenere continuamente la membrana sensora¹²¹.

En lo que hasta ahora hemos comentado, el tipo de medida realizada es de intensidad bien de absorción de radiación o de fluorescencia de un indicador ácido-base que modifica su posición de equilibrio como consecuencia de la presencia de CO₂. Por ello, cualquier pérdida

¹¹⁸ Y. Amao y N. Nakamura, *Sens. Actuators B*, 100, 351 (2004).

¹¹⁹ N. Nakamura y Y. Amao, *Anal. Bioanal. Chem.*, 376, 642 (2003).

¹²⁰ A. Mills y K. Eaton, *Quim. Anal.*, 19, 75 (2000).

¹²¹ K. Ertekin, I. Klimant, G. Neuraüter y O.S. Wolfbeis, *Talanta*, 59, 261 (2003).

de indicador durante el uso del sensor, bien por fotooxidación o por lixiviación, da como resultado errores en las medidas y en el parámetro medido. Por esta razón, se ha tratado de buscar diversas soluciones a este problema.

Una de ellas consiste en emplear métodos de cociente de señales o ratiométricos. Así el ácido 8-hidroxi-1,3,6-pirenotrisulfónico presenta dos máximos de excitación (405 y 459 nm) correspondientes a su forma protonada y desprotonada, respectivamente y uno solo de emisión, por lo que se ha propuesto usar el cociente de intensidades de fluorescencia a 405 nm y 459 nm como parámetro analítico sensible a CO_2 ¹¹⁷.

Una estrategia propuesta es usar el tiempo de vida de luminiscencia como parámetro analítico, por las ventajas que presenta, ya antes comentadas al tratar de sensores de oxígeno: independencia de la variación de concentración de luminóforo, de la intensidad de la fuente, de la fotooxidación y lixiviación del indicador y de la sensibilidad del indicador

El problema que presentan algunos indicadores fluorescentes es su corto tiempo de vida; así le ocurre al ácido 8-hidroxi-1,3,6-pirenotrisulfónico, lo que impide el uso de instrumentación de bajo precio como son las técnicas de modulación de fase. Una solución propuesta para resolver el problema es al técnica de referenciación con doble luminóforo (Dual Luminophore Referencing, DLR). Se trata de un método ratiométrico interno en el que la señal de intensidad de fluorescencia se convierte en señal de dominio de fase, coinmovilizando en la membrana un luminóforo de referencia que sea inerte, con largo tiempo de vida y similares propiedades espectrales al sensible a CO_2 . El valor del ángulo de fase de la señal total medida se correlaciona con la concentración de CO_2 . Se ha propuesto el uso del complejo tris(4,7-difenil-1,10-fenantrolina) rutenio(II) encapsulado en nanopartículas impermeables a oxígeno incorporado en una membrana sol-gel conteniendo el ácido 8-hidroxi-1,3,6-pirenotrisulfónico como par iónico¹²².

Una alternativa interesante para la medida de CO_2 es el empleo de la luminiscencia por transferencia de energía de resonancia (RET). Para que se produzca fluorescencia por transferencia de energía de resonancia deben coexistir en la membrana dos fluoróforos o bien un

¹²² C.V. Bültzingslöwen, A.K. McEvoy, C. McDonagh, B.D. MacCraith, I. Klimant, K. Christian y O.S. Wolfbeis, *Analyst*, 127, 1478 (2002).

fluoróforo y un colorante, donde el aceptor fluoróforo o bien el aceptor colorante atenúan la fluorescencia del donador fluoróforo o fosforóforo. La transferencia de energía ocurre sin la aparición de fotones y es el resultado de las interacciones dipolo-dipolo entre donador y aceptor¹²³. La energía de resonancia depende del solapamiento de los espectros de emisión del donador y de absorción del aceptor y de la distancia, en concreto de la sexta potencia de la distancia según la ecuación de Förster, por lo que el proceso solo es eficaz si la distancia entre ambas moléculas es inferior a 100 nm. De esta manera, se convierten variaciones en absorción de radiación en variaciones en tiempo de vida del donador luminiscente, que es lo que se va a medir. Se han propuesto varios sensores para CO₂ basados en RET como el que emplea Sudan III como aceptor sensible al gas, encapsulado en material sol-gel conteniendo el complejo tris(4,7-difenil-1,10-fenantrolina) rutenio(II). Las medidas de tiempo de vida se realizan mediante técnicas de fluorimetría de fase¹²⁴. Un sistema análogo ha sido estudiado aunque empleando azul timol como indicador en este caso¹²⁵.

Otra forma de determinar dióxido de carbono en disolución, consiste en la medida de la atenuación de fluorescencia mediante transferencia electrónica fotoinducida (PET). Se ha demostrado que muchos hidrocarburos aromáticos en estado excitado interactúan con aminas que atenúan la emisión del compuesto luminiscente, formándose un excíplejo entre la amina y el fluoróforo, mediante transferencia electrónica fotoinducida. Han sido estudiados derivados del naftaleno y antraceno¹²⁶ con grupos amino unidos al anillo aromático, observándose que la emisión es particularmente atenuada por el grupo amino desprotonado y es menos atenuada cuando este grupo se encuentra protonado. Esta atenuación por PET depende de los pares electrónicos del grupo amino, por tanto una reacción en la que decrezca la densidad de electrones no enlazados, provocará un aumento en la intensidad de fluorescencia, y una posible reacción es la formación de carbamatos entre los grupos amino y el dióxido de carbono, lo cual justificaría los resultados encontrados por Herman y col¹²⁶.

¹²³ J.R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Kluwer Academic, Plenum Publishers, New York, 1999.

¹²⁴ C.V. Bültzingslöwen, A.K. McEvoy, C. McDonagh y B.D. MacCraith, *Anal. Chim. Acta*, 480, 275 (2003).

¹²⁵ G. Neuraüter, I. Klimant y O.S. Wolfbeis, *Anal. Chim. Acta*, 382, 67 (1999).

¹²⁶ P. Herman, Z. Murtaza y J.R. Lakowicz, *Anal. Biochem.*, 272, 87 (1999).

También se ha propuesto emplear la atenuación de luminiscencia por transferencia protónica, en concreto la transferencia protónica al catión en estado excitado tris[2-(2-pirazinil)tiazol]-rutenio(II) a partir de cualquier ácido Brönsted. Para ello, se utiliza el complejo inmobilizado en Sephadex CM saturado con tampón ftalato o fosfato y recubierto con una membrana de silicona en el extremo de una fibra óptica. La adición del enzima anhidrasa carbónica a la capa indicadora aumenta la velocidad de respuesta del sensor luminiscente^{127,128}.

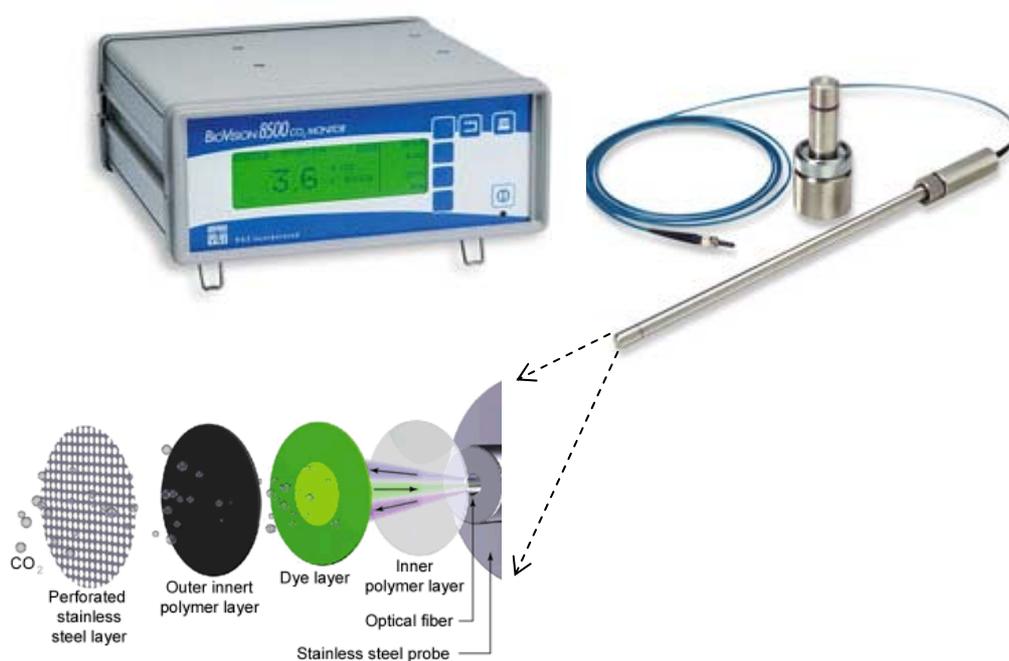


Figura 1.13. Monitor de CO₂ YSI 8500 para biorreactores.

¹²⁷ G. Orellana, M.C. Moreno-Bondi, E. Segovia y M.D. Marazuela, *Anal. Chem.*, 64, 2210 (1992).

¹²⁸ M.D. Marazuela, M.C. Moreno Bondi y G. Orellana, *Sens. Actuators B*, 29, 126 (1995).

Existen diferentes tipos de sistemas comerciales basados en sensores ópticos para la determinación de dióxido de carbono en diferentes situaciones, aunque no suele indicar los fabricantes muchos datos acerca de los esquemas instrumentales y operacionales. Un ejemplo es el monitor YSI 8500 para CO₂ disuelto de la empresa YSI Corporation (www.ysi.com). Se basa en medidas de intensidad de fluorescencia del ácido 8-hidroxi-1,3,6-pirenotrisulfónico en tampón hidrógenocarbonato y cubierto con una membrana de silicona negra (Figura 1.13).

Como ejemplo de sensor de CO₂ de tipo óptico para uso médico, basado en este caso en sensores de membrana homogénea podemos citar el Colibrí (ICOR AB, Bromma, Suecia) usado para identificar la correcta intubación traqueal de pacientes¹²⁹. No obstante lo dicho, no existe en el mercado instrumentación portátil para CO₂ de tipo óptico basado en absorción de radiación o luminiscencia, por lo que su estudio que se aborda en esta Memoria es interesante.

¹²⁹ W. Rabitsch, A. Nikolic, P. Schellongowski, J. Kofler, P. Kraft, C.G. Krenn, T. Staudinger, G.J. Locker, P. Knobl, R. Hofbauer y M. Frass, *Am J. Emerg. Med.*, 22, 4 (2004).

CAPÍTULO 2

MATERIALES Y METODOLOGÍA

1. Materiales y equipos

1.1. Instrumentación y software

1.1.1. Instrumentación

Para realizar las medidas de intensidad de fosforescencia de las membranas sensoras se utilizó un espectrómetro de luminiscencia Perkin-Elmer (Norwalk, CT, EE.UU.) modelo LS-50. El instrumento, conectado a través de una interfase RS232C a un ordenador personal IBM PC330-100Dx4, está equipado con una lámpara de descarga de xenón con una potencia equivalente a 20 kW durante 8 μ s y una anchura de pulso a media altura $< 10 \mu$ s, con dos monocromadores Monk-Gillieson F/3 y con un tubo fotomultiplicador Hammamatsu R298. Un patrón sólido P1 (12,5x12,5x45 mm) conteniendo tenoiltrifluoroacetato de europio (III) disuelto en una matriz transparente de poli(metilmacrilato), suministrado por Perkin-Elmer, se usó para comprobar el espectrómetro. Las medidas de fosforescencia de las membranas fueron realizadas en un accesorio portamuestras construido por nosotros (Figura 2.13).

También se utilizó para la medida de intensidades de fluorescencia y fosforescencia, así como para la medida de tiempos de vida de fosforescencia un espectrofotómetro de luminiscencia Cary Eclipse de Varian Inc. (Palo Alto, CA, EE.UU.). El instrumento está equipado con una lámpara pulsante de Xenon a 80 Hz y una anchura de pulso a media altura

de aproximadamente $2\mu\text{s}$ y está controlado por un ordenador con procesador Intel Pentium 4 con 260 Mb de memoria RAM y Windows 2000.

Los espectros de absorción de radiación de las diferentes membranas se registraron mediante un espectrofotómetro de diodos Hewlett Packard HP-8453 (Nortwalk, CT, EE.UU.) conectado a un ordenador personal Pentium MMX 200, provisto de un HD de 4,3Gb, CD-ROM 40x, 64 Mb de memoria RAM y Windows 95 como sistema operativo, mediante un interfase HP IB y un cable HP IB. Para registrar los espectros de las láminas sensoras se empleó un soporte metálico pintado de negro mate, fabricado por nosotros, de 44 mm de alto por 12 mm de base. El diámetro del orificio central del soporte es de 5 mm y esta colocado a 11,5 mm de la base. Dicho soporte tiene un espacio de 1 mm para poder introducir la lámina sensora.

Para preparar las diferentes mezclas de gases en proporciones volumétricas constantes y controladas se ha usado un equipo mezclador dinámico de gases fabricado por Air Liquide España S.A. Este equipo consta de tres reguladores de caudal másico de gas modelo F-201C-RA-22V, una cámara de mezcla de acero de 0,5 L de capacidad y módulo conversor RS-232/Flow Bus para comunicación a ordenador personal. La concentración porcentual de las mezclas preparadas fue calculada dividiendo el flujo del gas de interés por la suma de los flujos de la mezcla. Como fuente de alimentación para este equipo se usaron gases presurizados de las características técnicas que se indican más adelante. El sistema está conectado a través del software Lowdde32 de Air Liquide a un ordenador con procesador Intel Pentium 4, que es el mismo al que está conectado el espectrofotómetro de luminiscencia. El caudal de gas se controla mediante un hoja Excel programada suministrada por Air Liquide.

La medida del tamaño de partícula se hizo mediante microscopía electrónica de barrido por emisión de campo haciendo uso de un instrumento LEO 1530 Gemini, con una voltaje de aceleración de 10 KV. La muestra fue preparada para la medida mediante metalización con carbono u oro.

Como instrumentación de referencia para la medida de oxígeno se usó el instrumento portátil comercial: medidor de gas MicroPac Plus, Dräger Safety AG, Lübeck, Alemania,

para la monitorización de O₂ basado en un sensor electroquímico, con rango de medida hasta 25% y una sensibilidad $\pm 1\%$ de O₂.

Además de lo anterior se usaron los siguientes instrumentos y aparatos:

- Balanzas analíticas Mettler PJ360 Delta Range y Mettler AE 163, con rango de pesada: 0-30 y 0-160 g y precisión: 0,01 y 0,1 mg, respectivamente.
- Estufa de secado Memmert modelo U con rango de temperaturas de +30°C a +220°C
- Estufa para desecación y esterilización Selecta, modelo Conterm, serie 2000, que mantiene una temperatura de entre 25 y 100 °C y presenta una entrada para gases.
- Armario termostático diseñado por nosotros y modificado por el Servicio de Mantenimiento de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Granada a partir de un congelador vertical de -100 °C, de modo que tenga una temperatura regulable entre -50°C y +50°C mediante un controlador de temperatura WM 961. Dispone de orificios laterales practicables para poder introducir los cables para alimentación de la instrumentación y conexión a ordenador necesarios.
- Baño ultrasónico Bramson, 1510E- MTH de Branson Ultrasonics Co., EE.UU.
- pH-metro digital Crison, modelo MicropH 2000, provisto de electrodo combinado de vidrio y cloruro de plata.
- pH-metro digital Crison, modelo MicropH 2002, provisto de electrodo combinado Orion 8102 Ross.
- Rotavapor Heidolph tipo VV-1, 40-220 rpm.

- Agitador de tubos Heidolph Reax 2000.
- Multiagitador de nueve elementos SBS. A-13 serie C.
- Multiagitador de nueve elementos SBS A-100009.
- Agitador giratorio P. Selecta de 16 viales.
- Sistema centrífugo de preparación de membranas de diseño propio a partir de lo descrito por Seiler y col.¹
- Placa agitadora-calefactora Heidolph modelo 2002.
- Centrífuga Selecta modelo Macrotronic.
- Centrífuga UKA Technic Model 2610.
- Bomba de agua para vacío Büchi B-169 Vacuum-System.

Para el desarrollo de los distintos prototipos de medida fabricados se utilizó la siguiente instrumentación:

- Osciloscopio digital Tektronix, TDS410A.
- Generador de señales Agilent 33120A.
- Fuentes de alimentación Agilent E3616A.
- Multímetro de precisión Agilent 3478A.
- Fuente de intensidad programable Keithley 220.
- Multímetro portátil Fluke 111.

¹ K. Seiler y W. Simon, Anal. Chim. Acta, 266, 73 (1992).

- Grabador de microcontrolador PIC, Picstart Plus.

1.1.2. Ordenadores

Además de los ordenadores utilizados para comandar la diferente instrumentación de medida, se ha empleado para el tratamiento de datos un ordenador personal Pentium 4, con CPU de 1,80 GHz y 256 MB de RAM provisto de HD de 40 Gb, CD-ROM 52x, 256 Mb de memoria RAM y Windows XP como sistema operativo.

Tanto los ordenadores de los equipos de medida como el ordenador de trabajo están interconectados entre sí a través de la red de área local (LAN) del Grupo de Investigación.

1.1.3. Impresoras

- Hewlett Packard 520.
- Hewlett Packard 690C.
- Hewlett Packard LaserJet 1200.
- Copiadora-impresora, Gestner 3212.

1.1.4. Software

La recogida y tratamiento de los espectros UV-Vis se han llevado a cabo mediante:

- UV HP ChemStation Software (modo de cinética incluido).

La recogida y tratamiendo de los espectros de fosforescencia y tiempos de vida se llevaron a cabo mediante:

- Cary Eclipse Software.

- Perkin Elmer Software.

Las representaciones graficas se han realizado con:

- Microsoft Excel 2003, Microsoft Corporation.
- GraphMatica para Win32 v1.60d.

Programas de cálculo utilizados son:

- Statgraphics Plus Versión 4.1, STSC. Inc., de Statistical Graphics Corp., EE.UU., 1999.
- Microsoft Excel 2003, Microsoft Corporation.

Editores de texto utilizados:

- Microsoft Word 2003, Microsoft Corporation.

Las moléculas han sido dibujadas con los programas:

- ChemSketch 5.0.
- ChemDraw Pro 7.0.

Los dibujos han sido realizados con:

- Microsoft Power Point, Microsoft Corporation.
- Adobe photoshop 8.0.1, Adobe Systems Corporation.

Programa de búsqueda bibliográfica y bases de datos:

- SciFinder Scholar 2004 Editions, American Chemical Society.
- Reference Manager versión 10, ISI ResearchSoft.

2. Productos químicos.

2.1. Disolventes

Agua desionizada (Tipo III). Obtenida en un equipo de ósmosis inversa Milli RO12 Plus (Millipore) acoplado a un equipo de refinado Milli Q PLUS 185 (Millipore). La conductividad del agua fue controlada periódicamente, no superando en ningún momento el valor de 10 μ S.

Se emplearon, además, los siguientes disolventes:

- Diclorometano PRS (Panreac, Barcelona, España).
- Tetrahidrofurano (Sigma-Aldrich Química S.A., Madrid, España).
- Tolueno (Sigma-Aldrich Química S.A., Madrid, España).
- Dimetil formamida (DMF) (Sigma-Aldrich Química S.A., Madrid, España).
- Metanol PRS (Panreac, Barcelona, España).
- Dimetil sulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich Química S.A., Madrid, España).
- Etanol PRS (Panreac, Barcelona, España).
- Cloroformo PRS (Panreac, Barcelona, España).
- Ciclohexanona PRS (Panreac, Barcelona, España).
- Hexadecano (Sigma-Aldrich Química S.A., Madrid, España).

2.2. Reactivos

2.2.1. Reactivos empleados en la preparación de disoluciones.

- Ácido clorhídrico, 37%, PRS (Panreac, Barcelona, España).
- Hidrógeno carbonato de sodio, RA (Merck, Darmstadt, Alemania).
- Hidróxido de sodio, PRS (Panreac, Barcelona España).
- Óxido de mercurio, 99,999% (Sigma-Aldrich Química S.A., Madrid, España).

2.2.2. Reactivos empleados para síntesis

- Isobutil metacrilato (Sigma-Aldrich Química S.A., Madrid, España).
- Trifluoroetil metacrilato (Sigma-Aldrich Química S.A., Madrid, España).
- 2,2'-Azo-bisisobutironitrilo (AIBN) (Sigma-Aldrich Química S.A., Madrid, España).
- Azul de bromotimol (Sigma-Aldrich Química S.A., Madrid, España).
- Azul de timol (Sigma-Aldrich Química S.A., Madrid, España).
- Azul de bromofenol (Sigma-Aldrich Química S.A., Madrid, España).
- Bromuro de hexadeciltrimetilamonio (Sigma-Aldrich Química S.A., Madrid, España).
- Óxido de plata (Sigma-Aldrich Química S.A., Madrid, España).

2.2.3. Reactivos formadores de la zona sensora.

En este apartado se recogen los reactivos utilizados para la puesta a punto de las membranas sensoras desarrolladas en la presente Memoria tales como los indicadores, sales lipofílicas, plastificantes y polímeros.

2.2.3.1. *Indicadores*

- Octaetilporfirina de Pt (II) (PtOEP) de Porphyrin Products, EE.UU.
- Azul de bromotimol lipofilizado. Sintetizado según se describe en el apartado 2.2.5.2.
- Azul de timol lipofilizado. Sintetizado según se describe en el apartado 2.2.5.3.
- Azul de bromofenol lipofilizado. Sintetizado según se describe en el apartado 2.2.5.4.

2.2.3.2. *Sales lipofílicas. y plastificantes.*

- Hidróxido de tetraoctil amonio (TOAOH). Sigma-Aldrich Química S.A., Madrid, España.
- Cloruro de hexadecil trimetil amonio Sigma-Aldrich Química S.A., Madrid, España.
- Tributilfosfato (TBP). Sigma-Aldrich Química S.A., Madrid, España
- 2-Nitrofeniloctiléter (NPOE)
- Bis (2-etilhexil) sebacato (DOS)

2.2.3.3. *Polímeros utilizados.*

- Cloruro de polivinilo (PVC) de Sigma-Aldrich Química S.A., Madrid, España.
- Poliestireno (PS), Sigma-Aldrich Química S.A., Madrid, España.
- Silicona GP-197, Genesee Polymer Corporation, MI, EE.UU.
- Silicona Elastosil N 10, Wacker Química Ibérica S.A, Barcelona, España.
- Poli(isobutimetacrilato-co-tetrafluoroetilmetacrilato). Sintetizado por nosotros según se describe en el apartado 2.2.5.1.
- Hidrogel de poliuretano D4, Tyndale Plains-Hunter L.D, Lawrenceville, NJ, EE.UU.
- Etil celulosa, Sigma-Aldrich Química S.A., Madrid, España.
- Cloruro de poli (vinilo-co-vinilideno) (PVCD), Sigma-Aldrich Química S.A., Madrid, España.
- Resina de polietilen vinil alcohol (EVAL), Eval Company of America. EE.UU.
- Poliacrilonitrilo (PAN) Goodfellow, Cambridge, Inglaterra.

Además de los reactivos indicados, se utilizó como soporte sólido para las membranas poliéster tipo Mylar en láminas de 0,25 mm de espesor, orientado biaxialmente (Goodfellow, Cambridge, Inglaterra)

2.2.4. Gases.

Los gases utilizados han sido suministrados por Air Liquid S.A. y son:

- Nitrógeno N2-1, botella B50; contenido en impurezas <3 ppm para el H₂O, < 2 ppm para el O₂ y < 0.5 ppm para CnHm.

-
- Oxígeno N50, botella B50; con contenido en impurezas <3 ppm para el H₂O, < 2 ppm para el N₂, < 1 ppm para CH₄ y < 1 ppm para H₂.
 - Dióxido de carbono N45; botella B50 con contenido en impurezas <7 ppm para el H₂O, < 10 ppm para el O₂, < 1 ppm para H₂ y < 25 ppm para N₂.
 - Mezcla calibrada de dióxido de carbono 1% y nitrógeno 99%, botella B10. Con una incertidumbre relativa del 2%.
 - Mezcla calibrada de dióxido de carbono 5% y nitrógeno 95%, botella B10. Con una incertidumbre relativa del 2%.
 - Metano; botella B01; contenido en impurezas impurezas < 0,5% de aire + CO₂ + CnHm).
 - Dióxido de azufre N30-B01 con una concentración de impurezas <100 ppm de H₂SO₄ y <100 ppm para el caso de H₂O.
 - Mezcla ácido sulfhídrico 79,56% y el resto de N₂ con una incertidumbre del 1,59%.
 - Protóxido de nitrógeno N25-B50 con una concentración de impurezas <50 ppm de O₂, <500 ppm para el caso del N₂ y <20 ppm para H₂O.

2.2.5. Síntesis de reactivos

Cuando fue necesario se procedió a la síntesis de reactivos en el laboratorio. A continuación se detallan los pormenores de dichas síntesis.

2.2.5.1. Síntesis de poli(isobutilmetacrilato -co- tetrafluoroetil metacrilato).

La síntesis se realizó según lo indicado por Amao y col.² Se disuelven 0,16 moles de isobutil metacrilato, 0,15 moles de trifluoroetil metacrilato y 0,025 moles de iniciador azo-bis-isobutironitrilo en 80 mL de tolueno. La mezcla se calienta a 80°C durante 5 horas bajo atmósfera de nitrógeno. Tras enfriar a temperatura ambiente, se precipita el polímero con metanol. Se recoge el sólido por filtración, se lava con metanol para eliminar los monómeros que no han reaccionado y se deja secar a vacío. Se identificó el compuesto obtenido mediante ¹H-RMN (300MHz, CDCl₃) y ¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃).

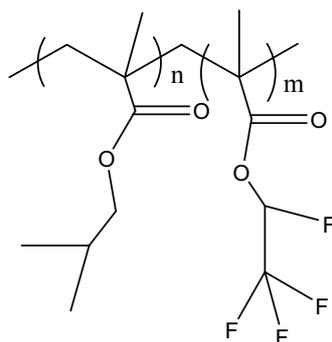


Figura 2.1 Estructura del isobutilmetacrilato-co-tetrafluoroetil metacrilato.

²Y. Amao, T. Miyashita y I. Okura, Anal. Chim. Acta, 421, 167 (2000).

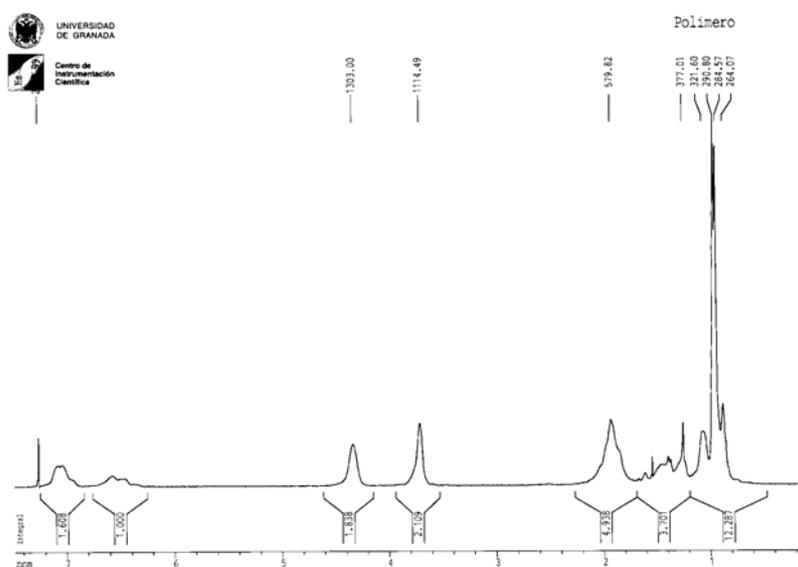


Figura 2.2. ^1H -RMN de poli(isobutilmetacrilato-co-tetrafluoroetilmetacrilato).

Debido a la estructura polimérica de la molécula y como consecuencia de las diferentes posibilidades de unión de los monómeros, los espectros de ^1H -RMN presentan una alta complejidad. Las señales más representativas de la molécula que presenta dicho espectro de ^1H -RMN son las que aparecen entre 6 y 7 ppm que son debidas a los protones del éster del monómero fluorado y las señales entre 3,5 y 4,5 que se deben al éster del monómero isobutilmetacrilato. Los grupos metilo aparecen a δ 0,97 y δ 0,95, mientras que el resto de protones unidos a carbonos metilénicos de la cadena presentan el desplazamiento habitual por debajo de 2 ppm.

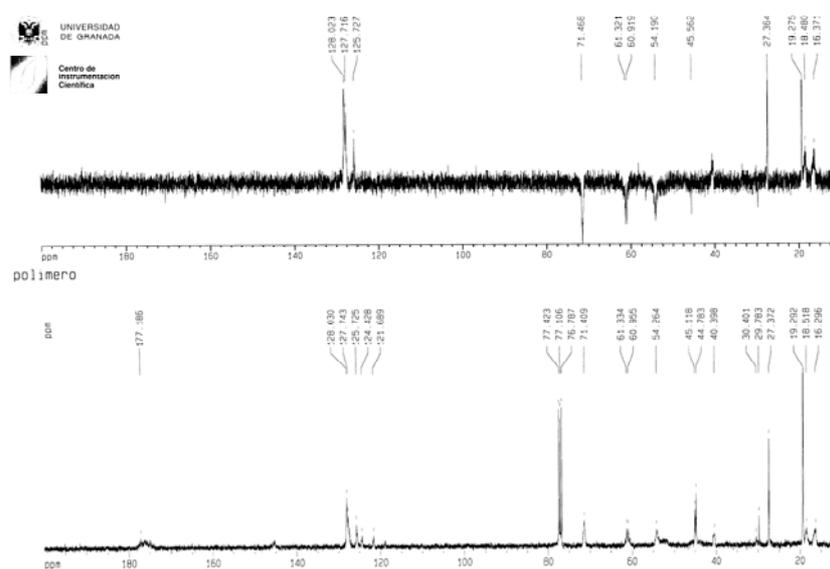


Figura 2.3. ^{13}C -RMN de poli(isobutilmetacrilato-co-tetrafluoroetilmetacrilato).

En el espectro de ^{13}C -RMN se observan en torno a 175 ppm las señales debidas a los diferentes grupos carbonilo de los monómeros que forman el polímero. De la misma forma, las señales de los carbonos unidos a átomos de fluor se encuentran entre 119 y 125 ppm. Como corresponde con la estructura propuesta aparecen señales debidas a carbonos cuaternarios y metínicos, así la señal debida al metileno oxigenado aparece a 71,4 ppm demostrando la presencia del monómero isobutilmetacrilato. Los carbonos cuaternarios presentes en la cadena polimérica aparecen sobre δ 44 ppm, observándose también los metilenos entre 54 y 62 ppm.

2.2.5.2. Síntesis de azul de timol lipofilizado.

Se pesan 0,48 g de azul de timol, como sal sódica, y se disuelven en 80 mL de agua. La disolución se acidifica con 1 mL de HCl 0,1 M. Se disuelven 0,36 g de hexadecil trimetil amonio en 60 mL de agua y se mezclan ambas disoluciones obteniendo un precipitado gomoso que se extrae en diclorometano. El sólido obtenido al evaporar en rotavapor se deja secar a vacío. El rendimiento obtenido es del 67 %. Se identificó el compuesto obtenido mediante $^1\text{H-RMN}$.

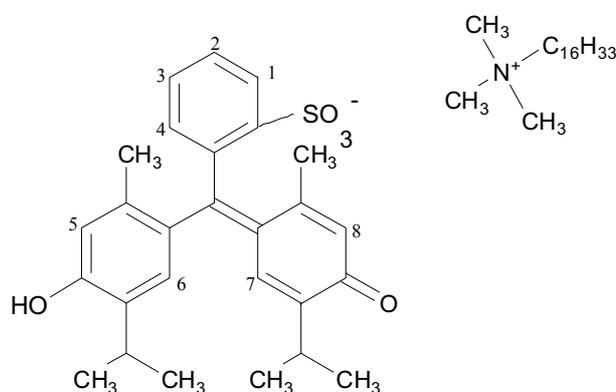


Figura 2.4 Estructura del azul de timol lipofilizado.

El espectro de $^1\text{H-RMN}$ (300MHz, CDCl_3) presenta a δ 8,12 ppm un doblete correspondiente a H-1; a 7,39 ppm un multiplete debido a H-2 y H-3; a 7,08 un doblete de H-4; a 6,99; 6,88; 6,61 y 6,38 aparecen singletes anchos debidos a H-5, H-6, H-7 y H-8. El grupo metileno unido al N^+ aparece muy desapantallado y como un triplete a 3,20. Los tres grupos metilo unidos a nitrógeno resuenan también a campo bajo apareciendo a 3,01. Los grupos metilo unidos a los anillos aromáticos se encuentran a 1,95 y 1,77 como singletes. A 1,55 ppm se observa un multiplete debido al $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$. Los demás metilenos de

la cadena se encuentran entorno a 1,2 como multipletes y entre 1,08 y 0,95 los grupos metilo. Por último, tenemos a 0,88 el metilo final de la cadena.

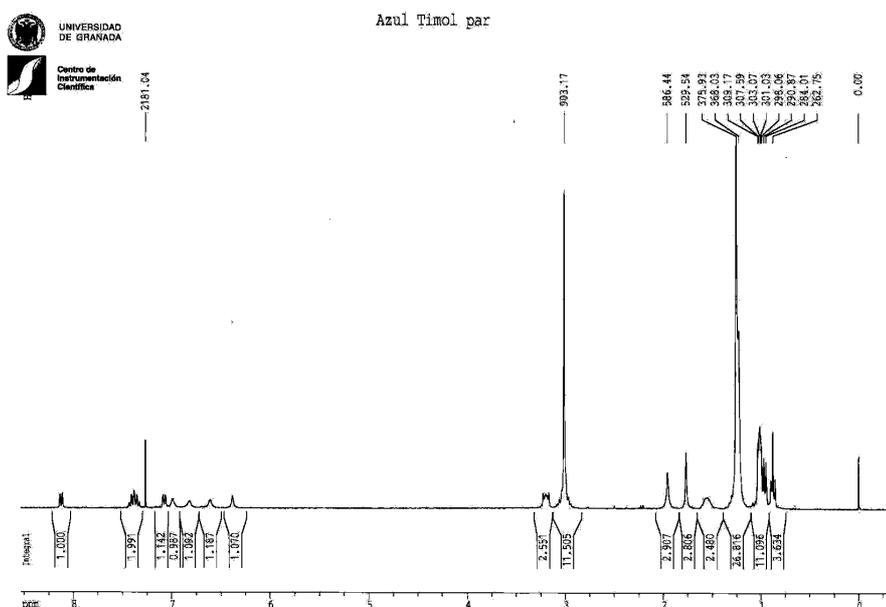


Figura 2.5. ^1H -RMN del azul de timol lipofilizado.

2.2.5.3. Síntesis de azul de bromotimol lipofilizado.

Se pesan 0,64 g de azul de bromotimol y se disuelven en 80 mL de agua. La disolución se acidifica con 1 mL de HCl 0,1 M. Pesamos 0,36 g de hexadecil trimetil amonio que se disuelven en 60 mL de agua. Mezclamos ambas disoluciones, obteniendo un precipitado de aspecto gomoso que se extrae con diclorometano. Se seca dicho precipitado con sulfato sódico anhidro y se evapora en rotavapor, obteniendo un sólido rojizo que se seca en desecador a vacío. El rendimiento obtenido es del 54%. De igual manera que en el caso anterior se identificó el compuesto obtenido mediante ^1H -RMN.

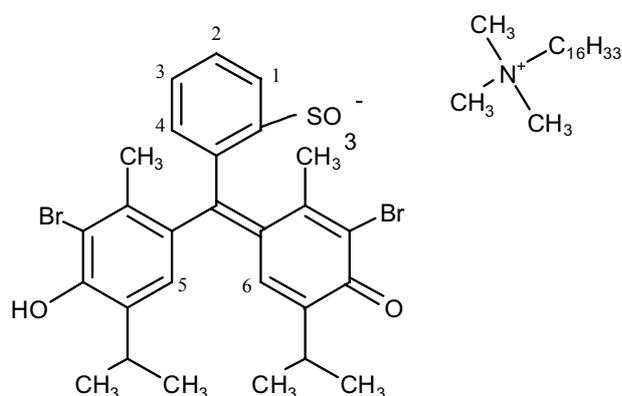


Figura 2.6 Estructura del azul de bromotimol lipofilizado

El espectro de ¹H-RMN (300MHz, DMSO) presenta a 8,12 ppm un doblete correspondiente a H-1, a 7,48 aparece un multiplete debido a los hidrógenos H-2 y H-3 y a 7,16 se observa un doblete de H-4. a 7,71. El grupo metileno unido al N⁺ aparece muy desapantallado como un triplete a 3,50 ppm. Los tres grupos metilo unidos al nitrógeno se encuentran también muy desapantallados a 3,24. A un desplazamiento de 1,81 aparece un multiplete debido al CH₂CH₂N. Los demás metilenos de la cadena salen a 1,28 en forma de multiplete y el metileno final de la cadena se encuentra a 0,87.

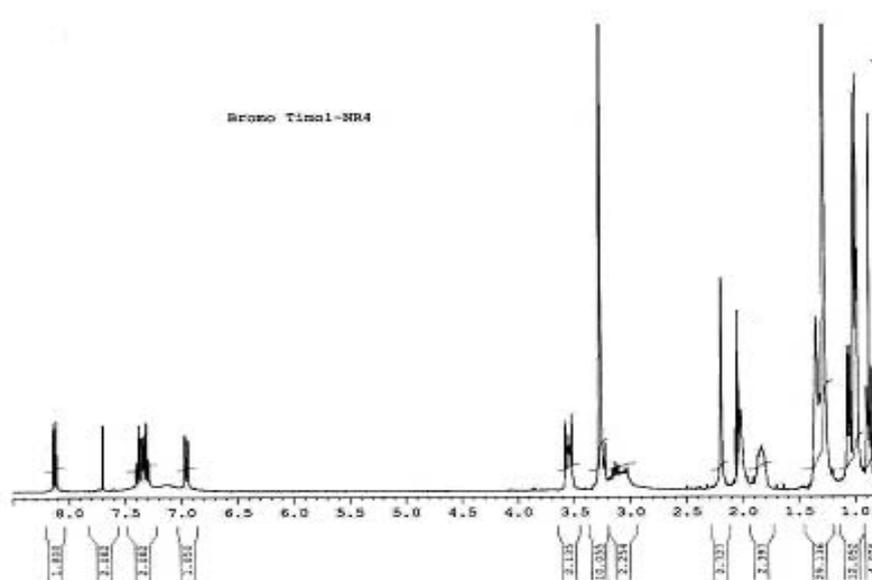


Figura 2.7. ^1H -RMN del azul de bromotimol lipofilizado.

2.2.5.4. Síntesis de azul de bromofenol lipofilizado³.

Se pesan 0,48 g de azul de bromofenol como sal sódica y se disuelven en 80 mL de agua y se acidifica con 1 mL de HCl 0,1 M. Se disuelven 0,36 g de hexadecil trimetil amonio en 60 mL de agua. Al mezclar ambas disoluciones se obtiene un precipitado que se extrae con diclorometano, tras lo cual se evapora a rotavapor. El rendimiento obtenido es del 52%. Fue también identificado el compuesto mediante ^1H -RMN. El espectro se observa en la Figura 2.9.

³ T. Werner, I. Klimant y O.S. Wolfbeis, *Analyst*, 120, 1627 (1995).

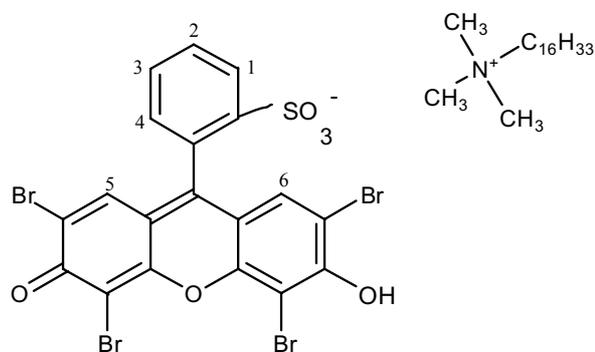
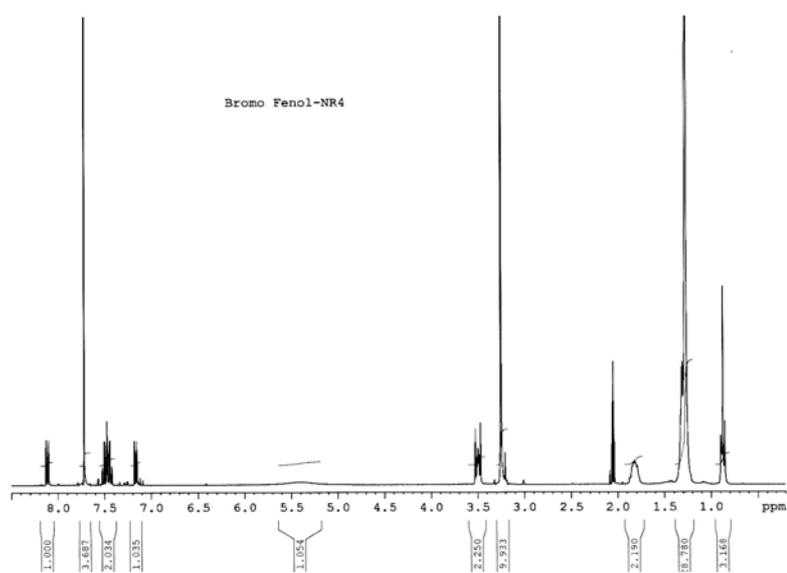


Figura 2.8 Estructura del azul de bromofenol lipofilizado

Figura 2.9. ¹H-RMN del azul de bromofenol lipofilizado.

El espectro de ^1H -RMN (300 MHz, DMSO) presenta a 8,13 un doblete correspondiente a H-1; a 7,32 un multiplete debido a los hidrógenos H-2 y H-3, a 6,95 el doblete de H-4 y un singlete a 7,71 correspondiente a H-5 y H-6.

También podemos observar el grupo metileno unido al N^+ que aparece como un triplete a 3,55. Los grupos metilo unidos a nitrógeno se observan a 3,28. Aparece a 1,85 un multiplete debido al $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$. Los demás metilenos de la cadena se encuentran como un multiplete a 1,30 y, por último, el metileno del final de la cadena aparece a 0,89 como triplete.

2.2.5.5. Preparación de hidróxido de trimetilhexadecil amonio.

Se pesan 0,100 g de Ag_2O y 0,155 g de bromuro de trimetil hexadecil amonio y se agitan en 10 ml de metanol durante 4 horas con lo que se forma un precipitado de bromuro de plata que se separa por decantación. La disolución resultante se conserva a 4°C en botella ámbar bien cerrada. La concentración se estableció mediante valoración con ácido clorhídrico previamente contrastado mediante óxido de mercurio como patrón primario.

2.3. Material de laboratorio.

- Matraces aforados Afora Clase A, de diferentes capacidades.
- Pipetas graduadas y aforadas Afora Clase A, de diferentes capacidades.
- Micropipeta de 5 – 50 μL (Brand).
- Micropipeta de 100 – 1000 μL (Brand).
- Pipetas Pasteur provistas de tetina de silicona.
- Embudo de carga con tubo para equilibrar la presión.
- Viales de vidrio Supelco de 2 mL de capacidad.

- Botellas de polietileno de diferentes capacidades.
- Cubetas de cuarzo para ultravioleta y de vidrio para visible de 10 mm de paso de luz.
- Pesas patrón de 1, 10 y 200 mg de Mettler Toledo, calibración ENAC clase F1.
- Goteros, vasos de precipitado, tubos de ensayo, matraces erlenmeyer, matraces kitasatos, pesasustancias, así como otro material básico de laboratorio de Química Analítica.

2.4. Material electrónico

Este material son los componentes electrónicos y fotónicos más relevantes que se han empleado en la construcción de la zona sensora de los diferentes prototipos de instrumentación portátil desarrollados en la presente Memoria para la medida de oxígeno y de dióxido de carbono:

- Fototransistor (ref. 327-440), Farnell S.L. 7,5 mm² de área activa, 100° de ángulo medio, centrado a 690 nm y 3,5 μs de tiempo de respuesta.
- Fotodetector SHARP IS486, RS AMIDATA. Fotodetector de recepción lateral con disparador schmitt en encapsulado plástico de 3 mm. Consta de un fotodiodo, un amplificador, un regulador de voltaje y un disparador schmitt, junto con salidas transistorizadas no inversoras.
- Diodo emisor de luz (LED) de 5 mm y $\lambda_c = 525$ nm, MARL Optosources. Diodo emisor de luz de alta intensidad. Su longitud de onda de emisión máxima está centrada en 525 nm. Posee una intensidad de emisión de 10000 mCd según el fabricante. Está fabricado en un encapsulado de 5 mm de diámetro y 8,6 mm de longitud. Es el encargado de estimular la luminiscencia de la sustancia química sensora.

- Sensor de temperatura Dallas DS18S20, DALLAS Semiconductor. Sensor de temperatura con salida directa serie digital. Resolución de 9 bits. El rango de medida se extiende desde -55°C a $+125^{\circ}\text{C}$ con una precisión de $\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ en el rango de -10°C a $+85^{\circ}\text{C}$.
- Microcontrolador PIC16F873, Microchip Technology. Este microprocesador es el que controla el prototipo, fabricado en tecnología CMOS *full static*. Posee una memoria flash de 4 Kpalabras (14 bits por palabra). 4 MHz de frecuencia de funcionamiento.

2.5. Calibrado de instrumentación y equipos

En este apartado se recogen las medidas adoptadas de cara a garantizar el control de calidad en los experimentos llevados a cabo en la presente Memoria. Las actividades de control de calidad son acciones planificadas y documentadas que desarrollan en el laboratorio a intervalos de tiempo establecidos con objeto de mantener el sistema bajo control. El control de calidad en general, se basa en la comparación de datos desde la perspectiva de la Quimiometría.

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.

Los equipos de medida tales como micropipetas, balanzas y matraces aforados fueron chequeados periódicamente, y calibrados cuando el valor medio resultante de diez medidas del patrón de referencia difería en más de tres veces la desviación estándar de la calibración previa realizada.

Como patrón se ha utilizado en el caso de las balanzas un juego de pesas de 1, 10 y 200 mg mientras que en el caso de pipetas, micropipetas y demás material volumétrico aforado se utilizó agua desionizada a temperatura controlada, que fue pesada con las balanzas previamente calibradas.

La calibración del espectrofluorímetro Cary Eclipse de Varian Inc., se lleva a cabo cada 6 meses comprobando que el equipo cumple los siguientes tests:

- Exactitud de la longitud de onda del monocromador de excitación y emisión.
- Exactitud de la amplitud espectral de las rendijas de excitación y emisión.
- Control de luz dispersa.
- Medida del espectro Raman del agua.

La calibración del espectrofotómetro Hewlett Packard HP-8453 se lleva a cabo también cada 6 meses comprobando que el equipo pasa los distintos test indicados por el fabricante:

- Ensayo de filtro.
- Corriente oscura.
- Intensidad para diferentes rangos de longitud de onda.
- Exactitud de la longitud de onda a 486 y 656,1 nm.
- RMS Ruido.
- RMS de la línea base.

3. Metodología

Se expone a continuación la metodología de trabajo que se ha empleado durante el desarrollo de esta Memoria, describiéndose la forma en se han preparado las membranas sensoras, se han utilizado dichas membranas y se han realizado las medidas.

3.1. Preparación de membranas sensoras.

De las diversas metodologías descritas para la preparación de sensores se ha elegido por la sencillez de preparación y los buenos resultados que proporciona, la de disolución de los componentes, tanto de los reactivos como de los materiales de membrana, en un disolvente que por deposición en un soporte adecuado y evaporación controlada, origina una membrana con las características deseadas.

Para la preparación de los sensores hay que distinguir dos etapas diferentes, como son la preparación y optimización de la disolución que contiene los reactivos, a la habitualmente llamaremos cóctel, y la posterior preparación del sensor propiamente dicha, utilizando el cóctel anterior.

La primera de las etapas será abordada específicamente en los capítulos próximos para cada una de las membranas sensoras desarrolladas. Aquí solo diremos que en todos los casos se trata de una disolución de un número determinado de componentes en un disolvente orgánico volátil; sin embargo, la optimización de concentraciones y proporciones del cóctel requiere estrategias muy diferentes según las características del sensor. De modo que ahora nos centraremos en la preparación del sensor a partir del cóctel de composición ya establecida.

Se han usado dos sistemas para la preparación de las membranas sensoras: deposición mediante un sistema centrífugo y deposición directa sobre el soporte.

3.1.1. Deposición mediante un sistema centrífugo

Para lograr la preparación de membranas sensoras, se utilizó un sistema rotatorio de velocidad de giro variable fabricado por nosotros, de acuerdo con lo descrito en bibliografía¹. Este dispositivo, cuyo esquema podemos ver en la Figura 2.10, consta de un motor que hace girar un plato a una velocidad variable y programable, el cual tiene una muesca superficial que presenta las mismas dimensiones de la lámina soporte de poliéster y que es donde esta encaja. Todo el mecanismo va cerrado con una tapa superior metálica que tiene un orificio en el que encaja una pieza de teflón expresamente realizada, de forma que una vez cerrada dicha

tapa queda a una altura y posición adecuadas, para que con ayuda de una micropipeta se pueda depositar un cierto volumen del cóctel en la lámina de poliéster que se encuentra girando. De esta forma, el volumen de cóctel depositado se expandirá de forma homogénea sobre el poliéster debido a la acción de la fuerza centrífuga. La velocidad de giro, que se puede variar, permitirá controlar el espesor de la zona activa del sensor. A continuación, se deja reposar la lámina en un recipiente cerrado conteniendo el mismo disolvente.

Una vez evaporado el disolvente, nos resulta una zona circular sobre la lámina donde se encuentran los componentes necesarios para reconocer al analito y producir la señal analítica, y es a esa zona lo que denominamos la zona activa del sensor o zona sensora (Figura 2.11).

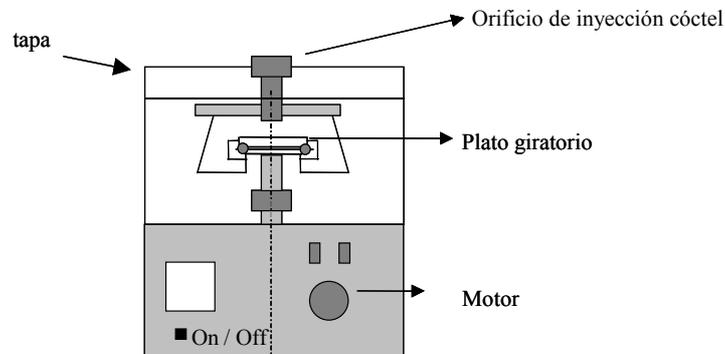


Figura 2.10. Sistema centrífugo de preparación de membranas.

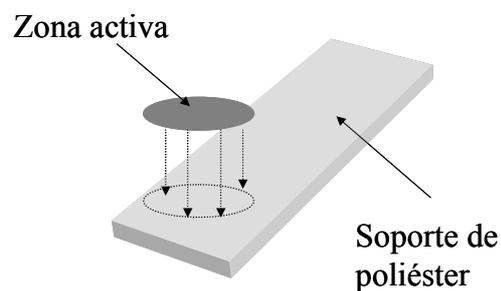


Figura 2.11. Zona activa del sensor.

Para calcular el espesor de la zona activa, se la ha considerado como un cilindro, por lo que aplicando la ecuación 2.1 podemos calcular la altura de dicho cilindro, es decir, el espesor de la membrana:

$$V = \pi \cdot r^2 \cdot h \quad (2.1)$$

donde r es el radio de la zona sensora, h es el espesor y V es el volumen que ocupan todos los componentes de esa zona. Teniendo en cuenta que el componente mayoritario (>70%) de la zona activa es el plastificante y este es un líquido de densidad conocida se puede aproximar la densidad de la zona activa a la densidad de dicho componente. Por ello, el volumen lo podemos calcular mediante:

$$V = \sum \frac{m}{d} \quad (2.2)$$

donde m es la masa de cada uno de los componentes de la zona sensora y d es la densidad de la membrana.

3.1.2. Deposición directa sobre el fotodiodo.

A partir del desarrollo del prototipo instrumental P02, el coctel se depositó directamente sobre el fotodetector.

Se prepararon tres tipos de fotodiodos recubiertos de 5, 10 y 15 μL de cóctel. Para ello, se depositaron con ayuda de una micropipeta cantidades de 5 μL de un cóctel con la composición adecuada, análogo al indicado en el anterior apartado 2.4.2, sobre la superficie de la zona sensora del detector. Después de añadir los primeros 5 μL dejamos secar y volvemos a poner otros 5 μL para obtener la cantidad final deseada y dejamos secar los fotodiodos en un recinto cerrado bajo atmósfera de THF durante 24 horas para un secado lento y homogéneo. Tras ello se consideran preparados para su uso.

3.2. Metodología de medida.

En este apartado se describe la metodología de trabajo usada para llevar a cabo las medidas con las membranas sensoras.

3.2.1. Medidas de espectros de absorción.

Para la medida del espectro de absorción, se sitúa la membrana, con ayuda de un portamuestras adecuado, en el compartimento de medida de un espectrofotómetro, donde se mide el espectro de absorción. Para ello, se han usado portamuestras de diseño propio que permiten situar la tira reactiva verticalmente y en una posición adecuada para la medida de absorción en la zona sensora y, por otra parte, que se adaptan perfectamente al compartimento de cubetas de cada uno de los espectrofotómetros empleados en el desarrollo de esta Tesis Doctoral. Dichos portamuestras están fabricados en hierro y pintados de negro mate (Figura 2.12). Cuando la tira reactiva es introducida en uno de ellos, el orificio que presentan coincide con la zona activa del sensor, de forma que el haz de radiación la atraviesa por la zona central. En todos los casos el diámetro del orificio del soporte es ligeramente inferior al de la zona activa de la tira reactiva, aumentándose así la reproducibilidad de las medidas. De esta manera se evita que la radiación atraviese los bordes del sensor, pues es la zona de la membrana que está sujeta a mayores variaciones en función de cómo haya tenido lugar el secado de la zona activa.

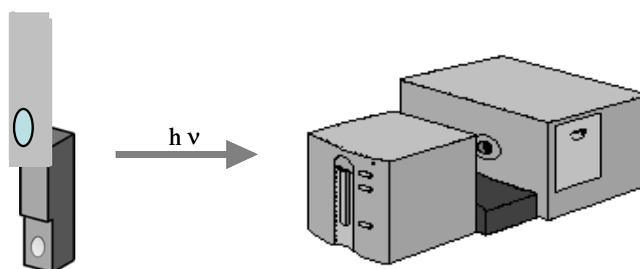


Figura 2.12. Portamuestras para el espectrofotómetro.

3.2.2. Medidas de intensidad y tiempos de vida.

Para la medida de la intensidad de fluorescencia, fosforescencia y tiempos de vida se usó otro tipo de portamuestras también de diseño propio, que permite la llegada del gas a la zona sensora. Las dimensiones son 5 cm de alto y 1 cm de base; está fabricado en hierro pintado de negro y tiene un orificio pequeño en la parte superior que permite la llegada del gas a la zona sensora de la membrana. La membrana sensora se introduce en este portamuestras como se ve en la Figura 2.13. Unos tornillos permiten unir las dos caras del portamuestras y una vez atornillado este se adapta perfectamente al compartimento de cubetas del espectrofluorímetro (Figura 2.14) y permite la medida de luminiscencia.

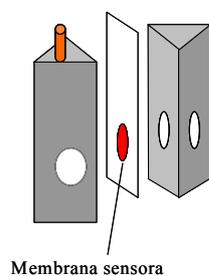


Figura 2.13. Colocación de la membrana.

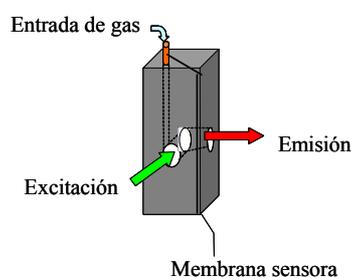


Figura 2.14. Medida de la luminiscencia.

3.2.3. Medidas con los prototipos

Para la realización de medidas con los diferentes prototipos desarrollados se sigue el esquema de la Figura 2.15. En el caso de los prototipos P01, P03 y P04 la introducción del gas se hace a través de un tubo de gases por medio de un pequeño orificio que conduce el gas desde el mezclador hacia el interior del prototipo. En el prototipo de medida P02 que no está cerrado el gas lo llevamos a un pequeño recinto de plástico colocado sobre la parte de la placa donde se sitúa la membrana y el fotodetector de manera que se cree allí la atmósfera de composición conocida. El prototipo P01 no tiene conexión a ordenador, por lo que las

lecturas se debían tomar manualmente. Los restantes prototipos sí disponían de conexión a ordenador por lo que todas las lecturas se recogían mediante el programa de control del prototipo a través del ordenador (Figura 2.15).

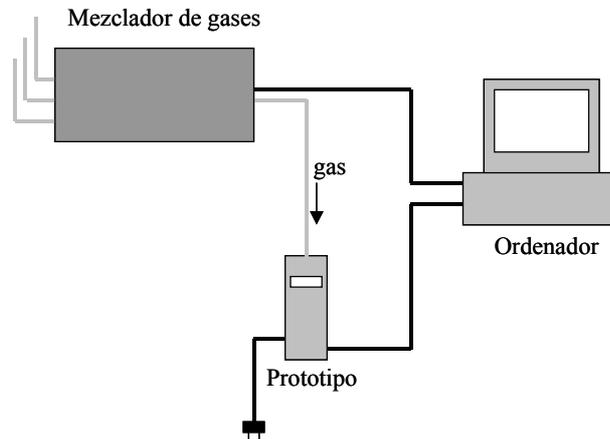


Figura 2.15 Esquema del mezclado de gases.

3.2.4. Preparación de mezclas de gases de composición conocida.

La preparación de las mezclas de gases se hizo con el mezclador de la Figura 2.16, en el cual dispone de tres canales de entrada de gas, en el que cada uno puede llevar un caudal desde 0 a 5 Ln/min, donde litros normales (Ln) se refieren al volumen de gas a presión atmosférica y a una temperatura de 20°C. El caudal de gas se controla mediante un controlador de flujo másico operado mediante un software que permite programar la composición deseada. Los gases procedentes de cada canal se hace llegar a la torre de mezcla saliendo con un porcentaje conocido, desde donde se dirige al portamuestras para ser usado en el espectrofotómetro de luminiscencia o directamente a los prototipos de medida desarrollados. El sistema mezclador de gases fue calibrado por la empresa suministradora inmediatamente antes de su instalación en el laboratorio de instrumentación en el que se encuentra. El porcentaje de oxígeno más bajo que se puede preparar con este sistema

mezclador con tres canales de entrada de gas es del 1% cuando se trabaja con la botella de 100% de O₂, que fue la usada por nosotros y de 0,05% y 0,01%, para el caso de CO₂, en el que se utilizaron botellas de 1% y 5% de CO₂, respectivamente.

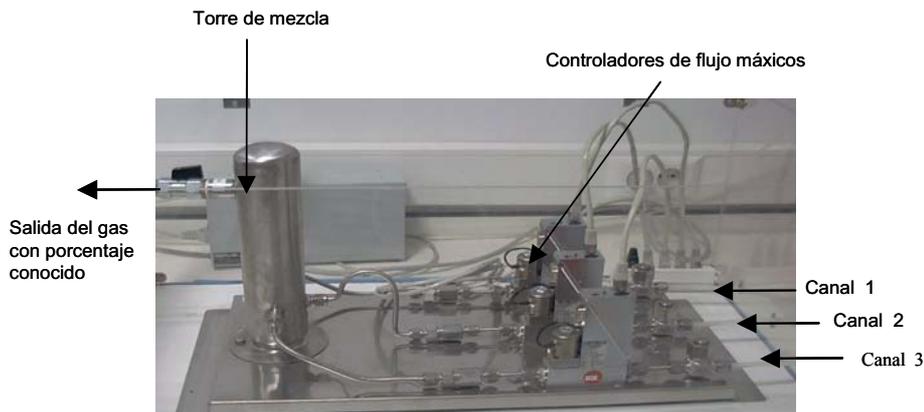


Figura 2.16 Sistema mezclador de gases.

3.2.5. Estudio de la temperatura.

El estudio de influencia de la temperatura sobre la respuesta se hizo con el prototipo P04. Para ello, se introdujo el prototipo en un armario termostático de diseño propio en el que podemos mantener constante temperaturas entre -50°C y $+50^{\circ}\text{C}$. El armario posee un orificio lateral por donde entra el tubo con el gas, el cable de conexión del prototipo al ordenador, que nos permite monitorizar las medidas en todo momento, y el cable de alimentación del prototipo. Con el fin de realizar estos estudios se registraron las señales obtenidas bajo diferentes concentraciones de gas, obtenidas con el mezclador de gases, y a diferentes temperaturas.

3.3. Caracterización de la instrumentación desarrollada.

3.3.1. Optimización

Para establecer la composición más adecuada de la membrana sensora se han empleado sistemas de optimización monofactor ya que la interacción entre las variables se ha comprobado que es mínima.

3.3.2. Parámetros de calidad

Las propiedades analíticas de calidad que se pueden utilizar para caracterizar las membranas desarrolladas y los prototipos de instrumentación portátil que las integra son las siguientes:

3.3.2.1. *Exactitud*

Cercanía del valor medido al considerado como valor verdadero. Este valor verdadero se define como el que se obtendría si el proceso de medida fuese perfecto. Tal definición da un valor desconocido, la forma de proporcionar un valor para esta magnitud es medirla con un sistema y método de medida considerado más perfecto que el que se está desarrollando y denominado genéricamente como instrumento de referencia.

Esta cercanía se cuantifica indicando la medida como el valor observado por nuestro método con un entorno de incertidumbre. Este entorno de incertidumbre es una estimación estadística de la posible magnitud del error cometido al medir. La magnitud de la incertidumbre se deriva del conocimiento del modo en el que se hace la medida y de las prestaciones del equipamiento usado para tal fin.

3.3.2.2. *Rango de aplicación*

Es el intervalo de concentraciones o cantidad de analito, acotados por un límite superior, esto es el máximo valor de concentración a la que se ha aplicado el método analítico y se ajusta al modelo matemático, y el límite inferior, que se puede definir de

diversas maneras. Habitualmente aquella que ha podido ser determinada con precisión, exactitud y linealidad usando el método analítico. En nuestro caso, el límite inferior viene dado por la concentración más baja de analito que podemos conseguir con el mezclador de gases y que origina una respuesta con las características adecuadas por nuestra membrana o prototipo instrumental.

3.3.2.3. *Repetibilidad*

Es la precisión, expresada como desviación estándar relativa (DER) de un cierto número de medidas repetidas bajo las mismas condiciones tanto de operador como instrumento y a corto plazo. Es un parámetro indicativo del grado de incertidumbre que debemos esperar de los resultados analíticos. Se ha evaluado a varios niveles de concentración.

En nuestro caso, al ser sensores reversibles, se pueden definir dos tipos de precisión, entendidas como repetibilidad o precisión intrasensor y precisión intersensor. La primera de ellas indica la precisión de la medida utilizando el mismo sensor. La precisión intersensor considera la variabilidad que introduce el empleo de un sensor diferente en cada réplica; esto es, introduce la variabilidad de construcción de cada membrana sensora.

3.3.2.4. *Repetibilidad o precisión intermedia*

Se realizan una serie de medidas de una muestra en las mismas condiciones a lo largo de un periodo mayor de tiempo que en el caso anterior, y se calcula la desviación estándar de esas lecturas, por ejemplo variaciones por medida día a día.

3.3.2.5. *Reproducibilidad*

Es la medida de la precisión del método pero cambiando tanto el operador, como el sensor, el laboratorio a más largo plazo. Una reproducibilidad de dos o tres veces la repetibilidad se considera un valor aceptable.

3.3.2.6. *Precisión*

Variación en el resultado cuando se repite el proceso analítico; incluye la repetitividad, la precisión intermedia y la reproducibilidad.

3.3.2.7. *Linealidad*

Expresa el grado de coincidencia entre la curva de calibración y una línea recta determinada. Sobre esta característica es necesario hacer algunas consideraciones. Para que un instrumento sea válido no es condición indispensable que sea lineal. El interés de la linealidad está en que la conversión lectura-valor medido es más fácil si sólo hay un factor multiplicativo entre ellas. Actualmente, con la posibilidad de procesamiento de señal que dan los microprocesadores a la instrumentación, interesa más la repetibilidad que la linealidad.

3.3.2.8. *Sensibilidad*

La sensibilidad de un método analítico o sensibilidad de calibrado se expresa por el valor de la pendiente de la función de calibrado. Para el caso del oxígeno el valor de la pendiente se define como la constante de Stern-Volmer. En el caso de la calibración con dióxido de carbono será la pendiente de los modelos lineales utilizados. También se puede expresar la sensibilidad de los métodos propuestos como el cociente entre la señal obtenida a la máxima concentración ensayada y la mínima, S_{100}/S_0 .

3.3.2.9. *Resolución y límite de detección*

Es el incremento mínimo en la entrada del sistema de medida para el cual se obtiene un cambio en su salida. Cuando el incremento de la entrada se produce a partir de cero, se habla de límite de detección.

3.3.2.10. *Selectividad*

Capacidad del método para medir una especie de analito en presencia de otros elementos o compuestos presentes. Para establecer la selectividad hemos medido la respuesta de posibles gases interferentes con el prototipo de instrumentación desarrollada.

3.3.2.11. *Tiempo de respuesta*

En este tipo de sensores, lo definimos como el tiempo de respuesta que es el tiempo que transcurre desde que se sitúa el sensor una atmósfera dada hasta que se obtiene el 90 % de la señal máxima, cuando se expone a atmósferas alternativas oxígeno- nitrógeno o dióxido de carbono- nitrógeno. También diferenciamos entre el tiempo de subida de la señal o tiempo de respuesta y tiempo de bajada de la misma o tiempo de recuperación. Para el caso del oxígeno, lo denotamos como: $t_{\downarrow} (N_2 \rightarrow O_2)$ y $t_{\uparrow} (O_2 \rightarrow N_2)$, mientras que para el dióxido de carbono es: $t_{\downarrow} (N_2 \rightarrow CO_2)$ y $t_{\uparrow} (CO_2 \rightarrow N_2)$.

3.3.2.12. *Deriva*

Se define como el porcentaje de variación de la señal originada por envejecimiento de membrana sensora y la instrumentación con el tiempo.

3.3.2.13. *Coste estimado*

El coste estimado del prototipo desarrollado se ha calculado como la sumatoria del coste prorrateado de cada una de las materias y materiales que lo componen. Siendo estas por su calidad y por sus proporciones mucho más caras que si se tratase de una fabricación industrial. Por otro lado, no está contemplada en esta estimación el coste de mano de obra dedicado a la fabricación del sensor; por lo que no deja de ser esta una estimación, que sin duda está muy por debajo de su coste real en una fabricación industrial en serie.

Dentro de este conjunto extenso de parámetros de calidad los hay de mayor y menor importancia. Hay incluso algunos que incluyen a otros o incluso aquellos que reflejan las mismas cualidades desde puntos de vista distinto. Dados los resultados que se derivan de este trabajo de investigación y el carácter no lineal del método obtenido, nosotros nos centraremos en cuantificar las siguientes magnitudes:

- Exactitud, indicada como tanto por ciento de la concentración observada. En este parámetro estimados la incertidumbre a partir de la precisión (repetitividad, precisión intermedia y reproducibilidad).

- Resolución, indicada igualmente como tanto por ciento de la concentración observada. Al ser un método no lineal, la estimamos en el peor caso del rango.
- Rango de aplicación.
- Límite de detección.
- Tiempo de respuesta y tiempo de recuperación, dados en segundos.
- Deriva, expresado como tanto por ciento de la lectura por día.
- Selectividad: se hará un estudio minucioso de distintos interferentes y se indicará la concentración máxima de ellos permitida en la mezcla para considerar la lectura del analito como válida.

A estos parámetros añadiremos otro instrumental para dar cuenta de la vida de la alimentación autónoma con baterías:

- Consumo promedio.

4. Validación del método analítico

Podemos considerar la validación de un método analítico como una verificación de la exactitud de los resultados que genera el método de análisis en su doble versión: estimación de la precisión y comprobación de la veracidad.

El protocolo aplicado en esta Memoria de Doctorado para la validación de los prototipos desarrollados ha sido el de la comparación de los resultados obtenidos en las determinaciones realizadas para varias concentraciones de analito con el prototipo desarrollado y los obtenidos con un instrumento comercial usado de referencia. Para ello, una vez realizados los análisis por ambos métodos con un número razonable de réplicas debemos:

Comparar las varianzas:

Para ello se utiliza el test de Snedecor que consiste en calcular un estadístico F_{cal} y compararlo con el tabulado F_{tab} para un valor de α , n_1-1 y n_2-1 .

$$F_{\text{cal}} = \frac{S_1^2}{S_2^2} \quad (2.3)$$

Siendo S_1 y S_2 las desviaciones estándar obtenidas con ambos métodos, debiendo cumplirse que $S_1 > S_2$.

Si $F_{\text{cal}} \geq F_{\text{tab}} \equiv$ Las varianzas son significativamente distintas

Si $F_{\text{cal}} < F_{\text{tab}} \equiv$ Las varianzas no difieren significativamente

Según el resultado de este test deberemos considerar diferentes formas de comparar las medias, según que las varianzas sean iguales o distintas.

Varianzas iguales

Se calcula una varianza promedio que viene definida por la expresión:

$$S_p^2 = \frac{(n_1 - 1) \cdot S_1^2 + (n_2 - 1) S_2^2}{n_1 + n_2 - 2} \quad (2.4)$$

Una vez obtenida dicha varianza se calcula el estadístico t_{cal} según la expresión:

$$t_{\text{cal}} = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{\sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}} \quad (2.5)$$

De la misma forma que antes, se compara con un valor tabulado t_{tab} para α , n_1+n_2-2 .

Si $t_{\text{cal}} \geq t_{\text{tab}} \equiv$ Las medias son significativamente distintas

Si $t_{\text{cal}} < t_{\text{tab}} \equiv$ Las varianzas no difieren significativamente

Varianzas distintas.

En este caso el valor del estadístico t_{cal} se obtiene mediante la expresión siguiente

$$t_{\text{cal}} = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{\sqrt{\frac{S_1^2}{n_1} + \frac{S_2^2}{n_2}}} \quad (2.6)$$

En este caso debemos de utilizar además una expresión algo más compleja que antes para calcular los grados de libertad, g.l., como vemos en la expresión:

$$g.l. = \frac{\left(\frac{S_1^2}{n_1} + \frac{S_2^2}{n_2} \right)^2}{\frac{\left(\frac{S_1^2}{n_1} \right)^2}{n_1 - 1} + \frac{\left(\frac{S_2^2}{n_2} \right)^2}{n_2 - 1}} \quad (2.7)$$

Por comparación con el valor tabulado t_{tab} para α y g.l.

Si $t_{\text{cal}} \geq t_{\text{tab}} \equiv$ Las medias son significativamente distintas

Si $t_{\text{cal}} < t_{\text{tab}} \equiv$ Las varianzas no difieren significativamente.

El instrumento comercial usado para la validación ha sido el MicroPac Plus para la monitorización de O_2 basado en un sensor electroquímico, con rango de medición de 0-25% y una exactitud de $\pm 1\%$ de O_2 (Dräger Safety AG, Lübeck, Alemania).

CAPÍTULO 3

PROTOTIPOS DESARROLLADOS

1. Introducción

En este Capítulo se presentan los diferentes prototipos de instrumentos electrónicos desarrollados para la medida de oxígeno y dióxido de carbono. Se han diseñado, fabricado y evaluado por parte del grupo de investigación TIC-105 del Departamento Electrónica y Tecnología de Computadores de la Universidad de Granada, cuatro prototipos para la determinación de oxígeno y dióxido de carbono que se denominan cronológicamente P01, P02, P03 y P04 y que muestran la evolución que se ha seguido en el estudio abordado en este trabajo.

En este capítulo se enumeran los objetivos que se han tratado de alcanzar en la fabricación de estos prototipos, el principio de medida en el que se basan, mostrándose así mismo también los diagramas de bloques, la zona sensora, los componentes más relevantes, las limitaciones y el esquemático de cada uno de ellos, indicando a modo de resumen las características técnicas alcanzadas por el prototipo más avanzado, P04

2. Objetivos

En este apartado comentaremos los objetivos que tratamos de cubrir con la realización y puesta a punto de estos sistemas electrónicos de medida de gases, de acuerdo con el sensor diseñado y con las características del usuario final del instrumento. El objetivo general

consiste en la obtención de un sistema portátil de prestaciones aceptables y de fácil uso para personal no entrenado. Tal y como se ha puesto de manifiesto en la Introducción de esta Memoria, creemos que este campo de instrumentación analítica es de gran interés y proyección industrial y de consumo.

En concreto, las propiedades exigidas *a priori* al instrumento son las siguientes:

- Sistema portátil: pequeñas dimensiones y bajo peso.
- Detección rápida y con una resolución suficiente.
- Bajo consumo de energía y alimentación con baterías.
- Fácil manejo y posibilidad de utilización por personal no especialista.
- Interfaz visual, con lectura sencilla de niveles de concentración gaseosa.
- Conexión sencilla con PC para reprogramación de especificaciones y versatilidad del producto final.
- Posibilidad de compensar la temperatura y fácil calibración.
- Sistema mecánicamente robusto.
- Posibilidad de recambio de sensores.

Para la realización de dichos objetivos, se ha realizado un trabajo exhaustivo de búsqueda y utilización de componentes electrónicos y fotónicos para alcanzar un prototipo final de altas prestaciones.

3. Principio de medida

Como es lógico, la propiedad física concreta a medir condiciona el diseño del sistema electrónico completo de adquisición. En este caso, la información se extrae de la emisión

fosforescente de una sustancia sólida donde para obtener la respuesta del sensor, es necesaria una excitación óptica previa. Por lo tanto, dentro del sistema de medida, es necesario el diseño de una etapa sensora que comprenda los dos elementos: fuente de excitación y detector ópticos dentro del espectro visible.

La excitación y medida de señales ópticas tiene algunas dificultades que es necesario solventar:

- Posible inestabilidad de la fuente luminosa: este problema se minimiza cuidando el diseño y realizando la medida en repetidas ocasiones y promediando.
- Contaminación luminosa ambiental: veremos que la colocación de la sustancia sensora directamente sobre el detector solventa en gran medida esta interferencia.
- Alineación y estabilización mecánica de la zona sensora: se consigue con conectores y zócalos disponibles comercialmente que fijan la distancia entre fuente y detector y alinean todo el sistema.

A continuación se analizan las posibilidades que nos ofrece la tecnología de semiconductores actual para estos componentes. Para el caso de la fuente luminosa, dada la selectividad necesaria en la longitud de onda de emisión, tenemos *a priori* dos posibilidades:

1. Diodo láser (LD).
2. Diodo emisor de luz (LED).

Sus características relevantes a este sistema se resumen en la Tabla 3.1.

De acuerdo con estos parámetros, y dada la mayor disponibilidad de longitudes de onda de emisión del LED, y que los valores del resto de sus parámetros son suficientemente buenos, la fuente luminosa elegida fue el diodo emisor de luz.

Tabla 3.1. Comparativa de elementos emisores de luz.

	Diodo Láser	Diodo emisor de luz
Ancho espectral	Muy estrecho	Estrecho
Intensidad	Muy alta	Media-Alta
Consumo	Alto	Medio-Bajo
Precio	Alto	Medio-Bajo

A continuación, se detalla la forma operativa en que el sistema de medida adquiere y procesa la información para la obtención final de las salidas útiles al usuario. En el diagrama de flujo (Figura 3.1) se resume la forma de obtener la concentración de gas ambiental. Tras el inicio, se adquiere la temperatura para su posterior uso en la corrección final de la lectura con este parámetro. El microcontrolador, elemento central de control y procesamiento del instrumento, inicia la excitación luminosa, con una respuesta por parte del detector en estado alto, el tiempo que la intensidad de la fosforescencia está por encima de un determinado umbral. Para realizar la conversión eficaz de ese tiempo a una variable numérica, primero se realiza su conversión a una señal de alta frecuencia, mediante la multiplicación por una señal de reloj de alta frecuencia. A continuación, mediante un contador, se realiza la conversión del tren de pulsos de alta frecuencia al valor numérico determinado. Este proceso se repite un número suficiente de veces, promediando el resultado, para minimizar los errores por derivas de los elementos ópticos y sensor.

Por último, este valor se convierte a la concentración final mediante la aplicación de las curvas de calibración corregidas en temperaturas previamente introducidas en el microcontrolador. Este valor aparece en el visor LCD, junto con la temperatura y es posible su comparación con un umbral inferior prefijado que dispara una alarma sonora. Las curvas de calibración mencionadas han sido obtenidas en el laboratorio mediante la operación controlada del instrumento para diferentes concentraciones del gas y a distintas temperaturas.

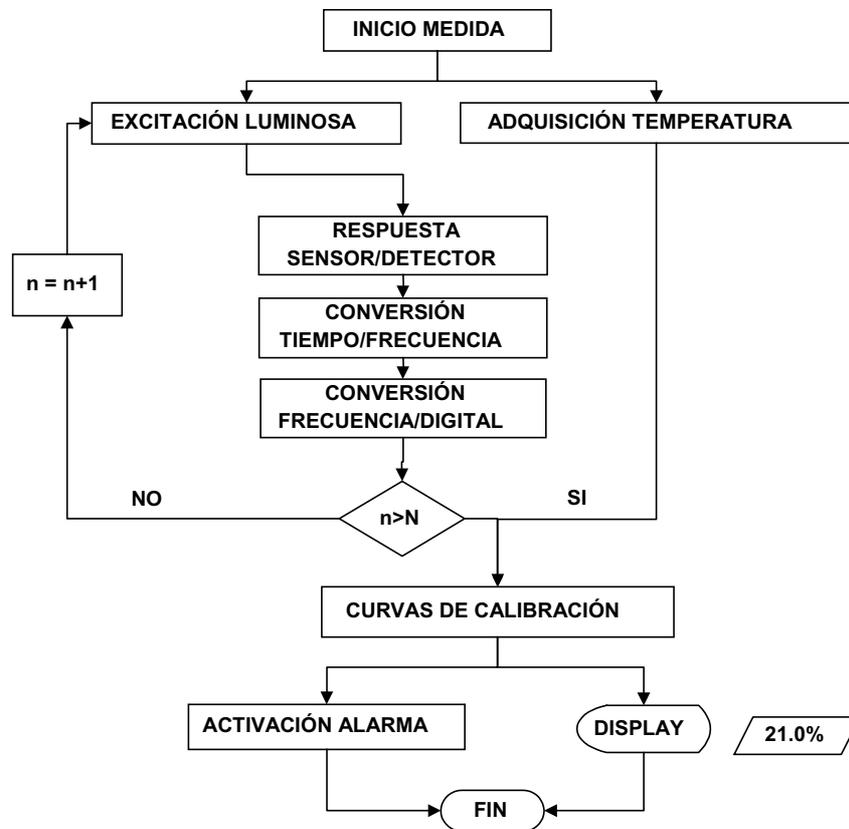


Figura 3.1. Diagrama de flujo del algoritmo de medida.

Un aspecto novedoso de esta forma de medida parte del uso de un elemento fotodetector con salida binaria cuyo valor de salida digital depende de que la intensidad luminosa recibida, esté por encima o por debajo de un umbral determinado. De manera, que al comenzar la emisión fosforescente, la intensidad luminosa se mantiene por encima de dicho umbral, produciendo una salida en estado alto del dispositivo fotodetector. Cuando decae la misma y rebasa el umbral fijado, se produce la transición de la salida del mencionado fotodetector a estado bajo con un retardo de pocos microsegundos. Es decir, con esta disposición, a la salida del fotodetector, tenemos una señal en estado alto hasta que la intensidad fosforescente decae por debajo un determinado umbral de luminosidad. El

comienzo de la mencionada señal en estado alto se fija cuando cesa la alimentación al diodo emisor de luz mediante los circuitos lógicos adecuados y las señales de control de la unidad central de proceso. Por tanto, no se trata de una medida de la intensidad o del tiempo de vida de la emisión, ni de la integración de la corriente producida por los fotodetectores convencionales al ser excitados con una señal luminosa, sino de un parámetro temporal en el que intervienen ambas características de la emisión luminosa (Figura 3.2).

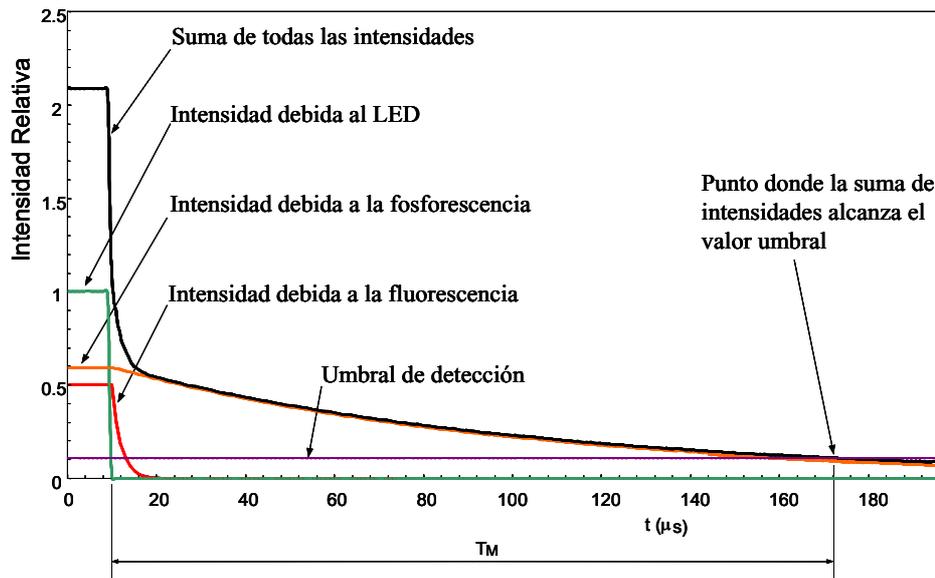


Figura 3.2. Conversión de la información en la duración de un pulso eléctrico.

Para cuantificar con gran resolución la anchura del pulso correspondiente a la fosforescencia, lo multiplicamos con una señal pulsante de alta frecuencia mediante la circuitería electrónica adecuada como se esquematiza en el cronograma del procesado de la señal (Figura 3.3). Esta operación se realiza un gran número de veces con el objeto de obtener el promediado sobre un número elevado de medidas y disminuir el error. Es decir, si hacemos una cuenta de todos los pulsos introducidos en cada uno de las medidas a lo largo de un periodo de tiempo establecido y dividimos por el número de medidas obtenidas, podemos establecer con gran exactitud cuantos pulsos tenemos en cada caso y, por tanto, la

medida de éste con gran precisión. La atenuación de la fosforescencia por parte del oxígeno permite obtener valores de conteo diferentes dependiendo de la cantidad de oxígeno presente. La mejora de la relación señal-ruido con esta técnica es de un factor igual a la raíz cuadrada del número de medidas promediadas.

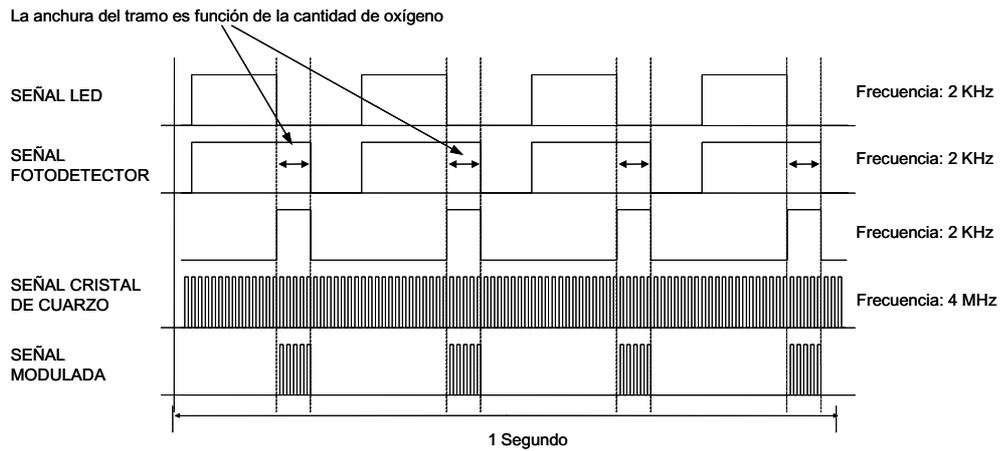


Figura 3.3. Cronograma del procesado de la señal.

La resolución alcanzada por el método y el sistema de medida salvo el sensor está por debajo del 0.1 % de concentración de oxígeno. Como se podrá observar, la incertidumbre que cuantifica la exactitud en las especificaciones técnicas del prototipo final es sensiblemente mayor debido a que vienen limitadas por la repetitividad y reproducibilidad del sensor. En este caso se ha tomado dos veces la desviación típica de dicha caracterización como error de la medida. Estos mismos parámetros nos han llevado a mostrar los resultados con una resolución de 0.5 % en concentración para el oxígeno.

4. Prototipo P01

El prototipo P01 fue el primero diseñado capaz de medir la señal fosforescente emitida por el compuesto luminiscente atrapado en las membranas sensoras sensibles a

oxígeno desarrolladas. Señal fosforescente que depende de la proporción de oxígeno presente. En este desarrollo inicial no se planteó ni el control de temperatura ni por tanto su corrección.

Para el caso del prototipo P01, la medida se hizo con dos canales, por lo que fue necesario usar dos LED y dos fotorreceptores obteniéndose los resultados por comparación de dos canales, uno de medida y otro de referencia. Para ello, se generaban señales luminosas pulsantes del orden de 2 KHz con ayuda de dos diodos LED de alta intensidad. Una de estas señales pulsantes síncronas se hacía llegar a una membrana sensora que contenía el compuesto luminóforo, mientras que la otra se hacía llegar a una membrana que no contenía luminóforo. Ambas señales eran recogidas por los fotorreceptores, previo paso a través de un filtro óptico que eliminaba parte de la radiación de la fuente y dejaba pasar la fosforescencia resultante. Las dos señales recibidas se amplificaban en amplificadores operacionales a muy alta ganancia para así obtener una señal cuadrada en cada uno de ellos, aunque con duración diferente una debido a la fosforescencia producida en una de las membranas. La circuitería digital adecuada proporciona la diferencia de duración de ambos canales, extrayéndose la información de la concentración de oxígeno.

4.1. Diagrama de bloques

El instrumento consta de los siguientes bloques: 1) Unidad de control (CPU), 2) unidad de presentación de datos (LCD), 3) circuitos de temporización del sistema, 4) fuente de señal y 5) unidad de tratamiento de la señal. En la Figura 3.4 se presenta este diagrama de bloques.

- Unidad de control

El microcontrolador usado es el PIC 16F84-4 de la empresa Microchip. Es un microcontrolador de 8 bits construido en tecnología CMOS de altas prestaciones y bajo costo. Puede trabajar con frecuencias de hasta 4 MHz y permite la conexión externa de distintos periféricos hasta un total de 13 pines de control. Internamente viene provisto de una memoria EEPROM de 1 Kb de memoria para programa, 36 bytes de memoria para registros

internos (SRAM) y 64 bytes de memoria EEPROM para almacenamiento de información. La unidad de control será la encargada del control del instrumento, de hacer todos los cálculos necesarios y de la presentación en pantalla del resultado obtenido.

- Pantalla (LCD)

Se trata de una pantalla de tipo LCD fabricado por Toshiba (ref. C-2602) suministrado por Fadisel S.L de dos líneas por 16 caracteres alfanuméricos, no retroiluminado y de 2x16 cm de tamaño. Tiene comunicación de tipo paralelo con el microcontrolador.

- Circuitos de temporización

Consta de una serie de circuitos contadores/divisores gobernados por un cristal de cuarzo de 4 MHz con una precisión de 5 ppm, el cual también genera la señal de reloj necesaria para el funcionamiento del microcontrolador.

- Módulo sensor

Consta de: 1) dos diodos emisores de luz de alta intensidad suministrados por Farnell S.L. de 5 mm Ø, de 530 nm, de 10000 mCd y 15° de ángulo de visión; 2) un soporte plástico de Mylar que contiene dos membranas sensibles a oxígeno, una de ellas contiene el complejo octaetilporfirina Pt(II) (membrana sensora) y otra que no contiene luminóforo (membrana de referencia); 3) un filtro óptico fabricado en material plástico y de absorción de radiación centrada a 650 nm; 4) dos fototransistores de Farnell S.L. (ref. 327-440) de 7,5 mm² de área activa, 100° de ángulo medio y tiempo de respuesta 3,5 µs y 5) una unidad de amplificación de la señal resultante.

- Unidad de tratamiento de la señal (lógica acondicionadora)

Consta de una serie de circuitos lógicos de tecnología CMOS encargados de la conversión de la señal resultante, obtenida de los fotorreceptores, en una frecuencia estable medible por la CPU.

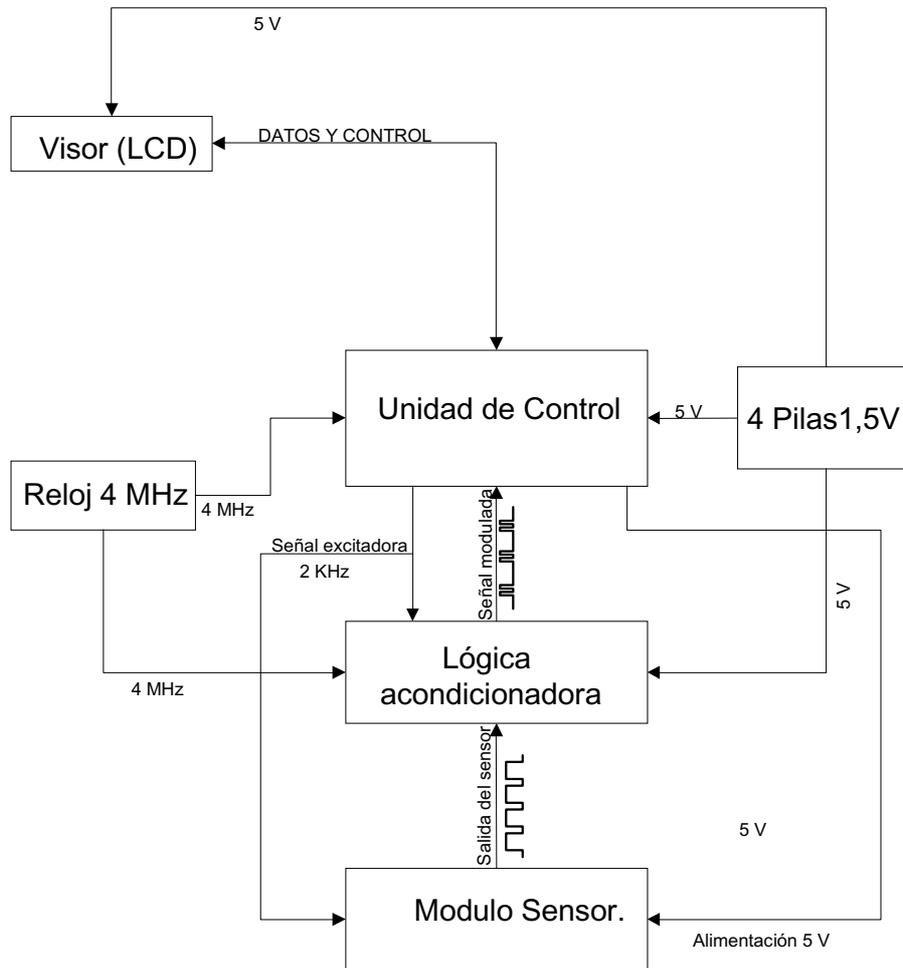


Figura 3.4. Diagrama de bloques del prototipo P01.

4.2. Zona sensora

La zona sensora diseñada para el prototipo P01 consta de dos LED, uno de referencia y otro de medida y de dos fotorreceptores que se alinean con la ayuda de una pieza de metacrilato pintada de negro en la que se colocan también las membranas de medida y de referencia y el filtro óptico, tal y como se indica en la Figura 3.5.

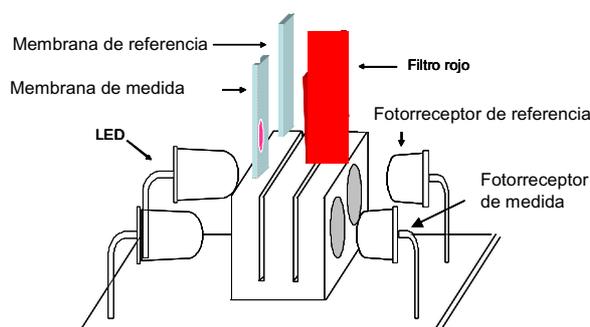


Figura 3.5. Zona sensora del prototipo P01.

4.3. Componentes relevantes

- Selección del LED

De todas las fuentes que se pueden usar para excitar la emisión fosforescente (lámparas flash, lámparas de wolframio, láser y diodos emisores de luz (LED)), son preferibles estas últimas debido a que proporcionan una fuente de radiación barata, de bajo consumo de potencia y que se calienta poco. Presenta, sin embargo, el problema de que la frecuencia de la radiación emitida se concentra en una banda muy estrecha, lo que hace que sea necesario elegir bien el LED para que pueda excitar la fosforescencia de la membrana sensora, pudiendo ocurrir que no exista comercialmente aquel que necesitamos.

Considerando la molécula luminófora elegida, el complejo octaetilporfirina Pt (II), y el material de membrana, es necesario excitar la fosforescencia en un intervalo de longitudes de onda centrado 535 nm, que es donde se encuentra el máximo de excitación de este luminóforo. Para seleccionar el LED más adecuado se registraron los espectros de emisión de diferentes LED existentes en el mercado (Figura 3.6). En dicha figura se ha superpuesto el espectro de excitación de PtOEP, observando que el máximo solapamiento se encuentra cuando se emplea un LED verde de 530 nm (el denominado comercialmente *True green*). De los diferentes LEDs existentes en el mercado, en el momento de preparar este prototipo, se

seleccionó un LED verde de 5 mm \varnothing , de λ_{em} 530 nm, de 10000 mCd y 15° de ángulo de visión suministrado por Farnell S.L.

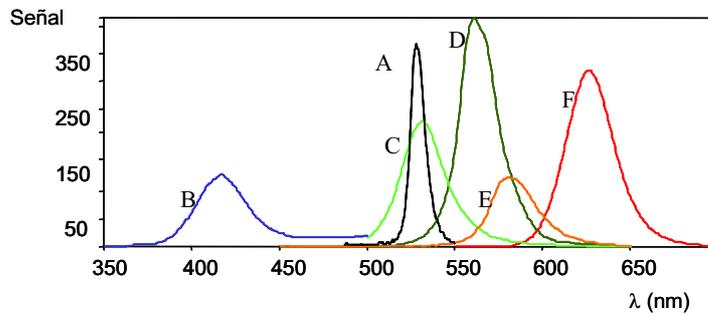


Figura 3.6 Espectros de emisión. A) Luminóforo, B) LED azul 416nm C) LED verde 533nm D) LED verde 560 nm E) LED naranja 580 nm y F) LED rojo 627 nm.

- Selección del fotorreceptor

Para optimizar la sensibilidad de una membrana sensora dada, el espectro de emisión del luminóforo disperso en la membrana debe ser compatible con la zona de máxima sensibilidad del detector elegido. Si la emisión es de longitudes de onda, entre 200 y 600 nm, la emisión se puede medir con la mayor parte de los tubos fotomultiplicadores existentes, sin embargo para mayores longitudes de onda, entre 600 y 1000 nm, es ventajoso utilizar sistemas de detección de estado sólido, pues son más pequeños y baratos. Para nuestro caso, en que la emisión se encuentra sobre 650 nm es adecuado usar fototransistores. Se ha seleccionado un fototransistor suministrado por Farnell S.L. (ref. 327-440), de 7,5 mm² de área activa, 100° de ángulo medio, con máxima respuesta centrada a 690 nm y un tiempo de respuesta de 3,5 μ s.

- Filtros ópticos

Necesitamos seleccionar un filtro óptico que deje pasar sin atenuación la emisión fosforescente del luminóforo y elimine la radiación procedente de la fuente, para que ésta no

interfiera con la fosforescencia recogida por el fotorreceptor. En la Tabla 3.2 se muestran la absorción de radiación en el visible y los colores complementarios. Basándose en ello se han seleccionado diferentes posibles filtros. Para ello, se han empleado diferentes plásticos comerciales de diferentes colores con un espesor de entre 0,25 y 0,40 mm a los que se registró el espectro de absorción

De los diferentes plásticos coloreados transparentes ensayados como filtros, el más apropiado es el filtro rojo ya que absorbe a 540 nm, que es donde se encuentra el máximo de emisión del LED verde seleccionado y deja pasar radiación a partir de 600 nm que es donde se observa fosforescencia de la membrana, por este motivo representamos en la Figura 3.7 el espectro de absorción del filtro rojo utilizado en nuestro caso.

Tabla 3.2 Absorción de luz y colores complementarios.

λ (nm)	Color observado	Color que absorbe esa λ
400	violeta	amarillo verdoso
425	azul índigo	amarillo
450	azul	naranja
490	verde azulado	rojo
510	verde	púrpura
530	verde amarillento	violeta
550	amarillo	azul índigo
590	naranja	azul
640	rojo	verde azulado
730	púrpura	verde

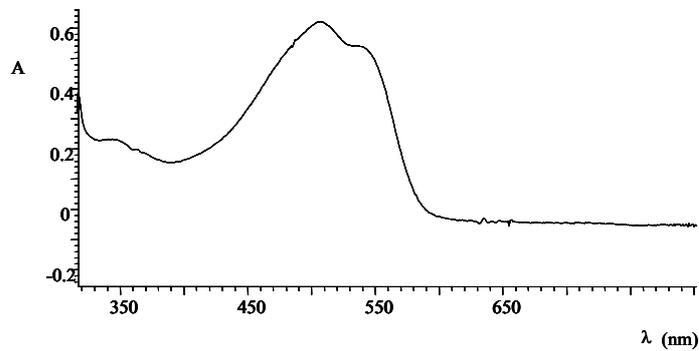


Figura 3.7. Espectro de absorción del filtro rojo.

4.4. Limitaciones del prototipo P01

El prototipo P01 desarrollado es capaz de medir la señal fosforescente y, en consecuencia, medir la concentración atmosférica de oxígeno, pero tiene una serie de limitaciones técnicas que enumeramos a continuación:

- Necesita la inclusión de filtros de radiación para eliminar la interferencia del estímulo luminoso sobre la fosforescencia a recoger. Esto lleva a que la zona sensora sea de difícil diseño, poco robusta y complicada de alinear.
- No tiene salida a ordenador personal.
- Utiliza dos LED y dos fotodetectores.
- El sistema no es robusto y la alineación de componentes es difícil.
- Su tamaño relativamente grande.
- No está optimizado el consumo de energía.

4.5. Esquemático y fotografías

La Figura 3.8 muestra el esquemático del prototipo P01.

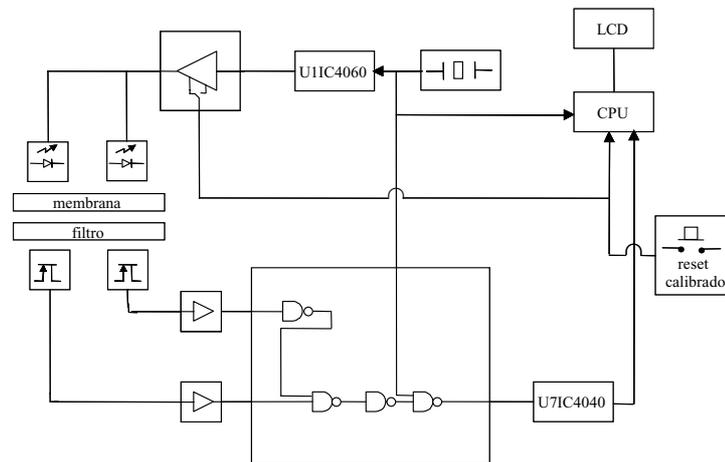


Figura 3.8. Esquemático del prototipo P01.



Figura 3.9 Fotografía del prototipo P01.

5. Prototipos P02 y P03

Para la realización cómoda de pruebas, con el objeto de rediseñar el sistema electrónico, se construyó un nuevo prototipo del oxímetro para la investigación, denominado en adelante P02. Éste se fabricó sobre una placa de prototipos y los diferentes elementos fueron cableados entre sí. El esquema del circuito electrónico está basado en el principio de medida expuesto anteriormente. En esta versión, se agregaron numerosas funcionalidades nuevas que se detallan continuación. El prototipo P03 es básicamente la versión en placa de circuito impreso del P02. Las funcionalidades de ambos prototipos son idénticas, con la diferencia de tamaño y mejora de ergonomía a favor de la versión P03.

5.1. Diagrama de bloques

En la Figura 3.10 se muestra el diagrama de bloques por funcionalidades del instrumento y de las señales que los interrelacionan. Consta de los siguientes módulos:

- **Módulo de Alimentación:** suministra al resto del circuito la alimentación regulada (5 V) necesaria. El instrumento puede operar mediante una batería estándar interna de 9 V tipo PP3 (LR6) o mediante la conexión externa de un transformador cuya salida posea un valor “rms” comprendido entre 8 V y 14 V.
- **Reloj 4 MHz:** produce una señal senoidal de 4 MHz que se emplea como reloj de la unidad de control y como base de tiempos para la medida.
- **Unidad de Control:** se encarga de controlar el resto de subsistemas y del procesamiento de la información; es el cerebro del sistema.
- **Módulo Sensor:** a partir de la señal excitadora y de la concentración de oxígeno genera un tren de pulsos de 2 KHz de frecuencia y anchura variable. También proporciona la lectura de temperatura a la unidad de control.

- Lógica Acondicionadora: genera, empleando la señal excitadora, la señal de salida del sensor y la señal de reloj de 4 MHz, un tren de pulsos a partir del cual, la unidad de control puede calcular la concentración de oxígeno.
- Módulo de Comunicaciones: Actúa de interfase entre la unidad de control y el ordenador personal. Convierte los niveles de tensión TTL (0-5 V) a niveles de tensión estándar RS-232 (± 12 V). La velocidad de transmisión es de 9600 baudios.
- Pantalla de cristal líquido (LCD): Consta de 16 caracteres y dos líneas. Presenta las medidas al usuario y es gestionado por la unidad de control.

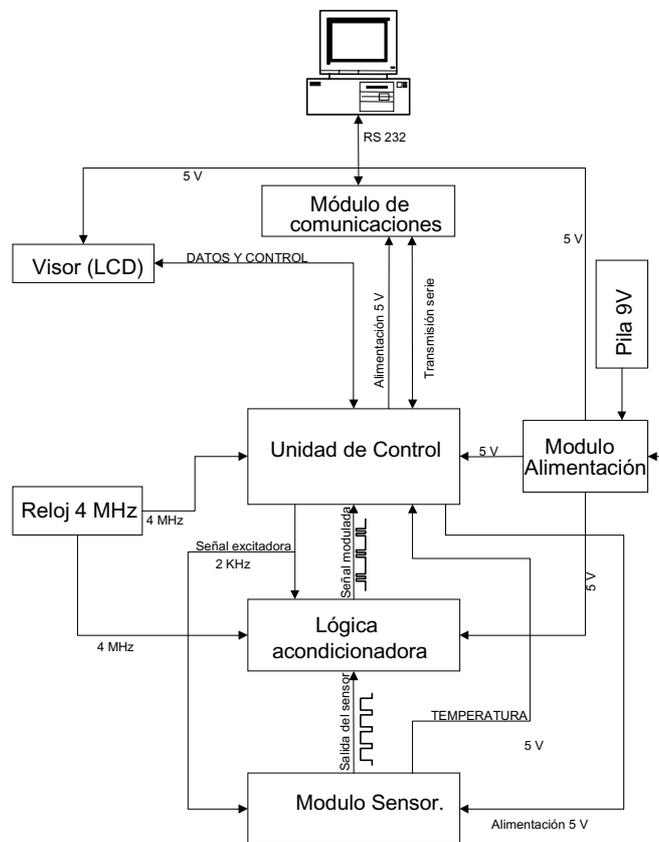


Figura 3.10. Diagrama de bloques prototipo P02 y P03.

5.2. Zona sensora

El prototipo P02 se ha usado en dos configuraciones distintas. En la primera de ellas existen la membrana y el fotodetector como elementos diferenciados (Figura 3.11) mientras que en la segunda configuración se emplea un fotodetector modificado sobre el que se ha dispuesto una capa sensora, de forma que no necesita una membrana intermedia (Figura 3.12).

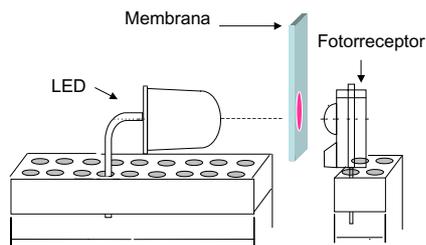


Figura 3.11. Zona sensora del P02 usando membrana.

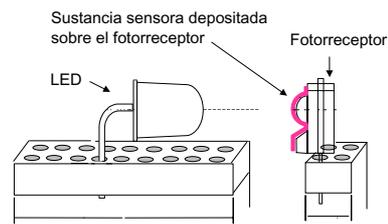


Figura 3.12. Zona sensora del P02 usando la sustancia sensora depositada sobre el fotodetector.

5.3. Componentes relevantes

Cabe destacar los siguientes componentes como mejora sustancial frente a lo previamente desarrollado:

- Se usó un fotodetector de infrarrojo, IS486, centrado a una longitud de onda 900 nm y suministrado por RS Amidata. Se trata de un fotodetector de recepción lateral con disparador Schmitt en encapsulado plástico de 3 mm. Consta de un fotodiodo, un amplificador, un regulador de voltaje y un disparador Schmitt, junto con salidas transistorizadas no inversoras. Tiene un ángulo de recepción estrecho y es compatible con TTL y LSTTL. Alimentado entre 0 y 5 V proporciona estas salidas digitales si la intensidad luminosa recibida está por debajo o por encima de un umbral luminoso, respectivamente. Este umbral es lo suficientemente bajo, 30 lux típicamente, como para configurar un receptor de muy alta sensibilidad.

- Se dotó al sistema de un microcontrolador más potente en previsión de futuras necesidades. Se pasó del modelo PIC16F84 al PIC16F873, que añade como funcionalidades más relevantes, más puertos de entrada/salida, elementos contadores y convertidor analógico/digital de 10 bits, más memoria de datos y programa.
- Se incluyó un circuito (MAX232) para comunicar el sistema con un ordenador personal a través de comunicación por puerto serie, RS-232 y así facilitar el estudio.
- Debido a su carácter de prototipo de pruebas y a que debía permitir el estudio de diferentes sustancias químicas (con posibles soportes diferentes), al igual que otros posibles fotodetectores (electrónicos), la zona sensora fue dotada de una gran flexibilidad. Se habilitaron dos conectores, uno para excitadores LED y otro para fotodetectores, que permitían la interconexión de casi cualquier modelo del mercado y la posibilidad de variar la distancia y disposición de los elementos ópticos de la zona sensora. También se dotó al sistema de un conector externo, para poder ampliar la zona de trabajo.
- Se incluyó un sensor de temperatura para estudiar la influencia de ésta en la medida. El sensor seleccionado fue el DS18B20, de Dallas Semiconductor, que proporciona la información en forma digital serie con una resolución mínima de 9 bits en formato estándar *1-wire*.

5.4. Mejoras respecto al P01

La inclusión de los nuevos componentes y la inclusión de nuevas funcionalidades en la programación del microcontrolador permitieron obtener las siguientes mejoras:

- Utilización de todas las prestaciones de un microcontrolador de gama superior al utilizado anteriormente, con el objeto de mejorar la medida, minimizar componentes y robustecer el diseño
- El prototipo P02 no utiliza filtros ópticos. La no necesidad de filtros se debe a que el nuevo fotodetector es más rápido en sus transiciones que el montaje anterior y a la mejor

sincronización en la toma de datos válidos por parte del microcontrolador. También la posibilidad de colocación de la película sensora sobre el propio componente detector ha permitido que ahora la interferencia producida por la luz ambiente se vea muy atenuada. La compatibilidad de ambos materiales ha permitido esta verdadera fusión de ambos elementos (sensor+detector) en un solo elemento con lo que se ha mejorado en fiabilidad, reducción de espacio, precio y estabilidad mecánica del conjunto de la zona sensora.

- La zona sensora se ha rediseñado con un solo canal, prescindiendo del canal de referencia, y sólo necesitar el uso de un LED y un fotorreceptor y no usar filtro; y además se ha reducido en tamaño. La alineación y estabilización mecánica de la zona sensora se consigue con conectores y zócalos disponibles comercialmente que fijan la distancia entre fuente y detector y alinean todo el sistema.
- El prototipo dispone de conexión a ordenador personal por lo que se pueden monitorizar las medidas y se pueden hacer gráficos de recuperación de señal con el empleo alternativo de concentraciones alternas de gas con analito o sin él.
- Se ha incluido un sensor de temperatura y la circuitería necesaria para su control y lectura por el microcontrolador. Este sensor de temperatura permite que hagamos calibrados a diferentes temperaturas y así poder corregir el valor de señal a la hora de mostrar la concentración.
- Se ha desarrollado un programa en Visual Basic 6 para poder automatizar el proceso de toma de datos experimentales, al igual que para poder estudiar los efectos de los diferentes parámetros de medida. Los datos recogidos se pueden almacenar en un archivo con formato .csv el cual es compatible con el programa Microsoft Excel. Mediante el programa también se puede modificar la función de calibración del sistema.
- Inclusión de una botonera en previsión de la agregación de un menú de usuario, implementado en el P03.

5.5. Fotografías

El prototipo P03 es intermedio y presenta funcionalmente las mismas características del P02, aunque con una reducción de tamaño considerable. El prototipo P02 está realizado en una placa de prototipos mientras que el P03 está montado con una placa de circuito impreso. En el prototipo P03 no se realizó ninguna mejora respecto al consumo, ni se dio operatividad a los botones que incluía, salvo la de iluminar la pantalla. Su uso fue para experimentación, mejora del sensor y del diseño y estudio de las posibilidades de miniaturización y robustecimiento del sistema de medida.



Figura 3.13. Fotografía del prototipo P02.



Figura 3.14. Fotografía del prototipo P03.

6. Prototipo P04

El prototipo P04 recoge la experiencia acumulada durante todo el trabajo realizado sobre los prototipos previos. Surgió con la intención de constituir un primer prototipo preindustrial, por supuesto mejorable, plenamente funcional y utilizable en pruebas de campo. Al final de este apartado, se enumerarán las especificaciones técnicas alcanzadas por

este sistema de medida desarrollado. Como detallaremos a continuación, los puntos donde se hizo especial hincapié al introducir esta nueva evolución del diseño fueron:

- Reducción de componentes
- Corrección térmica
- Mejora del consumo de energía
- Métodos de calibración
- Interfase sencilla con el usuario y distintos modos de operación.
- Zona sensora recambiable.

6.1. Diagrama de bloques

En la Figura 3.15 se muestra el diagrama de bloques por funcionalidades del instrumento y de las señales que los interrelacionan, el diagrama es similar al del apartado 1.4.2 para el P02 pero con algunas funciones agregadas que son las siguientes:

- Reloj 32.768 KHz: produce una señal senoidal de 32.768 KHz. Se emplea como base de tiempos cuando el microcontrolador está en modo de espera (*sleep*).
- Teclado: Consta de tres botones permitiendo al usuario actuar sobre el modo de operación del sistema e iluminar la pantalla.
- Modulo de alarma sonora.

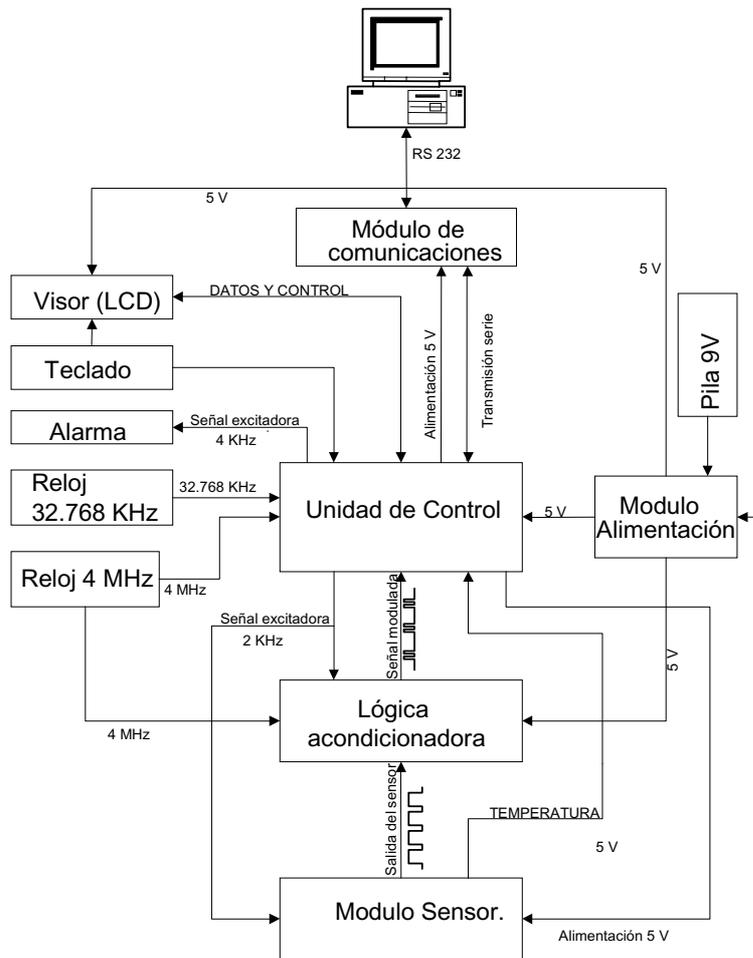


Figura 3.15. Diagrama de bloques del prototipo P04.

6.2. Zona sensora

En este caso no utilizamos membrana sensora, ya que depositamos la sustancia sensora directamente sobre el fotorreceptor. El conjunto LED y fotorreceptor recubierto se soldó sobre una placa de circuito impreso y se le dotó a este conjunto de un conector que permite introducirlo y extraerlo con facilidad de la placa base del instrumento tal como se muestra en la Figura 3.16 con el objeto de poder cambiarlo cuando sea necesario, por ejemplo, por envejecimiento del sensor.

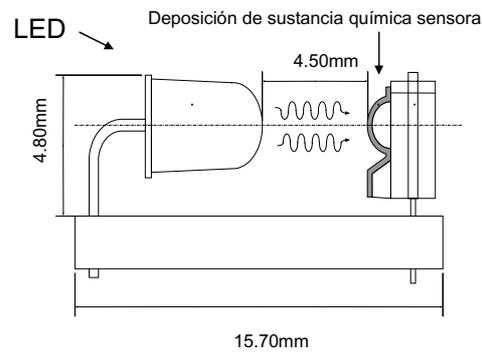


Figura 3.16. Zona sensora del prototipo P04.

6.5. Nuevos componentes relevantes

Los componentes que se han agregado en este prototipo son:

- Módulo reloj 32,768 KHz (MR2). Este módulo genera una señal sinusoidal de 32,768 KHz.
- Zumbador. Transductor de audio cerámico que emite una señal audible cuando la concentración de oxígeno medida está por debajo de un determinado valor.

6.4. Mejoras respecto a los prototipos anteriores

Éste prototipo representa un avance considerable respecto a los anteriores desde varios puntos de vista, en concreto: reducción de componentes, consumo y modos de operación.

- La colocación de la sustancia sensora directamente sobre el detector que solventa en gran medida la contaminación luminosa ambiental y que también mejora la robustez del instrumento y el alineamiento de componentes en la zona sensora.
- Disposición de toda la zona sensora de forma que sea reemplazable en el sistema.

- La alarma sonora permite la audición de una señal audible cuando la concentración de gas está por debajo de un determinado valor.
- Mejora del ahorro en consumo debido al módulo reloj de 32,768 KHz que permite a la unidad de control ser reactivada cada cierto intervalo de tiempo prefijado (15 s) después de entrar en modo de reposo (muy bajo consumo).
- Mejora de la tecnología con el uso de placas de circuito impreso de doble cara y componentes de montaje superficial para reducir tamaño y peso del prototipo.
- Menú de usuario a través de teclado para activar los distintos modos de operación y protocolos de calibración tal y como se muestra en el diagrama de la Figura 3.16.

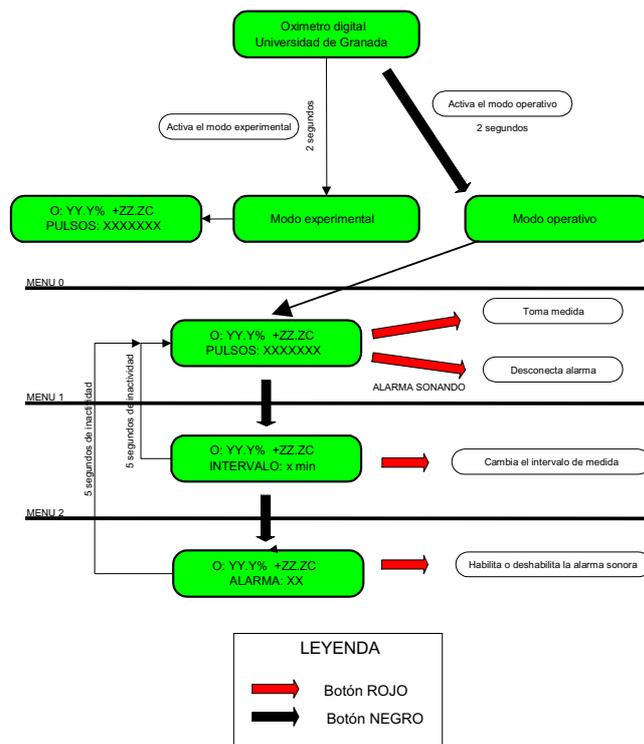


Figura 3.16. Esquema del sistema de menús del modo operativo

- Inclusión de las curvas de calibración para corrección térmica y posibilidad de recalibración con un solo punto. Estos apartados se desarrollarán en detalle en el Capítulo 6.

6.5. Esquemático y fotografías

A continuación mostramos, como en el caso de los prototipos anteriores, el esquemático que sigue el prototipo P04 (Figura 3.17) así como una fotografía de este prototipo (Figura 3.18)

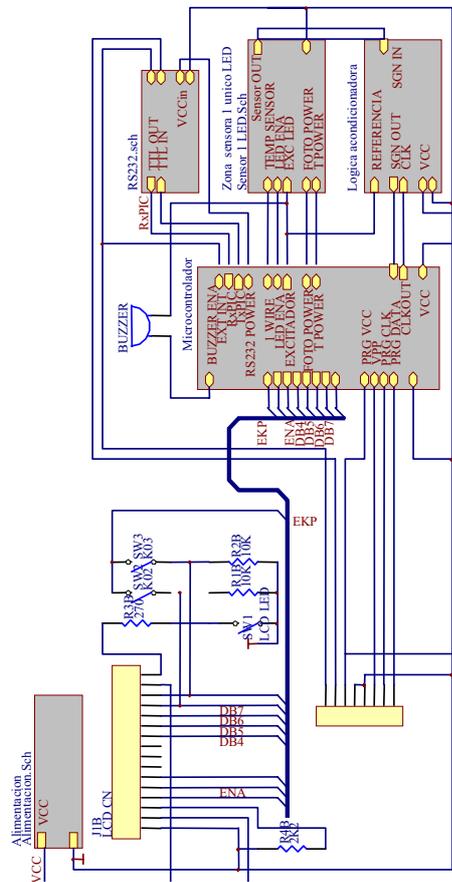


Figura 3.17. Esquemático para el prototipo P04.



Figura 3.18. Fotografía del prototipo P04.

6.6. Características técnicas

Tras su caracterización en el laboratorio, las propiedades técnicas del prototipo desarrollado para la medida de oxígeno ambiental son las siguientes:

- Alimentación: Con batería tipo PP3 de 9 V ó transformador AC/DC de 12 V estándar.
- Corrección térmica en el rango: -10 °C a 50°C.
- Rango de concentración de O₂: hasta el 30 %.
- Límite de detección: 1%.
- Consumo promedio: 8,75 mW.
- Resolución: 0,5 % en concentración.
- Exactitud: 0,6 % en concentración.
- Tiempo de respuesta: < 20 s (10%-90% del rango total).

- Tiempo de recuperación: <50 s (90%-10% del rango total).
- Derivas: <0,01% en concentración/día.
- Dimensiones y peso: (HxLxW) 28mm x 110mm x 66mm. 95 g (sin batería).
- Varios modos de operación:
 - Medida cada minuto.
 - Medida cada 10 minutos.
 - Medida instantánea al presionar un botón.
- Recalibración del sistema en un solo punto (21%).
- Interfases con el usuario:
 - Lectura directa en pantalla.
 - Comunicación con ordenador a través de RS-232.
 - Alarma sonora (inhibible por teclado) por debajo de un umbral de concentración de O₂.

Las características diferenciales del sistema con el sensor de CO₂ son:

- Sensor basado en efecto de filtro interno de la membrana de azul de timol que es sensible a CO₂ sobre el mismo luminóforo usado por el sensor de oxígeno.
- Rango de concentración de CO₂: hasta 5%.
- Límite de detección: 0,2%.
- Tiempo de respuesta: <35 s (10%-90% del rango total).

- Tiempo de recuperación: <235 s (90%-10% del rango total).
- Exactitud: 0,25%.
- Resolución: 0,25%.

**DESARROLLO DE
INSTRUMENTACIÓN PORTÁTIL
PARA OXÍGENO**

CAPÍTULO 4

DESARROLLO DE UN SENSOR

ÓPTICO PARA OXÍGENO.

CARACTERIZACIÓN DEL

PROTOTIPO P01

1. Introducción

En este capítulo se expone el trabajo que se ha desarrollado para poner a punto y caracterizar, mediante instrumentación convencional, membranas sensoras de manera que que respondan a la concentración de oxígeno. Estas membranas fabricadas fueron posteriormente incluidas en un primer prototipo de instrumentación portátil desarrollado capaz de dar una respuesta que dependía de la cantidad de oxígeno del medio y se establecieron sus sus características.

Entre los aspectos mas importantes que se han considerado para el desarrollo del sensor de oxígeno están: el método de detección, el sistema para la preparación de la membrana sensora y la selección de la sustancia indicadora y del material de la matriz.

Para la preparación del sensor para oxígeno se ha utilizado el procedimiento de disolución de componentes en un disolvente orgánico cuya evaporación controlada permite la preparación de la membrana sensora. Para la deposición de esa disolución, a la que denominamos cóctel, sobre el material soporte, se utilizará un sistema centrífugo previamente comentado.

Dicho cóctel se compone de una matriz polimérica, que actúa como medio de inmovilización proporcionando una fase adecuada a los componentes funcionales de la membrana y fácilmente ubicable en un soporte inerte; el luminóforo sensible a oxígeno y, en algunos casos, un plastificante apropiado que actúa regulando la permeabilidad y movilidad del gas dentro de la matriz polimérica.

2. Atenuación de luminiscencia y relaciones cuantitativas.

Antes de pasar a resumir los experimentos realizados y las consecuencias que originan, vamos a comentar las relaciones cuantitativas en que se basan los procesos de atenuación de luminiscencia aquí empleados.

2.1. Ecuación de Stern-Volmer

Los sensores basados en la atenuación de luminiscencia, tanto de fluorescencia como de fosforescencia, de una molécula indicadora M por parte de un analito A, en nuestro caso el oxígeno, se fundamentan en los procesos siguientes:



Absorción de un fotón



Luminiscencia



Colisión con un atenuador



Atenuación dinámica

La fotoexcitación de muchos sistemas moleculares, ecuación 4.1, origina estados excitados metaestables que se relajan al estado fundamental emitiendo radiación electromagnética. La molécula fotoexcitada M^* puede volver a su estado fundamental emitiendo un fotón hv' tal como indica la ecuación 4.2. Esos estados fotoexcitados metaestables pueden ser de dos tipos: a) los que tienen el mismo spin que en el estado fundamental y b) los que tienen diferente spin que en el estado fundamental. La emisión que se origina en el primer caso se llama

fluorescencia y generalmente ocurre en 0,2 μ s, mientras que la emisión originada en el segundo se llama fosforescencia y se lleva a cabo en tiempos que van desde 1 μ s hasta 20 s. Esto es, la emisión persiste significativamente cuando cesa la excitación en el caso de la fosforescencia mientras que no lo hace en el caso de la fluorescencia.

La presencia de un atenuador en el sistema luminiscente origina una rápida disminución de la población del estado fotoexcitado debido a que una colisión de la molécula excitada M^* con ese atenuador A origina un complejo excitado (ecuación 4.3). La reacción inversa de la anterior representa una colisión no efectiva con el atenuador. La ecuación 4.4 indica que el complejo excitado $(MA)^*$ vuelve al estado fundamental mediante un proceso no radiativo desprendiendo la energía en forma de calor.

Basándonos en el anterior modelo cinético, se pueden obtener las siguientes ecuaciones cinéticas:

$$\frac{d[M^*]}{dt} = k_1[M] - k_2[M^*] - k_3[M^*][A] + k_{-3}[(MA)^*] \quad (4.5)$$

$$\frac{d[(MA)^*]}{dt} = k_3[M^*][A] - k_{-3}[(MA)^*] - k_4[(MA)^*] \quad (4.6)$$

$$[M]_0 = [M] + [M^*] + [(MA)^*] \quad (4.7)$$

$$I = \frac{d[h\nu']}{dt} = k_2[M^*] \quad (4.8)$$

donde t es el tiempo, I es la intensidad de luminiscencia, $h\nu'$ son los fotones emitidos y $[M]_0$ es la concentración analítica de luminóforo.

En estado estacionario se cumplirá que:

$$\frac{d[M^*]}{dt} = 0 \quad (4.9)$$

y

$$\frac{d[(MA)^*]}{dt} = 0 \quad (4.10)$$

Usando las ecuaciones 4.5 a 4.10, se puede expresar la intensidad de luminiscencia como:

$$I = \frac{k_1 k_2 |M_t|}{K_1 + K_2 |A|} \quad (4.11)$$

donde $K_1 = k_1 + k_2$ y $K_2 = \frac{k_3 + (k_1 - k_{-3})k_3}{k_{-3}k_4}$

En ausencia de atenuador, $|A| = 0$, se cumplirá que:

$$I_o = \frac{k_1 k_2 |A|_o}{K_1} \quad (4.12)$$

Dividiendo la ecuación 4.12 entre la 4.11 resulta:

$$\frac{I_o}{I} = 1 + \left(\frac{K_2}{K_1} \right) |A| \quad (4.13)$$

que es la llamada ecuación de Stern-Volmer cuando se sustituye K_2/K_1 por K_{SV} , siendo K_{SV} la constante de Stern-Volmer expresada en concentraciones.

Cuando representamos $\left(\frac{I_o}{I} \right) - 1$ frente a la concentración de oxígeno obtendremos una línea recta de pendiente K_{SV} y ordenada en el origen cero.

$$\frac{I_o}{I} - 1 = K_{SV} |A| \quad (4.14)$$

De igual manera, se puede demostrar otra forma de la ecuación de Stern-Volmer que relaciona tiempos de vida del estado excitado en presencia τ y ausencia τ_o del atenuador:

$$\frac{\tau_o}{\tau} = 1 + K_{SV} |A| \quad (4.15)$$

Ese tiempo de vida es la inversa de la velocidad de emisión del estado excitado, bien en ausencia τ_0 o en presencia de atenuador τ . Para nuestro caso en que el atenuador es el oxígeno, quedaran las ecuaciones en función de la concentración de oxígeno

$$\frac{I_0}{I} = 1 + K_{SV} |O_2| \quad (4.16)$$

$$\frac{\tau_0}{\tau} = 1 + K_{SV} |O_2| \quad (4.17)$$

El cociente I_0/I o τ_0/τ se puede relacionar linealmente con la presión parcial de oxígeno (pO_2) en la fase gas aceptando que la disolución de oxígeno en la membrana polimérica obedece la ley de Henry:

$$|O_2| = k_h pO_2 \quad (4.18)$$

donde k_h es la constante de la ley de Henry.

Por tanto resultaría:

$$\frac{I_0}{I} - 1 = K_{SV} pO_2 \quad (4.19)$$

donde K_{SV} es la constante de atenuación dinámica total o constante de Stern-Volmer cuyas unidades en este caso son $(\text{mmHg})^{-1}$ o torr^{-1} .

Esta ecuación puede también ser escrita en términos de tiempo de vida donde τ_0 y τ son los tiempos de decaimiento del fluoróforo en ausencia y en presencia de oxígeno, respectivamente.

$$\frac{\tau_0}{\tau} - 1 = K_{SV} pO_2 \quad (4.20)$$

Como observamos, los sensores luminiscentes responden a la presión parcial de oxígeno del medio más que a concentraciones absolutas. De todos los sensores basados en procesos de atenuación de luminiscencia los de oxígeno son los más usados.

En conclusión, la presencia de un atenuador en el sistema luminiscente origina una rápida disminución de la población del estado fotoexcitado, que es detectada o bien por una

disminución concomitante de la intensidad de luminiscencia o bien como una disminución del tiempo de decaimiento de la emisión. Así pues, los cambios bien en intensidad o en tiempo se pueden usar para cuantificar la cantidad de analito presente.

El proceso de atenuación se interpreta como debido a la formación de un complejo de transferencia de carga por colisión del oxígeno con el luminóforo excitado. La relajación no radiativa del complejo origina la especie en estado fundamental que, como es inestable, se disocia en el luminóforo en estado fundamental y oxígeno^{1,2}. En consecuencia, este proceso no consume oxígeno³. Por tanto, usando un gas de composición fija, tal como el aire, la concentración de oxígeno es linealmente proporcional a la presión del gas y la intensidad de luminiscencia o tiempo de vida es una medida de la presión parcial de oxígeno.

2.2. Ecuación modificada de Stern-Volmer

Se ha observado experimentalmente que cuando el luminóforo está fijado en una membrana, suele haber desviaciones de la linealidad predicha por la expresión de Stern-Volmer¹.

Se ha tratado de justificar este hecho usando dos teorías diferentes: a) aceptando que coexisten procesos de atenuación dinámica con otros de atenuación estática y b) suponiendo que la accesibilidad del oxígeno al luminóforo presente en la membrana no es igual para todas las moléculas.

Según la primera teoría, que supone la coexistencia de atenuación dinámica y estática o bien la existencia de componentes transitorios en la atenuación dinámica, la intensidad relativa de luminiscencia vendría dada por el producto de ambos procesos dinámico y estático:

$$I_0 / I = (1 + K_D [A]) (1 + K_S [A]) \quad (4.21)$$

¹ J.N. Demas, E.W. Harris y R.P. McBride, *J. Am. Chem. Soc.*, 99, 3547 (1977).

² Q.C. Mulazzani, H. Sun, M.Z. Hoffman, W.E. Ford y M.A.J. Rodgers, *J. Phys. Chem.*, 98, 1145 (1994).

³ O.S. Wolfbeis, *Fiber Optic Chemical Sensors and Biosensors*, CRC Press, vol. 2, p. 19 (1991).

Donde K_D es la constante de atenuación dinámica y K_S la constante de atenuación estática. Si operamos en la anterior ecuación y definimos $K_1 = K_D + K_S$ y $K_2 = K_D K_S$, resulta:

$$I_0 / I = 1 + K_1 [A] + K_2 [A]^2 \quad (4.22)$$

La dependencia cuadrática obtenida debería corregir la curvatura positiva que tendría que mostrar la representación de Ster-Volmer, pues la constante K_2 es positiva. Sin embargo, experimentalmente se ha observado⁴, y nosotros encontramos el mismo comportamiento, una curvatura negativa. Ello sugiere que la segunda teoría es posiblemente más correcta.

Esta teoría propuesta por Demas⁵ parte de que el comportamiento de las moléculas del luminóforo está afectado por la estructura de la matriz y por la composición local en la que la molécula se encuentra. En este caso, el medio consiste en dominios con carácter más o menos cristalino o amorfo. Como consecuencia, el decaimiento no es una simple función experimental, pues está influenciado por interacciones entre el luminóforo y el polímero. En sistemas heterogéneos, como los que estamos considerando, se supone que hay micro heterogeneidades que hacen que el acceso del oxígeno al interior no sea igualmente fácil. En el caso de un sistema condensado tal como una película polimérica, la función de Stern-Volmer se desvía de la linealidad debido a las diferentes contribuciones relativas que se originan a partir de las diferentes posiciones de atenuación presentes en la membrana.

La dependencia de I_0/I con la concentración de oxígeno se podría describir por:

$$\frac{I_0}{I_0 - I} = \frac{1}{\sum \frac{f_i K_{A_i} [O_2]}{1 + K_{A_i} [O_2]}} \quad (4.23)$$

donde $I = \frac{\sum I_i}{n}$, $f_i = \frac{I_{0i}}{I_0}$ y n es el número de moléculas de luminóforo. Suponiendo que hay

k moléculas accesibles con el mismo K_A , la ecuación queda como:

⁴ S.K. Lee y I. Okura, Spectrochim. Acta A, 54, 91 (1998).

⁵ J.N. Demas, B.A. DeGraff, Sens. Actuators B, 11, 35 (1993).

$$\frac{I_o}{I_o - I} = \frac{1}{fK|O_2|} + \frac{1}{f} \quad (4.24)$$

donde $f = \sum f_i$, indica la máxima fracción molar de moléculas de complejo accesible a oxígeno. Si solo hubiera un mismo tipo de moléculas con la misma accesibilidad, $1/f$ valdría 1. La representación de $\frac{I_o}{I_o - I}$ frente a $\frac{1}{|O_2|}$ originaría una línea recta de pendiente $1/fK$ y ordenada en el origen $1/f$.

De forma análoga, se han justificado los hechos experimentales aceptando que la disolución de un gas en un polímero muestra una desviación negativa de la ley de Henry⁶, lo que conduce a una ecuación del tipo:

$$\frac{I_o}{I} = 1 + ApO_2 + \frac{BpO_2}{1 + bpO_2} \quad (4.25)$$

donde $A = K_2K_h/K_1$; $B = K_2K_s b/K_1$; K_s es la constante de saturación de la microcavidad y b es la constante de afinidad de la microcavidad. Esta ecuación 4.25, al igual que la anterior ecuación 4.24, permite ajustar bien los datos experimentales⁷. Se han propuesto otros modelos para linealizar las desviaciones de la ecuación de Stern-Volmer⁸.

3. Preparación de membranas

Para la presentación y exposición de los resultados obtenidos en la preparación de las membranas distinguiremos dos etapas: 1) selección, preparación y optimización del cóctel y 2) preparación con el cóctel anterior de la membrana sensora propiamente dicha.

⁶ W.R. Vieth y M.A. Amini, *Permeability of Plastic Films and Coating to Gases, Vapours and Liquids*, Plenum Press, New York, 1974, p 49.

⁷ X.M. Li y K.Y. Wong, *Anal. Chim. Acta*, 262, 27 (1992).

⁸ H. Chuang y M.A. Arnold, *Anal.Chim.Acta*, 368, 83 (1998).

3.1. Luminóforo utilizado

Para la determinación de oxígeno con luminóforos fluorescentes se pueden usar sistemas de medida de intensidad de fluorescencia, con todos los inconvenientes que presentan, como vimos en la Introducción de esta Memoria de Doctorado. El empleo de luminóforos que emitan fosforescencia y, por tanto, presenten tiempos de vida largos (10-100 μ s) permite simplificar el sistema electrónico al tener la posibilidad de usar LED y fotodiodos. Por ello, para el desarrollo de instrumentación portátil de la medida de oxígeno, se seleccionaron luminóforos de largo tiempo de vida, lo que elimina el problema de la fluorescencia de fondo y conduce a sistemas más sensibles.

La Tabla 4.1 muestra la estructura química y el tiempo de vida a temperatura ambiente de algunos luminóforos de tiempo de vida largo ordenados de menor a mayor tiempo de vida.

Tras el estudio de diferentes luminóforos de tiempo de vida largo, de sus características y propiedades, y tras realizar un conjunto de ensayos preliminares, se seleccionó un complejo metálico con una porfirina, en concreto el complejo de platino (II) con la octaetilporfirina (PtOEP). Este derivado de la porfirina reduce la aromaticidad del anillo porfirínico, lo que origina un desplazamiento de la banda Q(0,0) de la porfirina y de derivados porfirínicos, así como de sus complejos metálicos luminiscentes⁹.

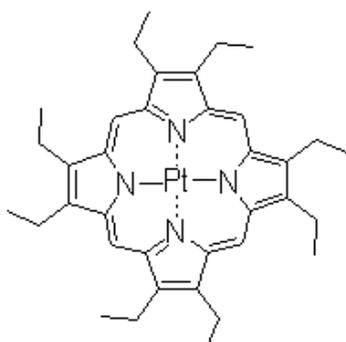


Figura 4.1 Estructura del complejo octaetilporfirina platino (II) (PtOEP).

⁹ M. Gouterman, *The Porphyrins*, Academic Press, New York, vol 3, cap. 1, 1979.

Este compuesto muestra una serie de ventajas para su uso como material sensible a oxígeno. En concreto:

- Presenta bandas de absorción en el visible, de 480 a 580 nm, lo que hace posible el uso de un LED (diodo emisor de luz) para su excitación.
- Tiene un gran desplazamiento Stokes, unos 100 nm, lo cual evita problemas de reabsorción y facilita la separación entre la radiación emitida y la excitatriz.
- Muestra un tiempo de vida del estado excitado largo, 13,5 μs en membranas de poliestireno¹⁰ bajo ambiente desoxigenado.
- Es razonablemente fotoestable.
- Tiene suficiente carácter hidrófobo como para ser soluble en los materiales de membrana y muy poco soluble en agua.

Un resumen de las características de la PtOEP⁹ de interés para esta aplicación se recoge en la Tabla 4.2. En ella se indican las longitudes de onda de emisión y excitación de la PtOEP en membranas de poliestireno, coeficiente de extinción molar (ϵ), rendimiento cuántico de fosforescencia en ausencia de oxígeno (ϕ_0), cociente entre el rendimiento cuántico en ausencia y en presencia de oxígeno ambiente ($\phi_0/\phi_{\text{aire}}$) y el tiempo de vida en ausencia de oxígeno (τ_0).

¹⁰ Y. Amao, K. Asai y I. Okura., J. Porphyrins Phthalocyanines, 4, 292 (2000)

Tabla 4.1. Estructura química y tiempos de vida de algunos luminóforos de tiempo de vida largo.

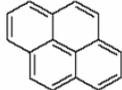
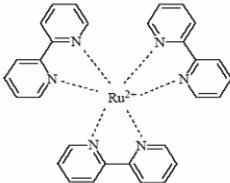
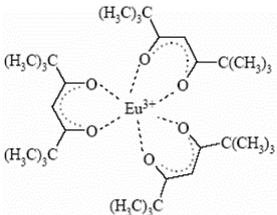
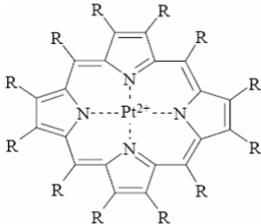
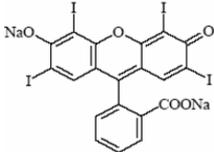
Luminóforos	Estructura química	τ
Derivados del pireno		180-420 ns
Quelatos de rutenio		0,7-7 μ s
Quelatos lantánidos (Ejemplo europeo)		1 μ s -2 ms
Metaloporfirinas		20 μ s -1 ms
Eritrosina		250 μ s

Tabla 4.2. Propiedades del luminóforo PtOEP.

Propiedad	Magnitud
λ_{exc} (nm)	535
λ_{em} (nm)	650
ε (L·mol ⁻¹ ·cm ⁻¹)	55.400
Rendimiento cuántico, ϕ_o	0,38
$\phi_o/\phi_{\text{aire}}$	400
τ_o en poliestireno (μs)	85

3.2. Materiales poliméricos

3.2.1. Características

El material polimérico adecuado para la preparación de las membranas sensoras debe poseer diversas características:

- Ser capaz de dispersar el luminóforo.
- Ser ópticamente transparente, esto es no dispersar radiación y, en general, tener buenas características ópticas.
- Tener alta afinidad y permeabilidad a oxígeno.
- Ser capaz de transmitir la radiación luminiscente originada.
- Poseer estabilidad mecánica y buena adherencia al soporte.

Además existen otras características de interés para la selección del material de membrana. Así, su capacidad para tomar agua del medio, condensado o no, que rodea la membrana, pues el agua puede afectar a la emisión luminiscente. También es de interés la flexibilidad del material de membrana que le permitirá adaptarse a rugosidades del soporte y mejorará los ajustes. Dicha flexibilidad está relacionada con la temperatura de transición vítrea del políme-

ro, por ello, y en general, la temperatura de trabajo de la membrana debe encontrarse por debajo de la temperatura de transición vítrea del material.

Es importante también el grado de permeabilidad que presenta el material de membrana a oxígeno. En la siguiente Tabla 4.3 clasificamos estos polímeros en cuanto a su permeabilidad¹¹ a oxígeno. La permeabilidad de un polímero se define como:

$$P = \frac{\text{cantidad de permeante} \cdot \text{espesor}}{\text{area} \cdot \text{tiempo} \cdot \text{presión}} \quad (4.26)$$

La permeabilidad puede expresarse como $P = D \cdot S$, donde D es el coeficiente de difusión en cm^2/s , y S es el coeficiente de permeabilidad cuyas unidades son $\text{cm}^3/\text{cm}^2 \cdot \text{Pa}$.

Tabla 4.3 Permeabilidad a O_2 de algunos polímeros en $\text{cm}^3/\text{s} \cdot \text{Pa}$, bajo condiciones normales de 273,15 K y 1 at.

Polímero	P ($\times 10^{13}$)	D ($\times 10^6$)
Poliestireno	1,9	-
Cloruro de polivinilo	0,034	0,012
Fluoruro de polivinilo	0,030	-
Poli oxidimetil silileno	367	12,0

3.2.2. Polímeros seleccionados

Al objeto de seleccionar la membrana más apropiada para nuestro objetivo se han probado diversos polímeros que cumplieran las anteriores características adecuadas para ser utilizados en la preparación de las membranas sensoras. Las características que hemos tenido en

¹¹ J.Brandrup, E.H. Immergut y E.A. Gulke, Polymer Handbook, VI-543, John Wiley & Sons, New York, 1999.

cuenta a la hora de seleccionar los polímeros que forman la matriz han sido: permeabilidad a oxígeno, solubilidad del complejo metálico, propiedades mecánicas y ópticas.

Como matrices para dispersar y fijar el luminóforo se han ensayado: poliestireno, cloruro de polivinilo, siliconas y un polímero fluorado. En todos los casos, el mecanismo de retención del complejo metálico es por retención mecánica debido al carácter hidrófobo que presentan tanto la matriz como el complejo.

En el caso del cloruro de polivinilo se ha ensayado la adición de diversos plastificantes que modifiquen la solubilidad de la membrana a oxígeno y, por tanto, su capacidad de respuesta. Entre los plastificantes que se seleccionaron se encuentran: tributilfosfato (TBP), tris(2-etilhexil)fosfato (THEP), 2-nitrofeniloctiléter (NPOE), bis(2-etilhexil) sebacato (DOS) y dioctilftalato (DOP).

Hemos clasificado las membranas, para la presentación de resultados, según el polímero usado para su preparación, ya que las propiedades de las membranas sensoras dependen en gran medida de los polímeros utilizados, debido a la interacción entre las moléculas del polímero y el luminóforo presente en la membrana.

3.3. Membranas sensoras de PVC

El PVC es uno de los polímeros utilizados frecuentemente en la fabricación de membranas sensoras a oxígeno⁴. Hemos estudiado la posibilidad de empleo de plastificante que incremente la permeabilidad a oxígeno, así como la cantidad de luminóforo y la forma de preparación de estas membranas.

3.3.1. Selección del plastificante

En sensores de oxígeno que utilizan membranas de PVC se suelen emplear plastificantes. El empleo de estos plastificantes influye sobre la respuesta de la membrana a oxígeno ya que aumenta la difusión del gas por el interior de la membrana debido al incremento que ori-

gina en la movilidad de los segmentos de PVC^{9,12}. Se ensayaron diversos plastificantes obteniéndose los mejores resultados para el tributilfosfato (TBP) y este, por tanto, fue el plastificante usado.

Se prepararon un conjunto de membranas de PVC con porcentajes de tributilfosfato de: 0, 1, 5, 9 y 12%. A continuación, se midió su respuesta a oxígeno mediante el espectrofluorímetro Perkin Elmer LS50 y realizaron las representaciones de Stern-Volmer para cada una de estas membranas (Figura 4.2).

Se observa que al aumentar el porcentaje de tributilfosfato, aumenta la pendiente de la recta de calibrado (K_{SV}) y, por tanto, la sensibilidad hacia el oxígeno. La Tabla 4.4 resume los valores obtenidos para la ordenada y la pendiente de Stern-Volmer.

Tabla 4.4. Influencia del porcentaje de TBP en la señal.

TBP %	$K_{SV} (\%)^{-1}$	Ordenada
0	0,057	0,041
1	0,372	-2,863
5	0,254	-1,810
9	0,446	-1,578
12	1,211	-1,036

¹² A. Mills y M. Thomas, *Analyst*, 122, 63 (1997).

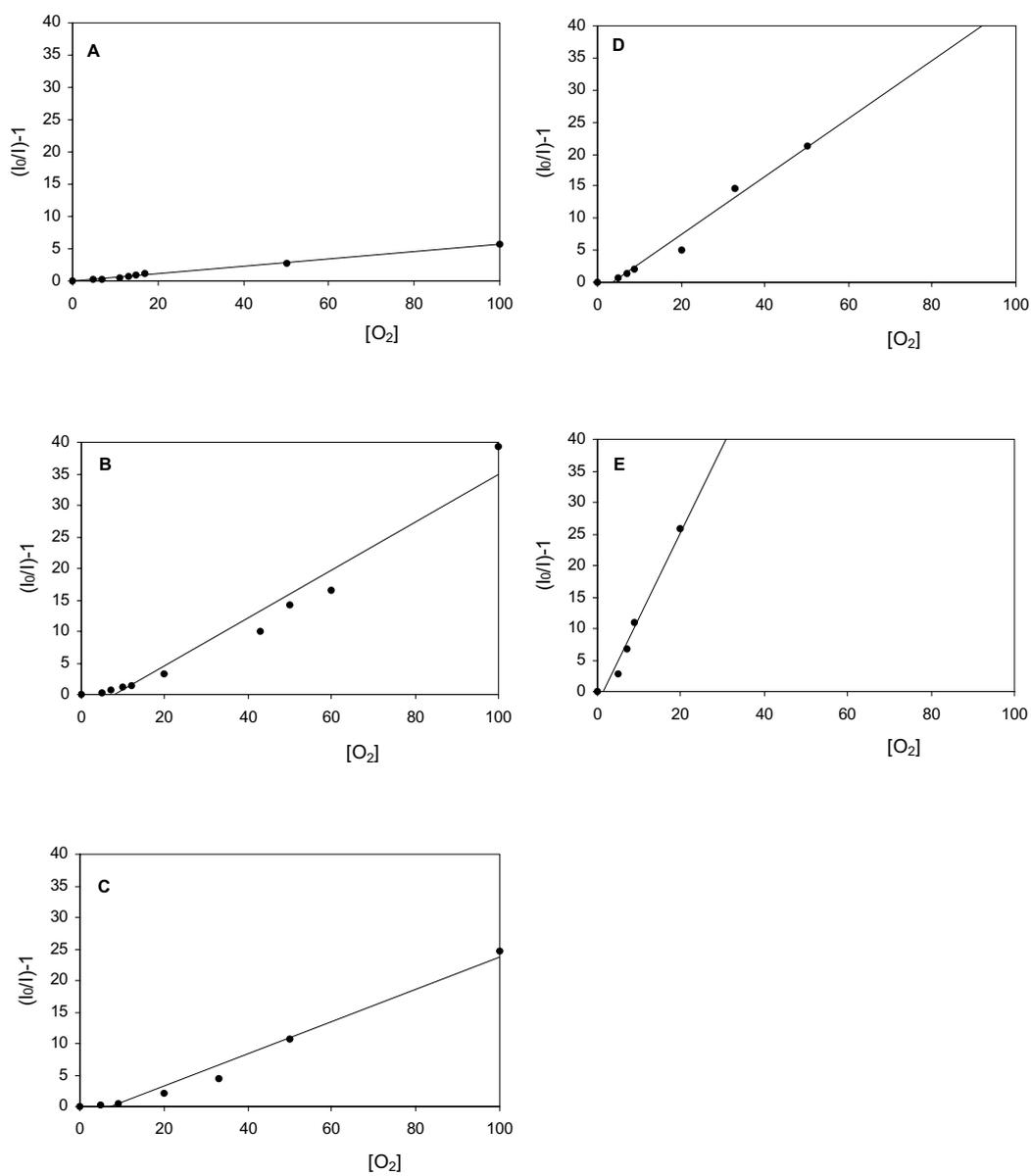


Figura 4.2. Influencia del porcentaje de TBP sobre la función de Stern-volmer. A) 0%, B) 1%, C) 5%, D) 9% y E) 12%.

Por otra parte, cuando representamos la señal obtenida, operando a oxígeno ambiente, frente a la concentración de TBP se observa una disminución de la señal conforme se incrementa el porcentaje de TBP que contiene la membrana (Figura 4.3). Esto es concordante con los resultados obtenidos por Wolfbeis¹³ acerca de la reducción en el tiempo de decaimiento de un complejo de rutenio cuando se emplean cantidades crecientes de TBP en la membrana.

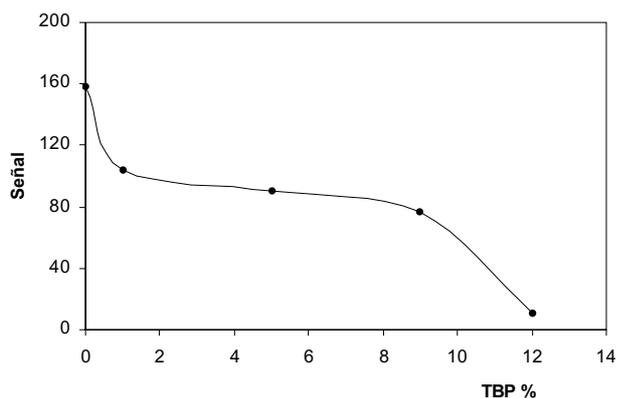


Figura 4.3. Influencia del porcentaje de TBP en la señal

Esta disminución de la señal hace que el rango de medida del prototipo P01 también se acorte con el aumento de la proporción de TBP y no llegue al 100% de oxígeno. Además supone una pérdida de la linealidad en la representación de Stern-Volmer. Por estas razones y, además, porque necesitamos una membrana que origine una gran luminiscencia y porque nuestro objetivo es desarrollar una instrumentación que responda a oxígeno ambiente (sobre el 20%) y no a concentraciones mayores, hemos elegido para la realización de este estudio la membrana sin plastificante.

3.3.2. Selección de la cantidad de luminóforo

Se estudió a continuación la influencia sobre la respuesta de la concentración de complejo luminóforo. Para ello, se prepararon tres tipos de membranas conteniendo un porcentaje

¹³ A. Apostolidis, I. Klimant, D. Andrzejewski y O.S. Wolfbeis, J. Comb. Chem, 6, 325 (2004).

de octaetilporfirina Pt (II) del 0,12 %, 0,50 % y 1,00 %. La variación de intensidad de luminiscencia de estas membranas para un 100 % de nitrógeno se muestra en la Figura 4.4, donde se observa que la señal para un 0,12 % es muy pequeña, lo que se traduce en mayor incertidumbre en la función de Stern-Volmer.

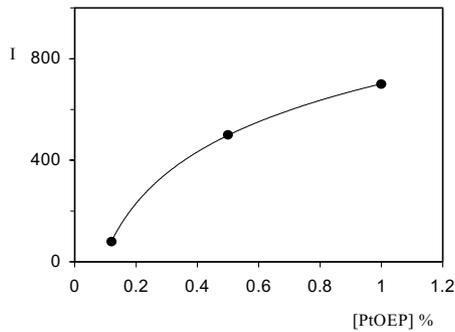


Figura 4.4. Variación de intensidad de fosforescencia con la concentración de PtOEP

A pesar de ser mayor la señal de fosforescencia para un 1,0 % que para un 0,5 %, se seleccionó este último porcentaje, pues la función de Stern-Volmer para el 1,0% no es lineal mostrando curvatura positiva (Figuras 4.5 y 4.6).

Se puede justificar esta influencia de la concentración de PtOEP como debida a un aumento de la agregación del complejo al aumentar la concentración, lo que lleva aparejada una disminución de fosforescencia debido a atenuación, al igual que ocurre para otras porfirinas y ftalocianinas⁴.

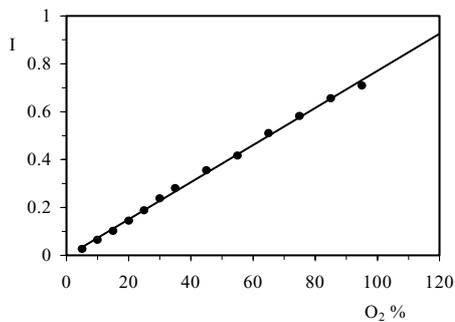


Figura 4.5. Representación de Stern-Volmer para membranas con 0,5 % de PtOEP

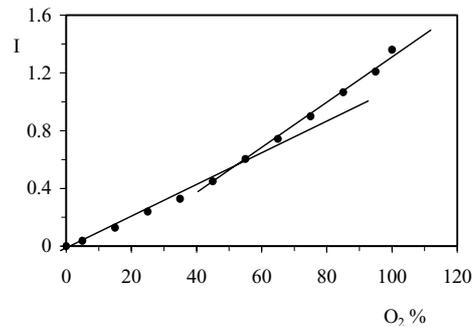


Figura 4.6. Representación de Stern-Volmer para membranas con 1,0 % de PtPEP.

3.3.3. Preparación de la membrana

Para la preparación de membranas de PVC se pesan en un vial de vidrio de 2 mL de capacidad 0,5 mg de PtOEP y 0,1 g de PVC y los disolvemos en 1,0 mL de THF. Depositamos 50 μ L del cóctel sobre una lámina transparente de poliéster con la ayuda del sistema rotatorio de velocidad de giro variable. El tamaño de la lámina de Mylar sobre la que se deposita la gota es diferente según utilicemos la membrana en la instrumentación convencional (A) o en el prototipo P01 (B) debido a las necesidades de la zona optoelectrónica del prototipo (Figura 4.7).

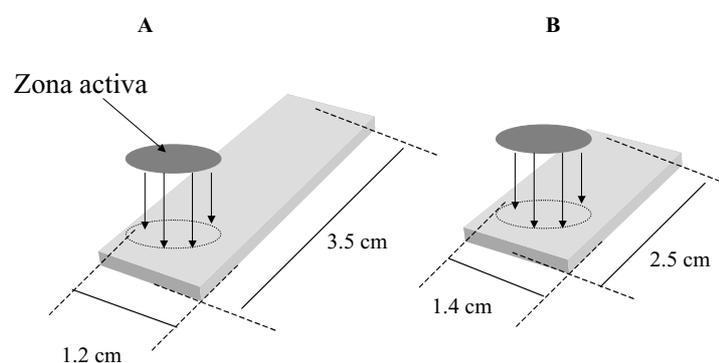


Figura 4.7. Esquema y dimensiones de las membranas sensoras.

Tras dejar la membrana girando a temperatura ambiente, durante unos 2 minutos, se deja estar en un recipiente hermético con atmósfera saturada de tetrahidrofurano durante 24 horas, obteniéndose de este modo una película circular sólida, homogénea, adherida al soporte sólido, transparente y de color anaranjado cuyas dimensiones son 6 mm de diámetro y 5 μ m de espesor.

3.4. Membranas sensoras de silicona

Otro de los polímeros utilizados en la fabricación de membranas sensoras de oxígeno son las siliconas. Hemos preparado cócteles con dos tipos de siliconas, la silicona GP-197 (polidimetil siloxano), y silicona Elastosil N-10, la baja densidad que presenta la silicona GP-

197 no nos ha permitido fabricar membranas con condiciones adecuadas para su uso. Sin embargo, sí se consiguió en el caso de la silicona Elastosil N-10 y se prepararon tres tipos de membranas, tal como indicamos a continuación.

3.4.1. Membranas sensoras con silicona Elastosil N-10

Las disoluciones para la preparación de estas membranas se hacen a partir de 1,0 g de silicona Elastosil N-10 y entre 0,1 y 1,0 mg de PtOEP, todo ello disuelto en 1 mL de tolueno. Al igual que en casos anteriores, resulta una disolución de color rojo anaranjado. Con ayuda del sistema centrífugo antes citado se depositaron 30 μL de la anterior disolución en una lámina de poliéster girando a 119 rpm, 30 segundos después de la deposición se detiene la rotación y se deja la membrana en un desecador a vacío durante 10 minutos, tras lo cual ya están preparadas para su uso. Las dimensiones del soporte de Mylar son iguales que en el caso de las membranas de PVC del apartado anterior. Se fabricaron también membranas de silicona disueltas en THF de igual forma a estas. Ninguna de estas membranas así preparadas conteniendo el luminóforo disperso en la silicona, muestran fosforescencia a oxígeno ambiente, por lo que su uso es descartado.

3.4.2. Membranas sensoras de silicona como matriz y luminóforo adsorbido

Bacon y Demas¹⁴ utilizaron una forma de preparación de estas membranas por adsorción que se basa en el hecho de que el diclorometano no disuelve al polímero pero sí penetra y lo expande al doble de su volumen, permitiendo la entrada del luminóforo en su interior. El secado posterior de la membrana permite la retención del complejo en su interior al contraerse el polímero.

¹⁴ J.R. Bacon y J.N. Demas, *Anal. Chem.*, 59, 2780 (1987).

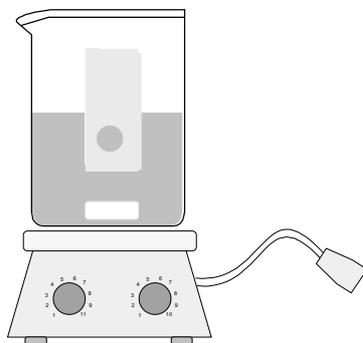


Figura 4.8. Preparación de membranas por adsorción del luminóforo.

Se prepararon membranas con silicona Elastosil N-10 como en el caso anterior pero sin la adición de la porfirina. Una vez preparadas se sumergieron durante 10 minutos en una disolución de 1000 mg/L de PtOEP en diclorometano manteniendo agitación magnética (Figura 4.8). Tras ello, se sacaron las membranas de la disolución, se lavaron con diclorometano, y se dejaron secar lentamente en atmósfera del mismo disolvente. Con estas membranas. Más adelante mostramos los resultados encontrados con estas membranas.

3.4.3. Membranas sensoras de poliestireno y silicona como matriz

Se trata de ensayar si el empleo de mezclas de silicona y poliestireno permite mejorar sus propiedades sensoras. Para ello, se prepararon membranas a partir de 0,5 g de silicona Elastosil N-10, 0,5 g de poliestireno y entre 0,1 y 1,0 mg de PtOEP, todo ello disuelto en 0,5 mL de tolueno. La formación de la membrana por deposición se hizo con las mismas condiciones que para la membrana de PVC. Con estas membranas no se obtienen buenos resultados.

3.5. Membranas sensoras de poliestireno

Otro de los polímeros usados habitualmente para la fabricación de sensores ópticos para oxígeno es el poliestireno (PS) debido a su alta permeabilidad a oxígeno y buenas propiedades ópticas. Se optimizó la cantidad de poliestireno necesaria para la formación de estas

membranas, para ello se prepararon una serie de cócteles conteniendo 500 mf/L de complejo luminóforo y diferentes porcentajes de poliestireno. Se vio que la señal de fosforescencia obtenida disminuye considerablemente al aumentar el porcentaje de poliestireno. En la Figura 4.9 se muestra la intensidad relativa de fosforescencia (I_r) para membranas preparadas con un 5, 15 y 30% de poliestireno, obtenida a oxígeno ambiente con el espectrofluorímetro LS 50 de Perkin Elmer, bajo las condiciones $t_d = 0,2$ ms, $t_g = 10$ ms, y usando una anchura de rendija de excitación y emisión de 5 nm. Por otra parte, para concentraciones superiores al 5% de poliestireno en THF la membrana obtenida se despegaba y se estropea fácilmente. Por ello, se elige una concentración de un 5% de poliestireno en THF.

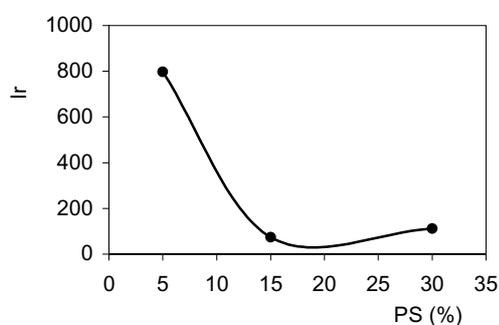


Figura 4.9. Influencia de la cantidad de PS sobre la intensidad relativa emitida por la PtOEP.

Como disolventes para este polímero se han ensayado tanto tolueno como tetrahidrofurano, obteniendo mejores resultados con este último, pues con tolueno las membranas preparadas se despegan fácilmente del soporte de Mylar.

3.5.1. Selección de la cantidad de PtOEP

Un aumento en la concentración de PtOEP aumenta la intensidad de la señal de fosforescencia obtenida bajo atmósfera de nitrógeno. La Figura 4.10 muestra el espectro de emi-

sión para las membranas obtenidas de cócteles cuyas concentraciones de PtOEP fueron de 25, 50, 100, 200, 500, 800, 1000 mg/L.

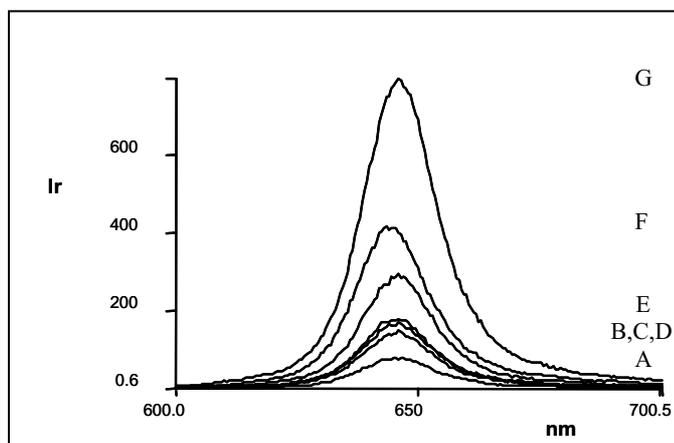


Figura 4.10. Espectro de emisión de membranas preparadas con cócteles de distintas concentraciones de PtOEP. A)25, B)50, C)100, D)200, E)500, F)800 y G)1000 mg/L.

Si representamos la intensidad de fosforescencia relativa obtenida al máximo de emisión, que se encuentra a 645 nm, frente a la concentración de complejo PtOEP empleada obtenemos la siguiente Figura 4.11, que muestra que dicha intensidad aumenta con la concentración de PtOEP en el cóctel. Solo se estudió hasta 1000 mg/L de complejo debido a que a mayores concentraciones se disuelve con dificultad. Al igual que para las membranas anteriores hemos seleccionado como óptima una cantidad de 500 mg/L de luminóforo en el cóctel para la fabricación de las membranas sensoras.

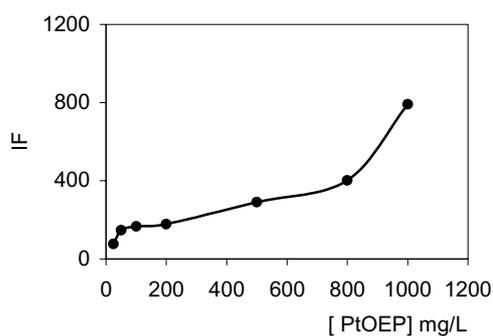


Figura 4.11 Intensidad de fosforescencia a 645 nm. Membranas de PS con distintas concentraciones de PtOEP.

3.5.2. Preparación de la membrana

Para la preparación de las membranas se pesó en un vial de vidrio 0,5 mg de PtOEP que se disolvió en 1,0 mL de disolución de poliestireno al 5% en THF. Depositamos 30 μ L del cóctel sobre una lámina transparente de poliéster con la ayuda del sistema rotatorio de velocidad de giro variable ya citado y tras dejar la membrana girando a temperatura ambiente, durante 2 minutos, se deja estar en un recipiente hermético con atmósfera saturada de tetrahidrofurano durante unas 24 horas. De esta manera se obtiene una película circular sólida, homogénea, bien adherida al soporte sólido, transparente y de color rosa. Las dimensiones de la lámina son similares a las indicadas en la Figura 4.7.

4. Caracterización de las distintas membranas

En este apartado se exponen los resultados obtenidos con los diferentes tipos de membranas preparadas mediante la instrumentación convencional. Para ello, se hizo uso del espectrofluorímetro Perkin Elmer LS50 y del espectrofotómetro de diodos Hewlett Packard HP-8453.

4.1. Caracterización de las membranas de PVC

4.1.1. Física

Las características físicas de la zona sensora son las siguientes: película circular sólida, homogénea, transparente y de color rosa, de 11 mm de diámetro y bien adherida al soporte. El espesor promedio de la zona sensora es de 5 μ m.

4.1.2. Espectroscópica

Se han registrado sus propiedades espectrales, en concreto espectro de absorción y espectros de excitación y emisión fosforescente para estas membranas de PVC.

4.1.2.1. Espectro de absorción

El espectro de absorción obtenido para las membranas de PVC se recoge en la Figura 4.12 donde se observa que el espectro de absorción de complejo PtOEP es el típico de las metaloporfirinas, pues, usando la nomenclatura de Platt⁹ muestra: 1) dos bandas Q entre 500 y 600 nm, de las que la de menor energía es la banda Q(0,0) correspondiente a estado singlete excitado de menor energía, 2) las bandas B de las que la más intensa es la B(0,0), llamada banda Soret, y es el origen del segundo estado excitado, aparece entre 380 y 420 nm y c) bandas N, L y M por debajo de 380 nm

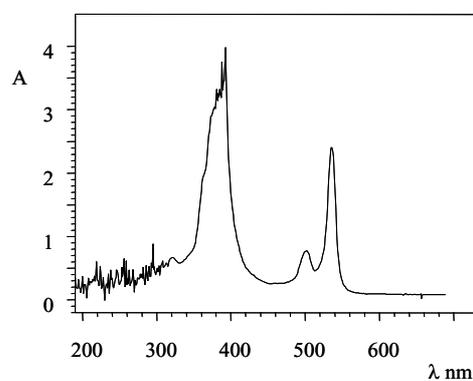


Figura 4.12 Espectro de absorción del complejo PtOEP en PVC.

4.1.2.2. Espectros de excitación y de emisión fosforescente

La Figura 4.13 muestra el espectro de excitación y emisión de las membranas de PVC. Se observa el máximo de excitación del PtOEP a 534 nm y el de emisión a 644 nm para membranas de PVC. El espectro ha sido realizado con el espectrofluorímetro Perkin Elmer LS 50 con rendijas de excitación y emisión de 5 nm.

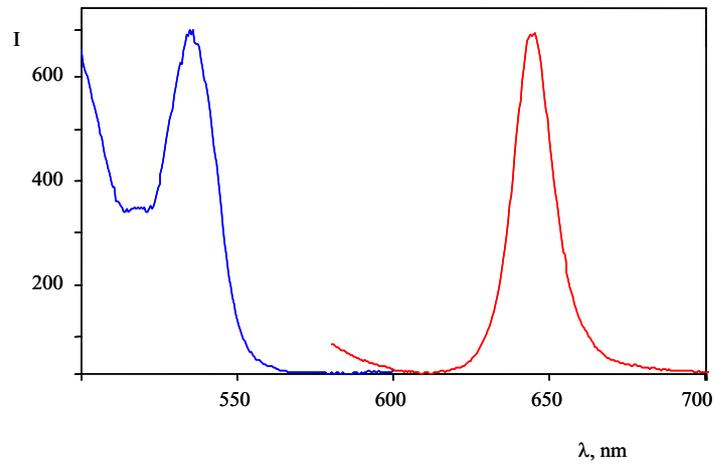


Figura 4.13. Espectros de excitación y emisión del PtOEP en PVC.

4.1.2.3. Respuesta a oxígeno

En la Figura 4.14 se muestra la atenuación de fosforescencia que provoca el oxígeno sobre la fosforescencia de las membranas de PVC.

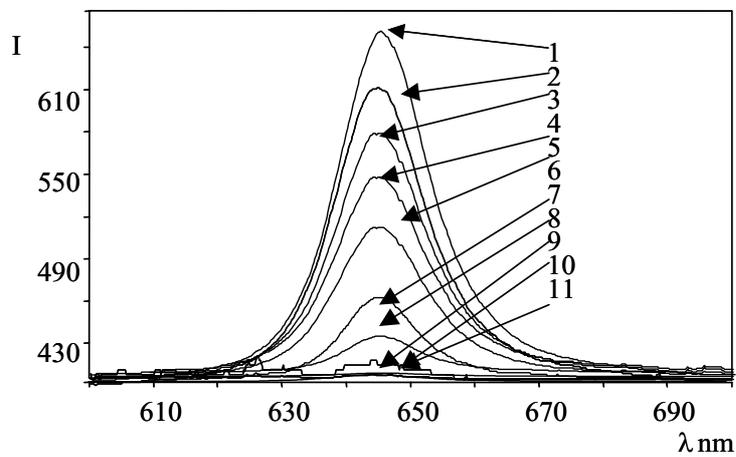
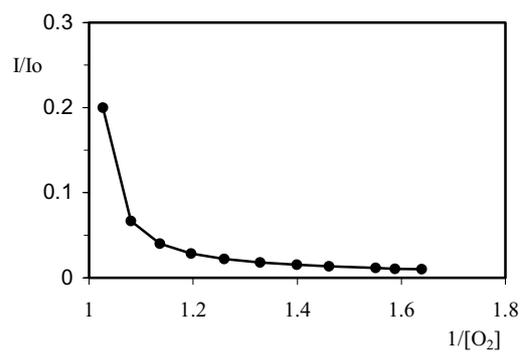


Figura 4.14. Espectro de fosforescencia a temperatura ambiente del PtOEP en PVC a diferentes concentraciones de O_2 .

Tabla 4.5 Dependencia de la fosforescencia con el porcentaje de O₂. Membranas de PVC.

[O ₂] %	Curva	I	(I ₀ /I)-1	I/I ₀	1/[O ₂]
0	1	659,89	0,00	1,00	-
5	2	608,92	0,12	0,92	0,20
6	3	575,49	0,22	0,87	0,17
7	4	553,5	0,29	0,84	0,14
11	5	513,4	0,45	0,78	0,09
13	6	466,3	0,69	0,71	0,08
15	7	435,15	0,91	0,66	0,07
17	8	411,07	1,11	0,62	0,06
20	9	345,56	1,98	0,52	0,05
50	10	310,76	2,82	0,47	0,02
100	11	257,33	5,72	0,39	0,01

Si representamos los valores de intensidad relativa de fosforescencia, obtenidos al máximo de emisión para cada porcentaje de oxígeno ensayado, frente a la inversa del porcentaje de oxígeno (Tabla 4.5) encontramos un decaimiento exponencial (Figura 4.15).

Figura 4.15. Decaimiento de la fosforescencia con el porcentaje de O₂.

Como el proceso de atenuación de luminiscencia obedece la ecuación de Stern-Volmer, cuando representamos $\left(\frac{I_0}{I}\right) - 1$ frente a la $[O_2]$ obtendremos una línea recta de pendiente, caracterizada en este caso por una $K_{SV} = 0,011$, una ordenada en el origen cero, siendo el valor de $r^2 = 0,988$. Hemos representado sólo hasta el 20 % de oxígeno debido a que los resultados para concentraciones ensayadas de 50 y 100% de oxígeno ofrecen valores anómalos (Figura 4.16).

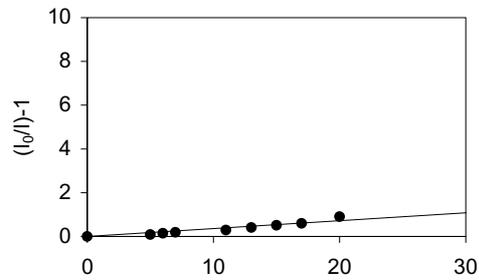


Figura 4.16. Representación de Stern-Volmer. Membrana de PVC.

4.2. Caracterización de membranas de silicona

De los tres tipos de membranas preparadas usando silicona sólo se obtuvieron resultados aceptables con aquellas donde el luminóforo se retuvo por adsorción y cuyos resultados se exponen a continuación. Las membranas preparadas con silicona Elastosil N-10 tanto en THF o tolueno con luminóforo disuelto no muestran fosforescencia a oxígeno ambiente. Por su parte, las obtenidas en mezcla de silicona y poliestireno proporcionan malos ajustes de la ecuación de Stern-Volmer por lo que descarta su uso.

4.2.1. Físicas

Las características físicas de la zona sensora son las siguientes: película circular sólida, homogénea, translúcida y de color rosa, de 11 mm de diámetro y adherida al soporte. El espesor promedio de la zona sensora es de 7 μm .

4.2.2. Espectroscópicas

Para caracterizar las membranas se han registrado sus propiedades espectrales, en concreto espectro de absorción y espectros de fosforescencia

4.2.2.1. Espectro de absorción

Debido a que las membranas no son translúcidas se obtiene un espectro de absorción con mucho ruido como se puede ver en la Figura 4.17, de todas formas puede vislumbrarse el máximo de absorción situado entre 380 y 420 nm como ocurría para las anteriores membranas.

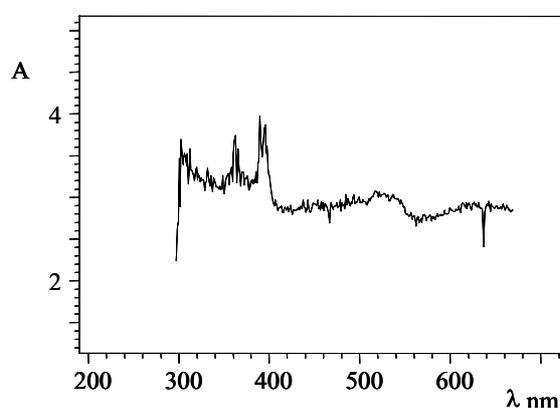


Figura 4.17. Espectro de absorción del complejo PtOEP en silicona.

4.2.2.2. Espectros de excitación y de emisión fosforescente

El espectro de excitación y emisión fosforescente (Figura 4.18) de la membrana de silicona se recoge a continuación. Se observa el máximo de emisión del PtOEP a 535 nm y el de emisión a 647 nm para membranas de silicona que es comparable al obtenido para las membranas de PVC. En este caso el espectro ha sido realizado con rendijas de excitación y emisión de 10 nm.

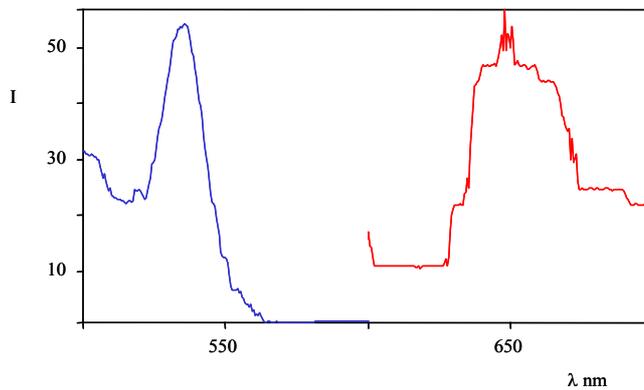


Figura 4.18. Espectros de excitación y emisión del PtOEP en silicón (método de adsorción).

4.2.3. Respuesta a oxígeno

En la Figura 4.18 se muestra la atenuación de fosforescencia que provoca el oxígeno sobre la fosforescencia de las membranas de silicón. Como vemos la intensidad de fosforescencia es mucho menor de lo anterior, del orden de un 10%, lo que provoca una baja calidad en los espectros.

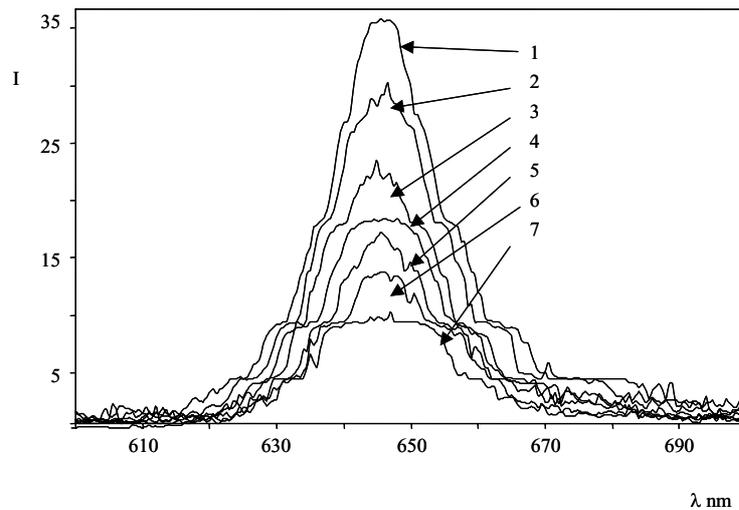


Figura 4.18. Espectro de fosforescencia a temperatura ambiente para las membranas de silicón a diferentes concentraciones de oxígeno.

Tabla 4.6. Dependencia de la intensidad de fosforescencia con el porcentaje de oxígeno. Membrana de silicona.

O_2 (%)	Curva	I	$(I_0/I)-1$	I/I_0	$1/[O_2]$
0	1	44,70	0	1,000	--
5	2	35,09	0,27	1,026	0,200
15	3	25,63	0,74	1,080	0,067
25	4	18,25	1,45	1,136	0,040
35	5	16,74	1,67	1,196	0,028
45	6	13,93	2,21	1,260	0,022
55	7	9,70	3,61	1,329	0,018

Si representamos los valores de intensidad relativa de fosforescencia, obtenidos al máximo de emisión para cada porcentaje de oxígeno ensayado, frente a la inversa del porcentaje de oxígeno (Tabla 4.6) encontramos un decaimiento exponencial en la intensidad (Figura 4.19). Para comprobar si se cumple la ecuación de Stern-Volmer se representa $(I_0/I)-1$ en función del porcentaje de oxígeno (Figura 4.20) encontrando una linealidad razonable con un valor de pendiente $K_{sv} = 0,057$ y un r^2 de 0,949.

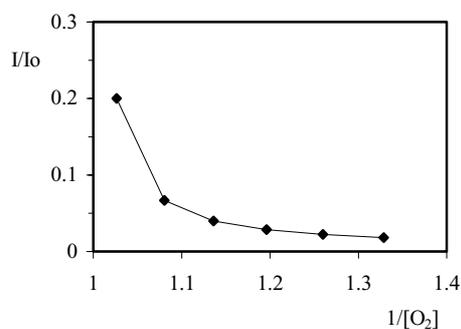


Figura 4.19. Decaimiento de la fosforescencia. Membrana de silicona.

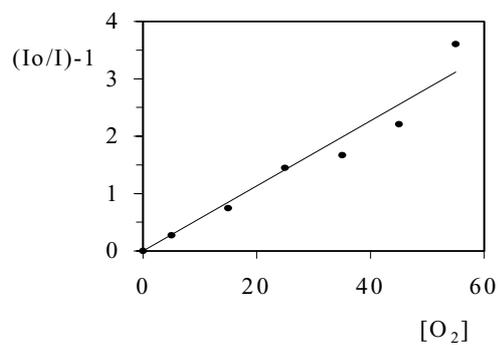


Figura 4.20. Representación de Stern-Volmer. Membrana de silicona.

4.3. Caracterización de membranas de poliestireno

4.3.1. Físicas

La zona sensora de estas membranas de poliestireno se presenta como una película circular sólida bien adherida al soporte, homogénea, translúcida y de color rosa, de 11 mm de diámetro y con un espesor promedio de 5 μm .

4.3.2. Espectroscópicas

4.3.2.1. Espectro de absorción

A continuación se registra como en los casos anteriores el espectro de absorción de las membranas de PS (Figura 4.21) Este espectro es similar a al obtenido para el caso de PVC apareciendo las bandas, como es de esperar en los mismos rangos de longitudes de onda. El espectro es concordante también con el obtenido por Okura¹⁰ para una membrana de poliestireno usando el mismo luminóforo.

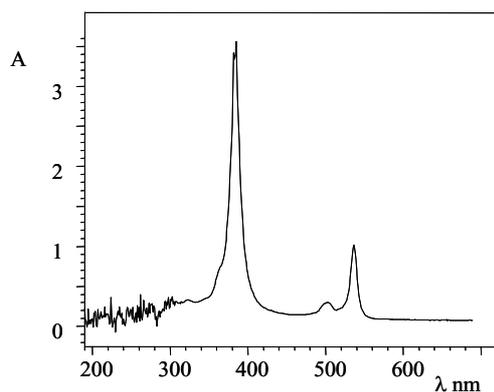


Figura 4.21. Espectro de absorción del complejo PtOEP en PS.

4.3.2.2. Espectros de excitación y de emisión fosforescente

El espectro de excitación y emisión en poliestireno es también similar a los obtenidos para las membranas anteriores (Figura 4.22). Se observa el máximo de emisión del PtOEP a 534 nm y el de emisión a 643 nm para membranas de PS. El espectro se realizó con rendijas

de excitación y emisión de 5 nm. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Okura⁴ para los espectros de emisión del complejo PtOEP en membranas de poliestireno.

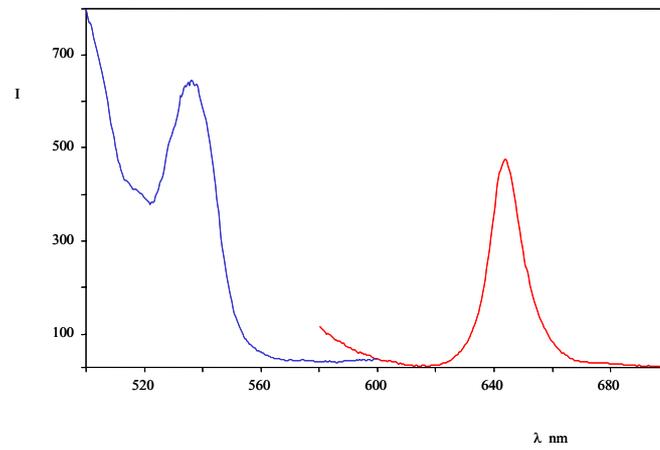


Figura 4.22. Espectros de excitación y emisión del PtOEP en PS.

4.3.3. Respuesta a oxígeno

En la Figura 4.23 se muestra la atenuación de fosforescencia que provoca el O₂ sobre las membranas de PS.

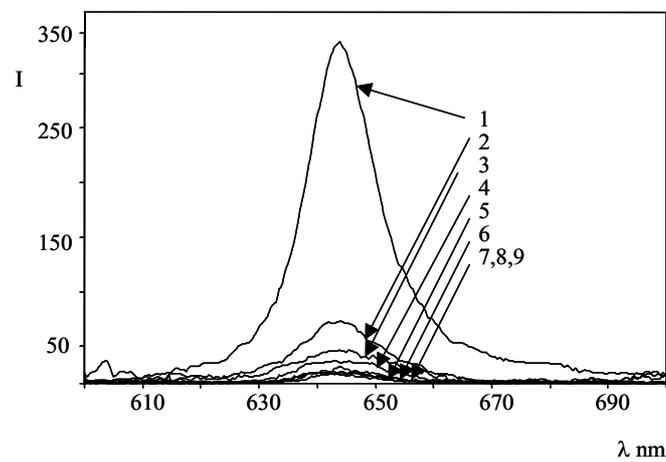


Figura 4.23. Espectro de fosforescencia de membranas de poliestireno con diferentes concentraciones de oxígeno.

Tabla 4.7. Intensidad de fosforescencia para diferentes porcentajes de oxígeno en membranas de poliestireno.

O ₂ (%)	Curva	I	(I ₀ /I)-1	I/I ₀	1/[O ₂]
0	1	383,00	0	1,000	
3	2	68,57	4,59	5,595	0,333
6	3	56,48	5,79	6,793	0,167
9	4	45,19	7,49	8,490	0,111
12	5	34,64	10,07	11,070	0,083
14	6	31,58	11,15	12,148	0,071
17	7	33,81	10,35	11,347	0,059
19	8	32,28	10,88	11,885	0,053
21	9	32,70	10,73	11,732	0,048

La representación de los valores de intensidad relativa de fosforescencia al máximo de emisión frente a la inversa del porcentaje de oxígeno (Tabla 4.7) muestra un decaimiento exponencial en la intensidad (Figura 4.24). Como podemos comprobar, la sensibilidad de esta membrana de poliestireno hacia oxígeno es mayor que en el caso de la de PVC. De ahí la gran caída de intensidad cuando se tiene oxígeno en el medio.

Para comprobar si se cumple la ecuación de Stern-Volmer se representó $(I_0/I)-1$ en función del porcentaje de oxígeno. La representación debería ser una línea recta con una pendiente igual a la pendiente de Stern-Volmer, K_{SV} . La Figura 4.25 muestra que no se obtiene respuesta lineal, sin embargo se calculó el valor de la pendiente K_{SV} en el tramo que pudiera considerarse lineal, hasta el 14% de oxígeno y en este caso $K_{SV} = 0,789$ para un $r^2 = 0,919$.

Se puede utilizar también la ecuación de Stern-Volmer modificada $(I/(I_0-1) = 1/fK[O_2] + 1/f)$ para tratar de obtener un ajuste lineal Figura 4.26.

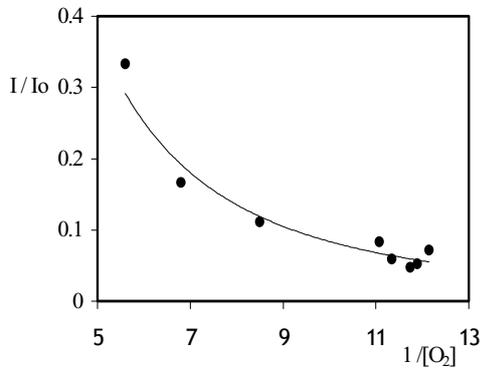


Figura 4.24. Decaimiento de la fosforescencia emitida por la membrana de PS.

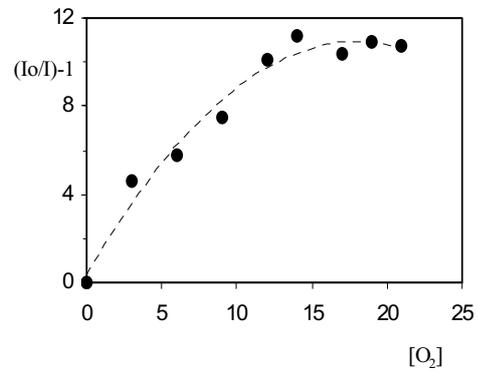


Figura 4.25. Representación de Stern-Volmer. Membrana de PS.

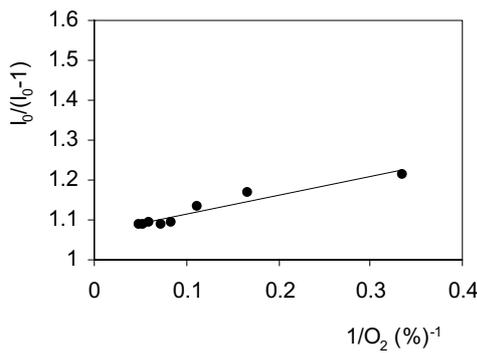


Figura 4.26. Representación de la ecuación modificada de Stern-Volmer para las membranas de PS con 500 mg/L de PtOEP. Instrumentación convencional.

De este modo sí se obtiene una representación lineal que sigue la ecuación $y = 0,4751x + 1,0679$ para un $r^2 = 0,9275$.

4.4. Comparación de membranas

En la Tabla 4.8 se recogen los valores de pendiente y coeficiente de correlación para las funciones de Stern-Volmer de las tres membranas desarrolladas, el valor de intensidad de fosforescencia relativa al 100% de nitrógeno (I_0) y el valor del cociente entre la intensidad de fosforescencia relativa en ausencia y en presencia de oxígeno (I_0/I_{100}) de cada una de las

membranas. Los resultados han sido obtenidos mediante la instrumentación convencional. Para el caso de poliestireno y silicona no se llegó al 100% de oxígeno y el dato se refiere a la cantidad máxima de oxígeno ensayada. Los valores de pendiente son las constantes de Stern-Volmer expresadas en $(\%)^{-1}$. Se observa que la mayor sensibilidad para oxígeno, mayor constante K_{SV} , la presenta el poliestireno, luego la silicona y por último el PVC. Las membranas de PVC responderían a proporciones de oxígeno que llegan al 100%, mientras que las de poliestireno solo responden hasta un 30%.

Tabla 4.8. Datos de ajuste de la ecuación de Stern-Volmer para las tres membranas.

Matriz	I_0	I_0/I_{100}	$K_{SV}, \%^{-1}$	Rango lineal
PVC	659	1,52	0,012 $r^2=0,9884$	1% al 100%
Silicona	45*	4,53	0,058 $r^2=0,949$	1% al 55%
PS	383	11,91	0,789 $r^2=0,919$	1% al 14%

*El ancho de rendija para el espectro de la silicona fue mayor que para PS y PVC.

5. Caracterización del prototipo de instrumentación portátil P01

El primer prototipo que se desarrolló para la medida de la concentración de oxígeno basado en atenuación de la luminiscencia emitida por la PtOEP fue el prototipo P01. En la zona sensora diseñada para este prototipo se incluyeron las membranas sensoras desarrolladas que habían sido caracterizadas mediante la instrumentación de sobremesa y se estudió la respuesta que se obtenía con el P01. La forma de realización de las medidas con el prototipo P01 para estas membranas está indicada en el apartado de metodología de medida del Capítulo 2. De las membranas ensayadas, las membranas de silicona no originaban cambios de señal al modificar el porcentaje de oxígeno debido a la escasa luminiscencia que poseen. Por tanto, el estudio de la respuesta del P01 se lleva a cabo solo con las membranas de PVC y PS.

5.1. Con membranas de PVC

5.1.1. Función de calibrado

A continuación se muestran los resultados obtenidos con el prototipo portátil, oxímetro digital, P01 para la función de calibrado ($I/I_0 - 1 = 1/K[O_2]$) usando la membrana de PVC (Figura 4.27). De este ajuste lineal obtenemos un valor de ordenada de $0,041 \pm 0,013$ y un valor de pendiente de Stern-Volmer (K_{sv}) de $0,008 \pm 0,0004$ para tres réplicas de cada concentración de oxígeno. Se observa que el ajuste es lineal en todo el rango de concentraciones ensayadas.

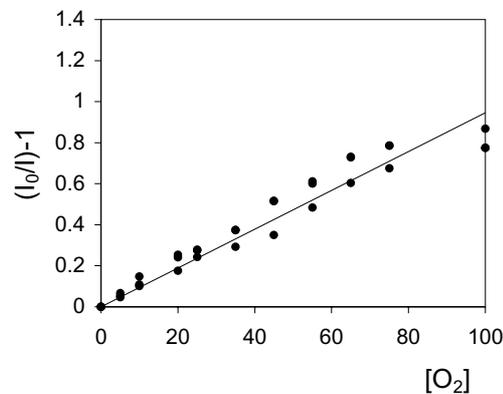


Figura 4.27. Representación de Stern-Volmer para las membranas de PVC con 500 mg/L de PtOEP.

5.1.2. Reproducibilidad

5.1.2.1. Reproducibilidad Intramembrana.

Los valores obtenidos con el prototipo utilizando una misma membrana de PVC para diferentes porcentajes de oxígeno, así como la desviación estándar relativa de los mismos se recogen en la Tabla 4.10.

Como podemos observar en los datos reflejados en la Tabla la reproducibilidad intramembrana es inferior al 5% en todos los casos.

Tabla 4.10. Señal obtenida para réplicas de la misma membrana y DER en función de la concentración de oxígeno

O ₂ (%)	Serie 1	Serie 2	Serie 3	DER(%)
0	717	777	760	4,65
5	685	728	721	3,81
10	651	677	685	3,25
20	610	620	612	1,51
25	577	608	596	3,31
35	555	566	553	1,97
45	531	513	501	3,71
55	483	482	475	1,74
65	447	449	440	1,96
75	428	435	423	2,34
100	404	412	407	1,97

5.1.2.2. *Reproducibilidad Intermembrana.*

Se midió la señal a oxígeno ambiente de 5 membranas de PVC fabricadas con cócteles que contienen 500 mg/L del complejo PtOEP. (Tabla 4.12).

El valor medio obtenido para la señal fue de 665 y la desviación estándar relativa es del 7,2% para esas cinco medidas.

Tabla 4.12. Reproducibilidad usando distintas membranas.

Membrana	Señal
M1	734
M2	639
M3	649
M4	611
M5	720

5.1.3. Estabilidad de la membrana de PVC

La iluminación continuada de las membranas conteniendo el luminóforo provoca su fotodegradación. Para conocer la fotoestabilidad de las membranas de PVC, se iluminó esta continuamente con la luz verde del LED durante 130 minutos, observando que la intensidad decae con el tiempo, tal como muestra la Figura 4.28.

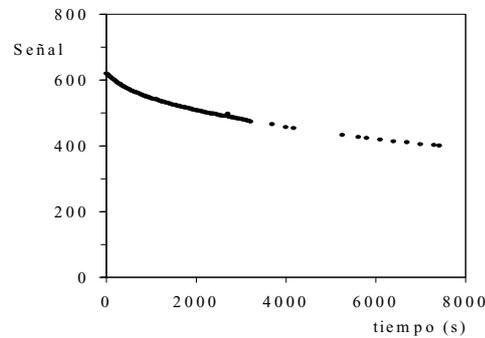


Figura 4.28. Decaimiento de la señal con el tiempo de iluminación. Membranas de PVC.

De acuerdo con lo indicado por S. Lee y col.⁴ observamos que la intensidad decae mucho en los primeros 30 minutos sufriendo menores cambios a continuación. El decaimiento es del 16% de la señal en 30 minutos, llegando a un 35% de la señal en 130 minutos.

Debido a esta gran caída de señal con iluminación continuada se vio la necesidad de realizar las medidas de forma que solo esté iluminada la membrana durante el tiempo de medida y que este sea lo menor posible y, por otro lado, realizar las medidas a un tiempo fijo de iluminación.

5.2. Con las membranas de PS

5.2.1. Función de calibrado

A continuación se muestran los resultados obtenidos con el oxímetro digital P01 para la función de calibrado ($I/I_0 - 1 = 1/K[O_2]$) usando las membranas de 500 mg/L antes indicadas (Figura 4.29).

La ecuación de Stern-Volmer no permite un ajuste lineal como ya hemos visto para el caso de las medidas realizadas con la instrumentación convencional. Por ello, es necesario usar la ecuación de Stern-Volmer modificada ($I/I_0 - 1 = 1/fK[O_2] + 1/f$) (Figura 4.30).

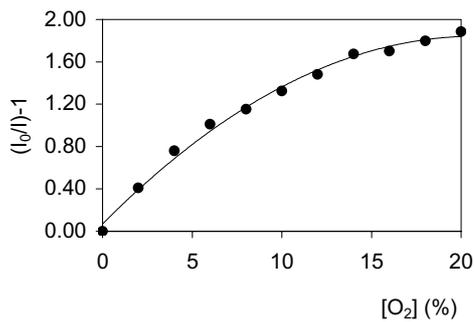


Figura 4.29. Representación de Stern-Volmer para las membranas de PS de 500 mg/L de PtOEP.

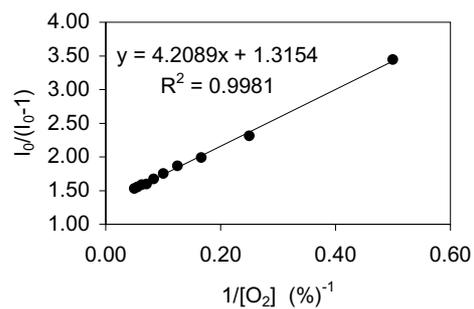


Figura 4.30. Representación de la modificada de Stern-Volmer para las membranas de PS de 500 mg/L de PtOEP.

5.2.2. Reproducibilidad.

Se calculó la reproducibilidad de los resultados usando la membrana de poliestireno que acabamos de poner a punto en el oxímetro P01. Se plantea este estudio de reproducibili-

dad a dos niveles diferentes: usando la misma membrana y empleando diferentes membranas, con lo que estudiaremos la reproducibilidad de la preparación de las mismas.

5.2.2.1. *Reproducibilidad Intramembrana.*

Realizamos el experimento midiendo tres réplicas de la misma membrana como se muestra en la Tabla 4.11.

Observamos que la desviación estándar relativa en torno al 10% para tres réplicas de la misma membrana lo que es algo superior a la obtenida para las membranas de PVC que era inferior al 5% también para tres réplicas a diferentes concentraciones de oxígeno.

Tabla 4.11. Señal obtenida para la misma membrana y DER en función de la concentración de oxígeno.

$[O_2]$ (%)	Serie 1	Serie 2	Serie 3	DER (%)
0	551	534	508	4,83
2	391	346	329	10,14
4	313	286	273	8,40
6	274	253	236	9,06
8	256	229	213	11,06
10	237	212	200	10,57
12	222	202	188	10,34
14	206	190	181	8,66
16	204	186	174	10,16
18	197	180	168	10,22
20	191	173	161	10,91

5.2.2.2. *Reproducibilidad Intermembrana.*

Se midió la señal a oxígeno ambiente de 5 membranas de poliestireno fabricadas con cócteles que contienen 500 mg/L del complejo y en las mismas condiciones. Los resultados se muestran en la tabla (Tabla 4.12) donde se puede ver que no hay buena reproducibilidad intermembrana.

Tabla 4.12. Reproducibilidad usando distintas membranas

Membrana	Señal
M1	108
M2	235
M3	150
M4	228
M5	260

El valor medio que se obtuvo obtenido para la señal fue de 196 y la desviación estándar relativa fue del 33%, lo que suponía una muy baja reproducibilidad intermembrana.

5.2.3. *Precisión intermedia*

Se estudió la precisión intermedia de las membranas sensoras de poliestireno para ello se hizo el seguimiento de la señal obtenida por una membrana en diferentes días a lo largo de dos meses. Para cada día en el que se realizaron medidas se ensayaron concentraciones de oxígeno de 0, 2, 5, 10, 15 y 20% (Tabla 4.13). Los datos fueron obtenidos con el prototipo P01 y podemos observar una considerable caída de la señal y una alta desviación estándar relativa.

Tabla 4.13. Reproducibilidad a lo largo del tiempo en función de la concentración de oxígeno.

O ₂ %	Día										DER %
	1	7	13	26	35	40	47	55	60		
0	533	319	324	276	191	282	236	275	216		34
2	419	206	215	183	--	196	160	190	--		40
5	350	153	168	--	88	--	--	--	105		60
10	--	122	134	--	--	128	--	128	78		19
15	265	103	115	--	--	--	--	--	--		56
20	--	92	106	92	48	98	74	100	64		24

Con estos resultados obtenidos en el estudio de la señal con el tiempo se obtiene una deriva de la señal del 0,67% al día considerando la deriva como la disminución de intensidad a lo largo del tiempo para una concentración del 0% de O₂.

5.3. Comparación de resultados

Las membranas de PVC desarrolladas, nos permiten medir concentraciones de oxígeno de hasta el 100% con el prototipo P01 y al aplicar la función de Stern-Volmer resultaba una relación lineal, sin embargo, son poco sensibles e inestables bajo iluminación continuada. En la Tabla 4.14 se muestran datos comparativos obtenidos con el P01 para estos dos tipos de membranas. En ella indicamos la desviación estándar relativa de la señal obtenida para porcentajes del 10% y del 20% de oxígeno, así como el valor de las pendientes de las ecuaciones de Stern-Volmer K_{sv} y de la modificada de Stern-Volmer K_{svm} , la deriva de la señal en porcentaje por día, la caída de señal en 30 minutos de iluminación continuada con el LED y por último el cociente entre los valores de señal a 0 y 100% de oxígeno obtenidos con el prototipo P01.

Tabla 4.14 Datos comparativos obtenidos con el P01.

	PVC	PS
K_{SV}	$0,009\%^{-1}$	$*0,177\%^{-1}$
K_{SVM}	-	4,209
DER al 10%	3,25%	10,57%
DER al 20%	1,51%	10,91%
Deriva señal	-	0,67%/día
Caída de señal (30 min)	16%	-
I_0/I_{100}	1,55	3,40

* Para el rango lineal, hasta el 12% de O_2

Los valores de pendiente obtenidos con el P01 indican que es un sistema menos sensible que cuando se mide con instrumentación convencional.

Si se representa la ecuación modificada de Stern-Volmer usando intensidades relativas tanto para membranas de PVC como de PS se obtiene la Figura 4.31

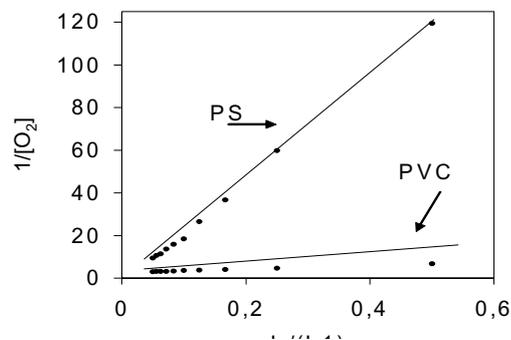


Figura 4.31. Representación de la modificada de Stern-Volmer para PS y PVC

Se observa que la sensibilidad para el PS es mucho mayor que para el PVC. En concreto, la función respuesta para membrana de PS es $y = 247,84x + 4,0417$ ($r^2 = 0,9989$) y para PVC es $y = 8,1645x + 2.6729$ ($r^2 = 0,9975$); esto es, la sensibilidad de la membrana de PS es 30 veces la de PVC.

6. Limitaciones

El prototipo P01 tiene limitaciones no sólo técnicas, comentadas en el Capítulo 3 de esta Memoria de Doctorado, si no también debidas a la caída de señal por parte de las membranas sensoras que usa. Algunas membranas no dan intensidad suficiente para ofrecer respuesta a oxígeno con este prototipo como es el caso de la de silicona y las membranas de poliestireno sólo pueden ser medidas hasta un 30%. Las membranas de PVC sí que dan respuesta a oxígeno en todo el rango de concentraciones pero no son estables, decayendo la señal un 35% durante 130 minutos de iluminación continuada con el LED verde.

Las membranas de PS fueron más estables de hecho se hizo un estudio de la señal obtenida para una membrana de PS durante 60 días, aunque el resultado fue malo dando una precisión intermedia (DER) del 24% para las medidas efectuadas al 20% de oxígeno durante ese tiempo.

CAPÍTULO 5
DESARROLLO DE UN SENSOR
ÓPTICO PARA OXÍGENO.
CARACTERIZACIÓN DE LOS
PROTOTIPOS P02 Y P03

1. Introducción

Uno de los problemas que presentan las membranas sensoras de oxígeno empleadas en el desarrollo del prototipo P01 es su baja estabilidad. Por ello, en el desarrollo de los prototipos P02 y P03, además de las mejoras técnicas realizadas respecto al P01, recogidas en el Capítulo 3 de esta Memoria, hemos estudiado diferentes opciones para mejorar también la estabilidad de dichas membranas.

Para algunas aplicaciones, los sensores ópticos requieren una alta concentración de luminóforo y una intensidad de excitación alta, como es nuestro caso, por ello es posible encontrar problemas de decaimiento de señal de las membranas debida a procesos de fotodegradación del luminóforo.

En general, los compuestos aromáticos sufren fotodegradación debida a la conjugación, a la alta densidad electrónica y al relativamente bajo potencial de oxidación que presentan. Para combatir esta fotooxidación se han seguido diversos caminos: 1) Así Papkovsky y col.¹ estudiaron modificaciones en el anillo de la porfirina con objeto de aumentar la fotoestabilidad. Se modificó la PtOEP y se obtuvieron cetonas derivadas, en concreto la octaetilporfirin cetona de platino (PtOEPK), con esta porfirina se ha descrito que en membranas de poliestireno y bajo condiciones de iluminación intensa y continua con luz

¹ D.B. Papkovsky, G.V. Ponomarev y W. Trettnak, Anal. Chem., 67, 4112 (1995).

policromática durante 18 horas a 22°C, la caída de señal es del 90% para PtOEP mientras que para el derivado cetónico es sólo del 12%; con lo que la fotoestabilidad del derivado cetónico mejora unas 10 veces a la de la porfirina de platino. 2) La modificación de la periferia del anillo porfirínico mediante sustituyentes pentafluorofenílicos^{2,3} puede mejorar también la fotoestabilidad de las porfirinas ya que estos sustituyentes hacen que se aumente el potencial redox y la densidad electrónica, por lo que se estabiliza el compuesto frente a procesos redox y son por tanto más fotoestables. 3) Otra alternativa para mejorar la fotoestabilidad es mediante el uso de matrices poliméricas fluoradas⁶ ya que las propiedades ópticas de las membranas sensoras dependen también en gran medida de la matriz en la que se encuentra inserto el material luminiscente que interacciona con las moléculas de polímero⁴. La alta electronegatividad del flúor hace que estos sistemas sean más estables frente a la fotooxidación. 4) Uso de atenuadores de oxígeno singlete, subproducto del proceso de atenuación de la luminiscencia por oxígeno, el cual es más reactivo que el oxígeno molecular y, como consecuencia, causante en gran medida de la fotooxidación.¹³

En este Capítulo se expone el trabajo desarrollado para poner a punto y posteriormente caracterizar membranas sensoras de oxígeno que eviten el problema de la fotodescomposición. Esto lo hacemos mediante dos caminos, primero intentamos el uso de polímeros fluorados que pueden ser más estables que poliestireno o PVC y, por otro lado, mediante el empleo de atenuadores de oxígeno singlete.

2. Uso de polímeros fluorados

Se pueden emplear polímeros fluorados como material de membrana por la gran permeabilidad que presentan a oxígeno. La afinidad a oxígeno es inducida por la gran electronegatividad de los fluoruros, lo que origina una alta permeabilidad a ese gas⁵ (en la Tabla 4.3 de esta Memoria se comparan los datos de permeabilidad de polifluoruro de vinilo

² S.K. Lee y I. Okura, *Anal. Commun.*, 34, 185 (1997).

³ G. E. Khalil, M. P. Gouterman y E. Green, US Patent 5,043,286 (1991).

⁴ Y. Amao, T. Miyashita y I. Okura, *Analyst*, 125, 871 (2000).

⁵ A.G. Pittman, Wiley Interscience, *Fluoropolymers*, New York, p446 (1972).

con otros polímeros). Por otra parte, la longitud del enlace carbono-flúor es corta (13,17 nm) y la electronegatividad del flúor es grande, al igual que su energía de enlace (116 Kcal/mol), comparada con el enlace C-H (99,5 Kcal/mol). Todo esto hace a los sensores ópticos, que emplean estos polímeros, más estables contra la fotooxidación^{6,7}.

Como fluoropolímero hemos ensayado el poli(isobutimetacrilato-co-tetrafluoroetilmetacrilato) cuya síntesis hemos descrito en el Capítulo 2. En la Figura 5.1 se indica su fórmula desarrollada en la que n y m serían los porcentajes de monómeros, isobutimetacrilato y tetrafluorometil metacrilato, respectivamente.

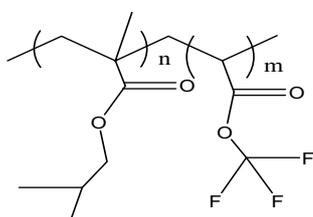


Figura 5.1. Polímero poli(isobutimetacrilato-co-tetrafluoroetilmetacrilato).

2.1. Membranas sensoras de poli(isobutimetacrilato-co-tetrafluoroetilmetacrilato)

2.1.1. Preparación

Para la preparación de estas membranas pesamos en un vial de vidrio 0,5 mg de PtOEP que se disuelven en 1,0 mL de disolución del 10% de poli(isobutimetacrilato-co-tetrafluoroetilmetacrilato) en THF. Se depositan 30 μ L del cóctel sobre el soporte de Mylar en la manera usual. La película circular obtenida se adhiere bien al soporte de Mylar y es transparente y de color rosa.

⁶ A. Yutaka, M. Tokuji y O. Ichiro, *Reac. Func. Polymers*, 47, 49 (2001).

⁷ R.N. Gillanders, M.C. Tedford, P.J. Crilly y R.T. Baey, *J. Photochem. Photobiol. A*, 163, 193 (2004).

2.1.2. Respuesta a oxígeno

Se ha estudiado la respuesta a oxígeno de estas membranas, obteniendo los resultados indicados en la Tabla 5.1 y Figura 5.2. La representación de Stern-Volmer con estas membranas presenta mucha curvatura, siendo estas membranas sensoras poco sensibles a oxígeno a concentraciones superiores al 5%.

Tabla 5.2. Función de Stern-Volmer para el fluopolímero.

O ₂ (%)	Señal	(I ₀ /I) - 1
0	449	0,00
2	336	0,34
5	305	0,47
10	289	0,55
15	277	0,62
20	274	0,64

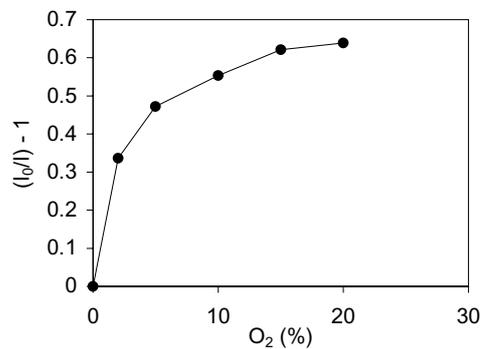


Figura 5.2. Representación de Stern-Volmer para las membranas de fluopolímero.

2.1.3. Estabilidad

Los resultados obtenidos en el estudio de estabilidad indican que esta es baja. Así cuando iluminamos continuamente durante 30 minutos la membrana con el LED de 535 nm, la señal decae un 33% (Figura 5.3), decaimiento que es incluso mayor que el encontrado para las anteriores membranas de poliestireno. Se observó por tanto que el empleo de polímeros fluorados no nos ayudaba a conseguir aumentar la estabilidad de la señal en las medidas realizadas con los prototipos desarrollados, por lo que se descartó su uso.

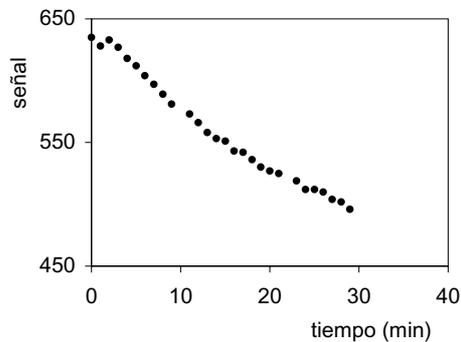
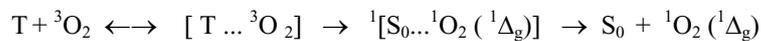


Figura 5.3. Estabilidad de las membranas de fluoropolímero con 500 mg/L de PtOEP.

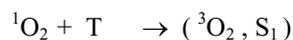
3. Atenuadores de oxígeno singlete

3.1. El oxígeno singlete.

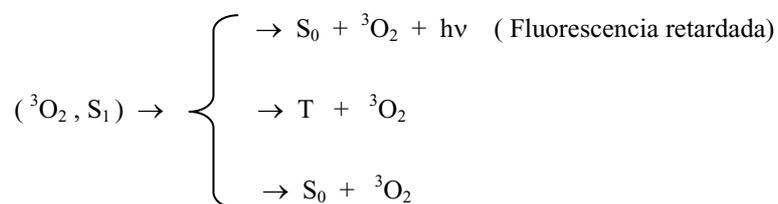
Otro camino para mejorar la estabilidad de las membranas es la adición de atenuadores de oxígeno singlete. Es conocido que el oxígeno singlete es el mayor causante de esta fotodegradación, al ser éste más reactivo que el oxígeno molecular. El mecanismo de formación de oxígeno singlete es el siguiente:



El oxígeno forma un complejo con el luminóforo en estado excitado T y ese complejo se relaja originando el luminóforo en estado fundamental y oxígeno singlete (1O_2) que es más reactivo y puede reaccionar con el estado triplete desactivando la fosforescencia y formando el exciplexo (${}^3O_2, S_1$). Esto se puede poner de manifiesto por la existencia de una fluorescencia retardada y este proceso es más acusado a altas concentraciones de luminóforo, como es nuestro caso⁸. El mecanismo propuesto Para este sistema es el siguiente:



⁸ P.P. Levin y S.M. Costa, Chem. Physics, 263, 423 (2001).



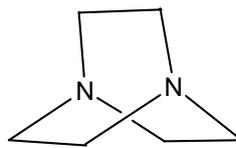
De estos tres procesos de descomposición del exciplexo formado, el primero de ellos es el más importante, pues los dos siguientes tienen menor eficiencia. El rendimiento de formación de fluorescencia retardada puede alcanzar el 25% de la fluorescencia.

3.2. Eliminación del oxígeno singlete.

Hay varios medios por los cuales se puede eliminar el oxígeno singlete producido: mediante reacción química o mediante atenuación física⁹. Algunos compuestos electrón donores han sido estudiados como atenuantes físicos de oxígeno singlete como son sulfuros¹⁰, fenoles¹¹ y azidas¹². La adición de estas sustancias a la membrana sensora podrían reducir los efectos de caída de la señal en intensidad y el tiempo de vida por fotooxidación.

Uno de los aditivos utilizados es el 1,4-diazabicyclo[2,2,2] octano (DABCO) (Figura 5.4), una amina terciaria cíclica, que actúa como transferente de energía por formación de un complejo intermedio de transferencia parcial de carga debido al par de electrones de la amina.

Figura 5.4 Estructura del 1,4-diazabicyclo[2,2,2] octano.



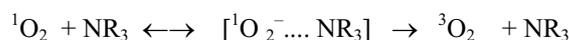
⁹ R. L. Clough, N. C. Billingham y K. T. Gillen; Polymer durability, Advances in Chemistry Series 249, ACS, Washington, (1996).

¹⁰ R.A. Ackerman, J.Rosenthal y J.N. Pitts, J. Chem. Phys., 54, 4960 (1971).

¹¹ K. Furukawa y E.A. Ogryzlo, Chem. Phys. Letters, 12, 370, (1971).

¹² C.S. Foote, T.T. Fujimoto y Y.C. Chang, Tetrah. Letters, 45 (1972).

El mecanismo de actuación propuesto es el siguiente¹³:



Este compuesto es fotoquímicamente estable, no reacciona químicamente con el oxígeno singlete y no absorbe ni emite radiación en la región del espectro que usamos.

3.3. Preparación de membranas sensoras de poliestireno con aditivo estabilizante

3.3.1. Preparación de la membrana

Para la preparación de estas membranas pesamos en un vial de vidrio 0,5 mg de PtOEP y 12 mg de diazabicyclo-octano (DABCO) que disolvemos en 1,0 mL de disolución del 5% de poliestireno en THF. Depositamos 30 μL del cóctel sobre la lámina de poliéster y tras preparar la membrana la dejamos secar en un recipiente hermético en atmósfera saturada de tetrahidrofurano. De esta forma se consigue una película circular sólida, homogénea, adherida al soporte sólido, transparente y de color rosa, cuyas dimensiones son de 6 mm de diámetro y 14 μm de espesor.

El tamaño y las dimensiones de las membranas preparadas fueron iguales que las que se preparaban para el prototipo P01.

3.3.2. Selección de la cantidad de DABCO

Para establecer la proporción de DABCO óptima en la membrana sensora, se prepararon membranas con diferentes concentraciones de atenuante en porcentaje en peso que se midieron con el oxímetro P01 (Tabla 5.3 y Figura 5.5).

¹³ P. Hartmann, M.J.P. Leiner y P. Kohlbacher, Sens. Actuators B, 51, 196 (1998).

[DABCO] (%)	Señal
0	241
10	162
15	150
20	146
25	152
30	154
35	88
40	76
50	3

Tabla 5.3. Influencia del porcentaje de DABCO sobre la señal a oxígeno ambiente.

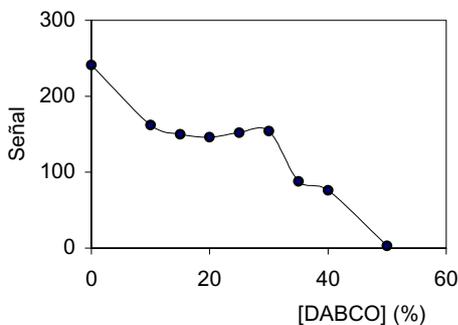


Figura 5.5. Influencia de la proporción de DABCO sobre la señal.

En presencia de oxígeno ambiente disminuye la señal obtenida con el aumento de la concentración de DABCO en las membranas sensoras. Sin embargo, al ser este sistema más sensible, como se verá más adelante, la señal bajo atmósfera de nitrógeno aumenta considerablemente con respecto a la obtenida con membranas anteriores teniendo ofreciendo estas membranas un parámetro I_0/I_{100} mayor al de las membranas de poliestireno y PVC.

3.4. Caracterización de las membranas

3.4.1. Características espectroscópicas.

Se registró el espectro de excitación y emisión fosforescente de una membrana de PS conteniendo un 25% en peso de DABCO (Figura 5.6), comprobándose que la longitud de onda de máximo de excitación es 534 nm y la de emisión 645 nm, esto es, la presencia de atenuante no modifica prácticamente las características luminiscentes del complejo PtOEP en membrana de PS. Recordemos que para la membrana de poliestireno sin atenuador de oxígeno singlete los máximos de excitación y emisión fosforescente obtenidos fueron de 534 y 643 nm, respectivamente.

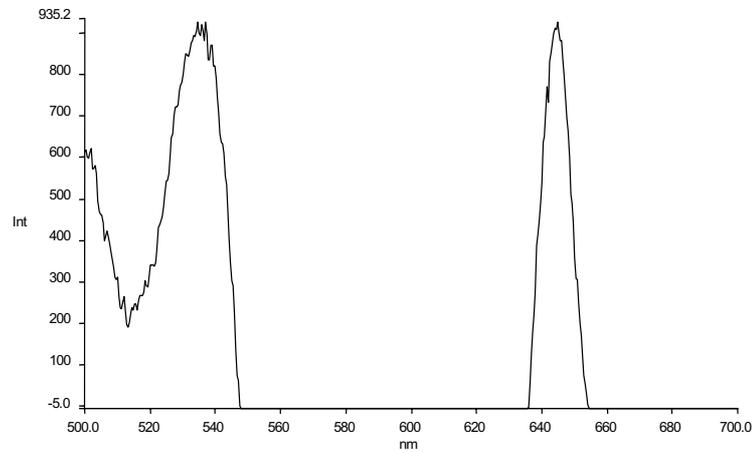


Figura 5.6. Espectros de excitación y emisión fosforescente de la membrana de PtOEP en PS con 25% de DABCO.

3.4.2. Estabilidad

La intensidad de la membrana de poliestireno decae cuando la iluminamos de forma continuada con el LED, aunque estemos bajo atmósfera de nitrógeno, mientras que en las membranas con el aditivo atenuante de O_2 singlete, ocurre esto en menor proporción. En ausencia de oxígeno se comprueba que las membranas conteniendo DABCO son muy estables, no observándose disminución de señal, sino antes bien un ligero aumento (Figuras

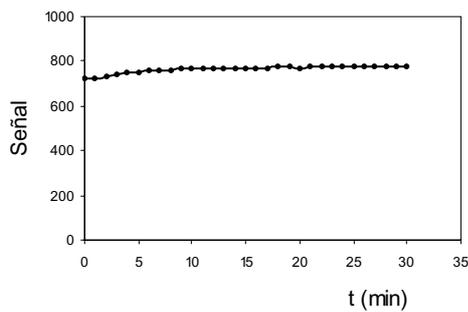


Figura 5.7. Variación de señal en ausencia de oxígeno. Membrana de PS con 25% en peso de DABCO.

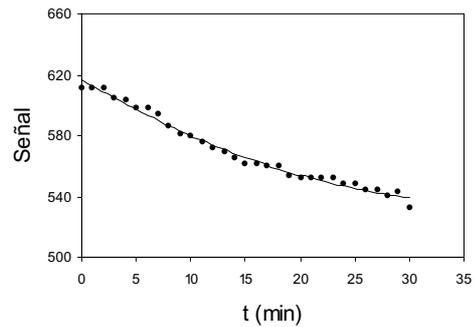


Figura 5.8. Variación de señal en ausencia de oxígeno. Membrana de PS sin DABCO.

Se ha estudiado la caída de la señal para distintas concentraciones de DABCO, con objeto de ver cuál es la proporción de DABCO que da mejor resultado. Este estudio lo hacemos con una atmósfera de un 21% de oxígeno, es decir a la proporción de oxígeno ambiente, e iluminando continuamente con el LED de trabajo durante una hora en el oxímetro P01. La caída de la señal en ese tiempo se muestra en la Tabla 5.4.

Se observa una considerable estabilización de la señal cuando hay DABCO presente. Esta estabilización aumenta con el incremento de concentración de atenuante, estando en torno al 2% de caída de señal para concentraciones de DABCO de iguales o superiores al 25% en peso. Las membranas obtenidas con un porcentaje en DABCO mayor del 30% tienen un aspecto no homogéneo ofrecen señales variantes.

Tabla 5.4. Caída de señal en % para las membranas con aditivo (DABCO).

[DABCO] (%)	Caída señal (%)
0	20,0
10	4,0
15	4,0
20	5,0
25	2,5
30	2,0

Con membranas de este tipo se estudió la estabilidad mediante su iluminación continuada durante seis horas (Tabla 5.5 y Figura 5.9). Al iluminar permanentemente, la señal decae como indican los anteriores resultados, pero al dejar en la oscuridad, la membrana se recupera nuevamente, por lo que podría pensarse que se trata de un proceso de fatiga. En el caso de membranas de PVC o PS sin aditivo no se observó recuperación de la señal.

Con las experiencias realizadas se eligió la cantidad de 25% en peso de DABCO como cantidad óptima para la fabricación del cóctel.

Tiempo de iluminación (horas)	Caída señal (%)
1	2,5
2	3,9
3	7,5
4	8,0
6	10,0

Tabla 5.5. Estabilidad de membranas con 25% de DABCO.

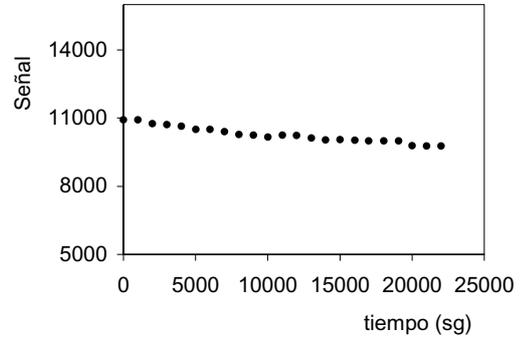


Figura 5.9. Estabilidad de membranas con 25% de DABCO.

3.4.3. Respuesta a oxígeno

Como hemos visto anteriormente, en sistemas homogéneos la atenuación de la señal por oxígeno obedece la ecuación de Stern-Volmer ($I_0/I = 1 + K_{sv} [O_2]$).

Para las membranas de PS con aditivo estabilizante (DABCO) la relación es lineal hasta un 10 % de oxígeno. La pendiente K_{sv} en este caso es 0,2971 y el valor de r^2 0,9985 (Figura 5.10). A concentraciones de oxígeno mayores aparece una curvatura positiva en la representación de Stern- Volmer (Figura 5.11).

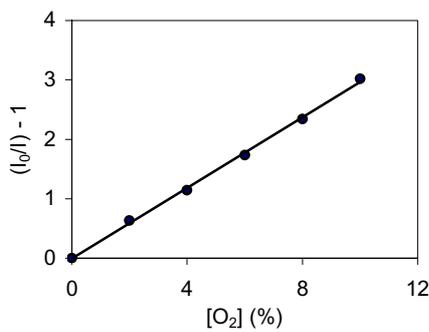


Figura 5.10. Representación de Stern-Volmer para membranas con 25% de DABCO.

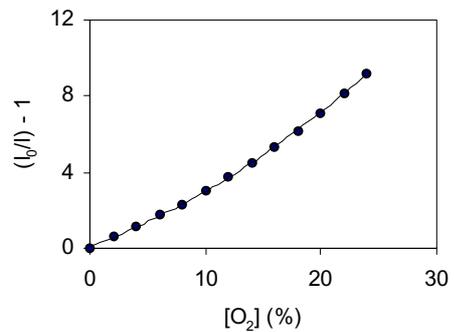


Figura 5.11. Representación de Stern-Volmer para membranas con 25% de DABCO.

Esta curvatura puede ser explicada suponiendo la existencia de atenuación dinámica y estática¹⁴.

Teniendo en cuenta la existencia de estos dos procesos se tiene que:

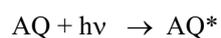
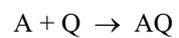
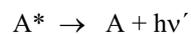
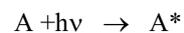
Por atenuación dinámica o colisional:



Cumpléndose que:

$$I_0/I = 1 + K_Q[Q] \quad (5.1)$$

Por atenuación estática:



Resultando ahora que:

$$I_0/I = 1 + \frac{\epsilon_A Q}{\epsilon_A} K[Q] = 1 + \gamma K [Q] \quad (5.2)$$

¹⁴ S.K. Lee y I. Okura, Spectrochim. Acta A, 54, 91 (1998).

Por tanto, la intensidad relativa de fosforescencia vendrá dada por el producto de ambas atenuaciones, dinámica y estática.

$$I_0/I = (1 + K_D[Q])(1 + K_S[Q]) = 1 + K_1[Q] + K_2[Q]^2 \quad (5.3)$$

$$\text{donde } K_1 = K_D + K_S \quad \text{y} \quad K_2 = K_D K_S$$

Como K_2 es positivo, si representamos $I_0/I - 1$ frente a $[Q]$, que es la concentración de atenuador, se obtendrá una curvatura positiva, que es lo que se observa en sistemas heterogéneos como el nuestro. Usando los datos de la Figura 5.11, se puede ajustar a la ecuación 5.3 en la forma $y = 0,006x^2 + 0,227x + 0,098$ con un valor de $r^2 = 0,999$, con lo que de esta forma se puede explicar la curvatura positiva obtenida.

Por otra parte, es posible linealizar los datos usando la ecuación modificada de Stern-Volmer, tal como hemos visto en varias ocasiones, independientemente de que la curvatura de la función sea positiva en lugar de la habitual negativa (Figura 5.12). La pendiente de la recta de calibrado obtenida es $K_{SV} = 3,247$ y $r^2 = 0,995$.

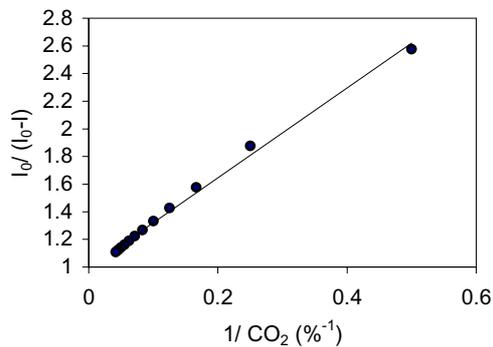


Figura 5.12. Representación de Stern-Volmer modificada con membranas con un 25% de DABCO.

3.4.4. Tiempo de vida

De manera alternativa a la calibración con medidas de intensidad usadas hasta ahora, se han utilizado también los valores de tiempo de vida. Para ello se ha usado el espectrofluorímetro Cary Eclipse que permite las medidas de tiempo de vida de fosforescencia. Las condiciones de medida fueron: tiempo de retardo 0,01 ms, tiempo de entrada 0,03 ms, número de ciclos 10, rendijas de excitación y emisión de 5 nm y las

longitudes de onda de excitación y emisión de 535 y 645 nm, respectivamente. Los resultados de tiempo de vida obtenidos para las distintas concentraciones de oxígeno ensayadas se muestran en la Tabla 5.5 y en la Figura 5.13.

La representación de Stern-Volmer con tiempos de vida muestra un comportamiento similar al observado cuando se representa la intensidad de fosforescencia. En este caso también aparece una curvatura positiva en la representación de Stern-Volmer (Figura 5.14). Podemos obtener una relación lineal hasta un 16% de oxígeno con una pendiente Ksv en este caso de 0,067 con un valor de $r^2 = 0,9897$ (Figura 5.15).

[O ₂] %	τ (ms)
0	0,091
4	0,077
8	0,063
12	0,052
16	0,044
20	0,037
24	0,032
30	0,026

Tabla 5.5. Variación del tiempo de vida con el porcentaje de O₂.

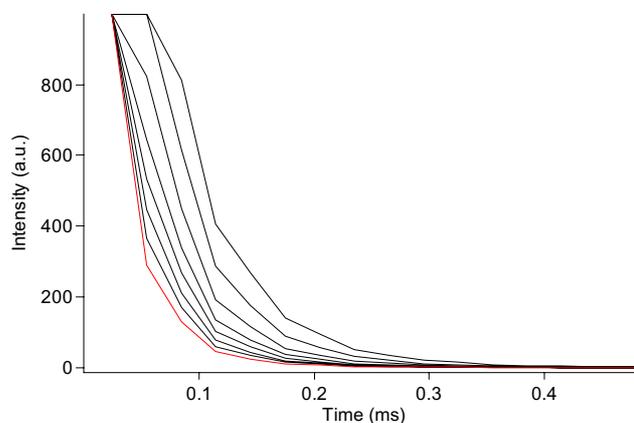


Figura 5.15. Curvas de decaimiento para diferentes porcentajes de oxígeno.

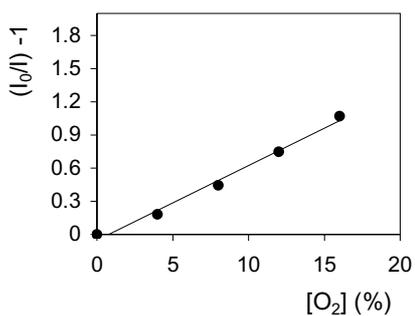


Figura 5.16. Representación de Stern-Volmer en tiempos de vida hasta el 16% de concentración de O₂.

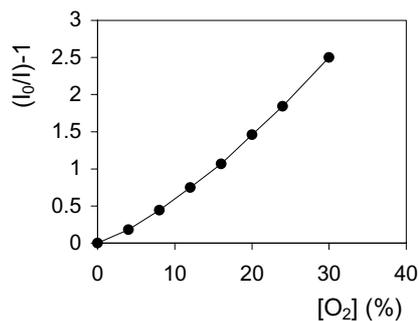


Figura 5.17. Representación de Stern-Volmer en tiempos de vida hasta el 30% de concentración de O₂.

3.4.5. Precisión intermedia.

Para comprobar que las membranas de PS conteniendo DABCO como estabilizador son adecuadas para medir la concentración de oxígeno de forma repetida, se estudió la señal con el prototipo para diferentes proporciones de oxígeno durante un periodo de tiempo de dos meses. Se prepararon membranas con diferente proporción de DABCO, en concreto, 0, 5, 15 y 25%. Las Tablas 5.6 a 5.9 muestran los resultados del estudio. El estudio se realizó con el P01.

Como conclusión se puede decir que la variación de señal es tanto mayor cuanto mayor es el porcentaje de oxígeno medido y, por otra parte, que las membranas que contienen estabilizante son más estables y dan lecturas más reproducibles que las que no lo tienen y dentro de las que contienen DABCO la mayor precisión, en términos de precisión intermedia estudiada a lo largo de dos meses, se encuentra para aquellas que contienen un 25% de estabilizante. En la tabla 5.10 se muestran los valores de DER obtenidos para cada una de las membranas a la concentración del 20% de oxígeno.

Tabla 5.6. Estabilidad de la señal para una membrana de PS sin estabilizador.

[O ₂]	Día									DER
(%)	1	7	13	26	35	40	47	55	60	(%)
0	533	319	324	276	191	282	236	275	216	34%
2	419	206	215	183	--	196	160	190	--	40%
5	350	153	168	--	88	--	--	--	105	60%
10	--	122	134	--	--	128	--	128	78	19%
15	265	103	115	--	--	--	--	--	--	56%
20	--	92	106	92	48	98	74	100	64	24%

Tabla 5.7 Estabilidad de la señal para una membrana de PS con un 5 % de DABCO.

[O ₂] (%)	Día													DER (%)
	1	2	3	4	7	8	13	26	35	40	47	55	60	
0	781	555	590	584	632	625	617	589	646	671	645	638	656	5%
2	552	387	--	422	450	457	453	440	489	505	485	480	--	9%
5	381	--	294	297	--	326	323	--	360	--	--	347	370	10%
10	212	143	--	166	166	189	188	181	222	--	--	209	231	14%
15	--	--	89	94	89	--	110	--	--	--	--	--	--	10%
20	50	--	--	41	--	63	61	53	83	85	74	76	93	26%

Tabla 5.8. Estabilidad de la señal para una membrana de PS con un 15 % de DABCO.

[O ₂] (%)	Día													DER (%)
	1	2	3	4	7	8	13	26	35	40	47	55	60	
0	--	--	--	--	1104	1092	1080	1079	1092	986	1046	973	1091	5%
2	805	--	823	826	831	817	819	853	843	910	845	865	--	3%
5	611	--	625	629	634	626	622	660	658	--	--	667	661	3%
10	405	--	421	423	429	420	420	--	455	496	442	463	461	6%
15	285	--	300	304	309	300	297	--	--	--	--	340	--	6%
20	204	221	221	222	230	222	218	244	248	287	238	258	271	10%
25	148	164	164	166	169	164	162	--	--	--	--	--	--	4%
30	104	--	119	122	--	126	118	135	142	180	--	--	--	17%

Tabla 5.9. Estabilidad de la señal para una membrana de PS con un 25 % de DABCO.

[O ₂] (%)	Día													DER (%)
	1	2	3	4	7	8	13	26	35	40	47	55	60	
0	--	--	--	--	1123	1123	1127	1110	1154	1073	1071	1016	890	2%
2	861	877	853	--	853	853	866	907	899	--	909	892	694	4%
5	656	669	656	--	663	663	662	721	706	--	--	--	480	4%
10	437	450	443	--	456	456	448	493	493	477	492	478	--	2%
15	311	323	318	--	--	--	322	--	--	--	--	--	269	8%
20	228	241	237	--	236	236	241	277	274	265	281	272	--	2%
25	170	181	177	--	176	176	181	--	--	--	--	--	--	13%
30	123	135	131	--	--	--	135	168	163	159	175	--	--	17%

[DABCO] (%)	DER (al 20% de O ₂)
0	24%
5	26%
15	10%
25	8%

Tabla 5.10. DER de la señal al 20% de O₂ para membranas con diferentes porcentajes de DABCO.

3.4.6. Deriva

A partir del estudio de estabilidad con el prototipo P01, se estima que la deriva de la señal para la medida de un 20% de oxígeno es del 0,25% al día para membranas de poliestireno conteniendo un 25% en peso en DABCO, mientras que es del 0,7% al día para membranas de PS sin DABCO. La estimación de la deriva está calculada como porcentaje que varía la señal obtenida para una concentración de oxígeno determinada.

4. Caracterización en el prototipo P02

Las membranas seleccionadas conteniendo un 25% de DABCO se midieron con el nuevo prototipo desarrollado P02. La forma en la que se llevaron a cabo estas medidas está indicada en el apartado de metodología de medida del Capítulo 2.

4.1. Respuesta a oxígeno

Se estudió la respuesta a oxígeno de las membranas con el prototipo P02 (Tabla 5.11) para lo que se hicieron midieron tres réplicas de medida para cada una de las concentraciones de oxígeno ensayadas.

Tabla 5.11. Señal obtenida con membranas de 25% de DABCO y el oxímetro P02.

[O ₂]	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	[O ₂]	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3
0	216.328	209.184	210.826	12	48.838	48.836	47.734
2	138.434	139.365	141.322	14	42.320	42.054	42.169
4	106.676	106.311	107.525	16	37.002	36.505	36.023
6	83.838	83.412	84.822	18	31.943	31.989	31.427
8	68.741	68.754	68.203	20	28.842	28.450	27.715
10	57.342	57.515	57.694	22	24.684	25.303	24.545

Se comprobó que la función de Stern-Volmer es lineal hasta el 10% (Figura 5.18), como ocurría con la obtenida en el caso anterior haciendo uso de la instrumentación convencional. La pendiente de Stern-Volmer obtenida de este calibrado es $K_{sv} = 0,269 \pm 0,0059$ con un $r^2 = 0,992$ para tres réplicas de cada concentración. Si se utiliza la ecuación modificada de Stern-Volmer (Figura 5.19) la linealidad se amplía hasta un 22%, resultando ahora una pendiente K_{svm} de 4,0026 con un $r^2 = 0,9938$.

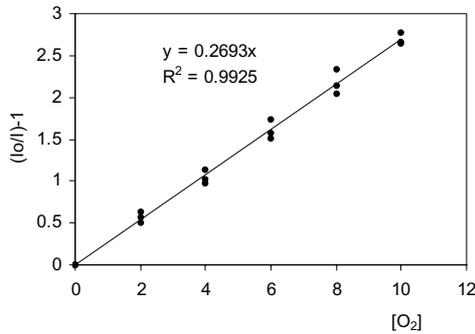


Figura 5.18 Representación de Stern-Volmer para membranas con 25% de DABCO. Prototipo P02.

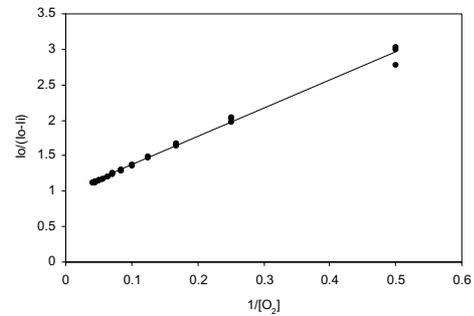


Figura 5.19 Representación de la modificada de Stern-Volmer para membranas con un 25% de DABCO. Prototipo P02.

4.2. Capacidad de respuesta de la membrana.

Dado que el prototipo P02 dispone de salida para ordenador personal, se pueden recoger los valores medidos y hacer un seguimiento de los resultados que no podíamos hacer en el prototipo P01 previo. En este caso, sí podemos ver gráficamente la respuesta de la señal a atmósferas cambiantes de oxígeno a nitrógeno. Cuando medimos estas membranas conteniendo estabilizador se observa que hay una modificación de la señal después de exponer la membrana a atmósferas de nitrógeno y oxígeno puros de manera alternativa (Figura 5.20).

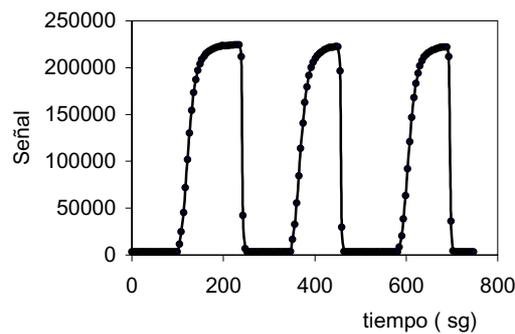


Figura 5.20. Variación de la señal del prototipo P02 bajo exposición alternativa a atmósferas de nitrógeno y oxígeno puros.

Como se comenta en el capítulo 2, el tiempo de respuesta $t(N_2 \rightarrow O_2)$ y de recuperación $t(O_2 \rightarrow N_2)$ es el tiempo que transcurre desde que se sitúa el sensor del prototipo en una atmósfera dada en llegar hasta el 90 % de la señal máxima o mínima. Los tiempos de recuperación encontrados para las membranas de PS con aditivo (DABCO) son: $t(N_2 \rightarrow O_2)$ 18 s y $t(O_2 \rightarrow N_2)$ 49 s.

5. Comparación de membranas

La sensibilidad de las diferentes membranas depende mucho de las propiedades de las matrices poliméricas que empleamos, pues los luminóforos interactúan con ellas. Lo preferible es un polímero que tenga gran permeabilidad a O_2 y que sea estable a la radiación, como ya se ha indicado anteriormente. Quien origina mejores resultados (Tabla 5.13) son las membranas de PS con aditivo estabilizador, pues el cociente $I_0/I_{100} = 8,36$ es el mayor, al igual que la constante K_{SV} ($0,15 \%^{-1}$); por otra parte, los tiempos de respuesta también son los mejores. En conclusión, las membranas de poliestireno con un 25% en peso de aditivo 1,4-diazabicyclo [2,2,2] octano presentan mayores sensibilidades que las que no contienen estabilizante y son más estables frente a la fotodegradación, por lo que pueden ser usadas para medir oxígeno con el oxímetro digital aquí desarrollado con una precisión (DER) no superior al 10%, al menos durante dos meses.

Tabla 5.13. Datos comparativos para las diferentes membranas estudiadas con el prototipo P02.

Matriz	I_0/I_{100}	$K_{SV}, \%^{-1}$	$t(N_2 \rightarrow O_2), s$	$t(O_2 \rightarrow N_2), s$
PS	3,40	0,1772	25	60
PVC	1,55	0,0088	31	63
Silicona	--	--	--	--
PS (DABCO)	8,36	0,2693	18	49
Poli (IBM-TFEM)	1,64	0,110	20	90

En la siguiente representación de Stern-Volmer (Figura 5.23) vemos la diferente sensibilidad de las distintas membranas de PVC, PS y PS con atenuador, ordenadas de menor a mayor pendiente.

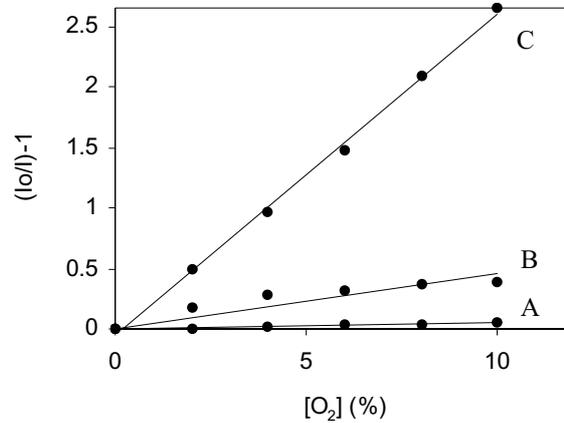


Figura 5.23 Comparación de pendientes para A) PVC, B) PS, y C) PS con DABCO.

6. Influencia de la temperatura

Es un hecho probado que la temperatura afecta a la intensidad de fluorescencia y al tiempo de vida del estado excitado. Tanto la frecuencia de colisiones entre el oxígeno y el luminóforo como el coeficiente de difusión del oxígeno están influenciados por la temperatura; cuanto mayor sea el número de colisiones mayor será este tipo de desactivación no radiativa y, por tanto, menor será la luminiscencia emitida por el luminóforo¹⁵. En consecuencia, la variación de temperatura provoca un cambio en la pendiente de la función de calibrado. Lo ideal sería mantener el sensor a una temperatura constante de manera que la respuesta no se viera influenciada, pero esto es difícil de conseguir en una instrumentación portátil como la aquí se trata de desarrollar. Por ello, estudiaremos cual es la dependencia de la señal con la temperatura.

¹⁵ W. Trettnak y O.S. Wolfbeis, Fluorescence Spectroscopy, New Methods and Applications. Ed Springer-Verlag, Berlin, p. 79 (1993).

Tabla 5.12. Señal obtenida para varias $[O_2]$ y diferentes temperaturas en P02

O_2 (%)	Temperatura			
	22°C	31°C	44°C	54°C
0	128772	116677	103126	95484
4	84775	74042	65393	57413
8	60775	53686	46182	38981
12	45984	39850	34375	28519
16	36106	31667	26515	21719
20	28801	25317	20998	17242
24	23444	20670	17178	13789

Este estudio de la influencia de la temperatura sobre el sensor de oxígeno se ha llevado a cabo con las membranas sensoras preparadas y en el prototipo P02 (que permite medir la temperatura). El rango de temperaturas estudiado está comprendido entre 22°C y 54°C obteniéndose los siguientes resultados (Tabla 5.12, Figura 5.21).

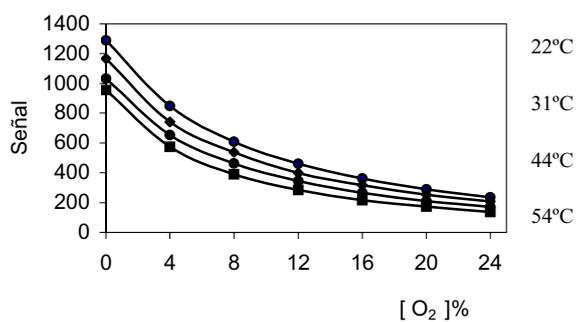


Figura 5.21. Dependencia de la señal con la temperatura.

Para todas las concentraciones de oxígeno estudiadas el tiempo de vida es linealmente dependiente con la temperatura como muestra la Figura 5.22 en la que representamos la señal obtenida en función de la temperatura para concentraciones de O₂ de 0%, 4%, 8%, 12%, 16%, 20 % y 24%, junto con las funciones de dependencia.

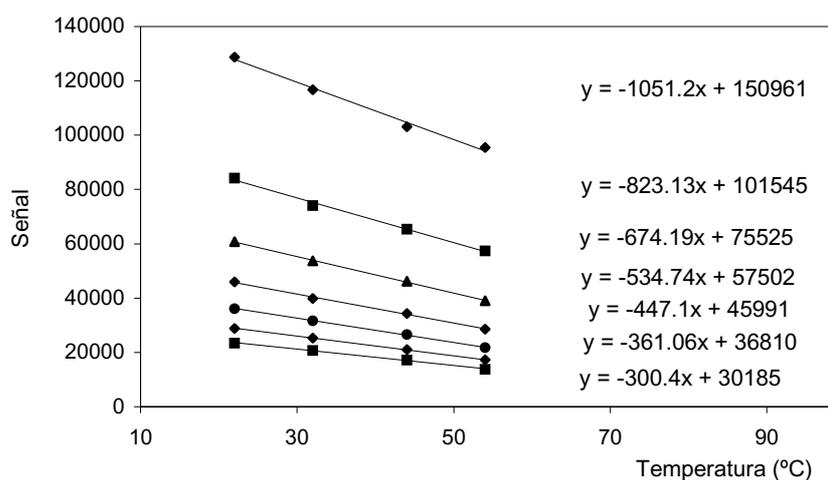


Figura 5.22. Dependencia lineal de la señal con la temperatura

Esta dependencia encontrada en la luminiscencia de la PtOEP con la temperatura concuerda con los resultados obtenidos por Papkovsky¹⁶ al estudiar la influencia de la temperatura sobre el complejo PtOEK en membranas de poliestireno.

¹⁶ D.B. Papkovsky, N. Papkovskaia, A. Smyth, J. Kerry y V.I. Ogurtsov., Anal. Letters, 33, 1755 (2000).

7. Interferentes

Para estudiar la interferencia producida por otros gases presentes junto con oxígeno sobre la respuesta del oxímetro, se seleccionaron una serie de gases, como son: CH₄, CO₂, SO₂, N₂O y H₂S. Entre estos gases tenemos combustibles como el metano, corrosivos como el dióxido de azufre y el ácido sulfhídrico, anestésicos como el protóxido de nitrógeno e inoocuos como el dióxido de carbono. Con estos tenemos una representación de diferentes gases potencialmente interferentes. Del SO₂ se conoce que es un considerable interferente ya que produce atenuación de fosforescencia¹⁷.

7.1. Interferencia del metano (CH₄)

El metano puede estar en la atmósfera en concentraciones del orden de un 0,0002%. El estudio de la interferencia de la señal debida a CH₄ se hizo en dos formas, en la primera se trabajó en ausencia de oxígeno y en la segunda se mantuvo una concentración de oxígeno constante del 20% durante toda el experimento midiendo con el prototipo P02. Este segundo caso puede ser más real debido a la concentración de oxígeno que suele haber en la atmósfera se encuentra en torno al 20,9 %.

7.1.1. Interferencia de metano en ausencia de oxígeno.

Se realizaron seis réplicas de este estudio para las diferentes concentraciones de metano estudiadas. En la Tabla 5.13 se muestran los resultados obtenidos junto con el error que origina la presencia de metano sobre la concentración de oxígeno medida. En la Figura 5.23 se observa que la interferencia de metano es muy pequeña incluso a altas concentraciones de este gas.

¹⁷ J.R.Bacon y J.N.Demas, Anal. Chem., 59, 2780 (1987).

Tabla 5.13. Interferencia de metano en ausencia de oxígeno.

CH ₄ (%)	Réplica						media	Interferencia (%)
	1	2	3	4	5	6		
0,0	36.992	36.749	37.358	37.345	36.963	36.996	37.066	--
1,7	36.834	35.799	36.843	38.114	37.953	38.328	37.290	0,35
2,0	38.184	37.796	37.887	37.736	-	-	37.900	1,06
5,0	37.808	37.534	37.315	38.118	37.699	37.936	37.733	0,87
10,0	37.444	37.812	37.640	37.492	37.061	38.129	37.593	0,70
20,0	37.920	37.672	37.585	37.422	37.015	38.123	37.619	0,73
30,0	37.732	38.109	37.975	38.145	38.205	37.786	37.991	1,17
50,0	37.523	38.186	38.089	38.774	37.940	37.876	38.061	1,25
80,0	38.584	39.176	38.459	41.376	38.195	38.483	39.017	2,37
100,0	39.844	40.087	39.372	39.019	38.212	38.508	39.162	2,54

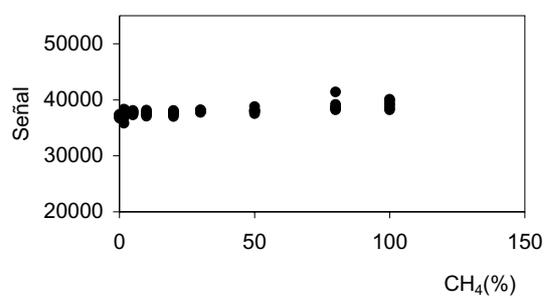


Figura 5.23. Interferencia de metano en ausencia de oxígeno.

7.1.2. Interferencia de metano en presencia de oxígeno.

En presencia de un 20% de oxígeno (Tabla 5.14) la interferencia es algo más acusada, aunque también baja (Figura 5.24).

Tabla 5.14. Interferencia de metano en presencia de oxígeno.

CH ₄ (%)	Réplica							Interf. (%)
	1	2	3	4	5	6	media	
0,0	19.884	20.030	19.921	20.042	19.895	19.865	19.939	--
1,7	19.479	19.344	19.375	19.235	19.191	18.865	19.246	0,75
2,0	18.916	18.924	18.911	18.914	18.968	19.010	18.940	1,11
5,0	18.842	18.882	18.662	18.680	18.762	19.116	18.823	1,25
10,0	19.109	18.946	18.968	18.951	18.902	18.723	18.932	1,12
20,0	18.708	18.489	18.564	18.532	18.594	18.609	18.582	1,53
30,0	18.533	18.517	18.561	18.538	18.587	18.523	18.543	1,58
50,0	18.558	18.071	18.117	18.054	18.043	18.005	18.139	2,05
80,0	17.975	17.076	17.162	17.227	17.396	17.508	17.386	2,93

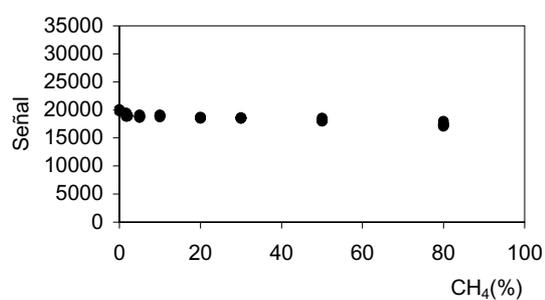


Figura 5.24. Interferencia de metano en presencia de oxígeno.

Comprobamos que el metano no es un interferente para el sensor de oxígeno desarrollado ya que en caso de que hubiese un 50% de metano en el medio, la señal variaría

sólo en torno a un 3%, en ausencia de oxígeno, y un 9% en presencia de un 20% de oxígeno. Hay que tener en cuenta que la cantidad de CH₄ que suele haber en la atmósfera está alrededor de 0,0002% en volumen.

7.2. Interferencia de protóxido de nitrógeno (N₂O).

El protóxido de nitrógeno está presente en la atmósfera en un 0,00005%. Al igual que en el caso anterior se estudia la interferencia que origina primero en ausencia de oxígeno y, a continuación, manteniendo constante una concentración de oxígeno del 20%. Como antes se midió con el prototipo P02.

7.2.1. Interferencia de N₂O en ausencia de oxígeno.

En ausencia de oxígeno se encuentran los resultados mostrados en la Tabla 5.15 y Figura 5.25, destacando la ausencia de interferencia.

Tabla 5.15. Interferencia de N₂O en ausencia de oxígeno.

N ₂ O (%)	Réplica						media	Interf. (%)
	1	2	3	4	5	6		
0,0	72.703	70.152	70.235	72.779	72.917	73.129	71.963	--
1,7	69.419	70.242	69.100	70.498	70.190	68.796	69.702	1,30
2,0	71.467	73.030	74.455	74.457	73.551	72.386	73.208	0,22
5,0	77.092	75.528	75.529	73.481	73.891	73.102	74.744	0,89
10,0	75.149	74.677	72.142	76.269	72.394	72.750	73.864	0,50
20,0	73.399	69.236	74.326	74.237	73.249	71.715	72.650	0,02
30,0	70.732	72.606	71.783	72.256	70.243	69.470	71.164	0,67
50,0	68.502	68.087	70.330	69.123	69.665	70.642	69.379	1,44
80,0	63.146	62.495	61.076	61.864	60.023	61.742	61.708	4,77
100,0	74.748	74.341	76.590	74.858	74.544	77.118	75.351	1,15

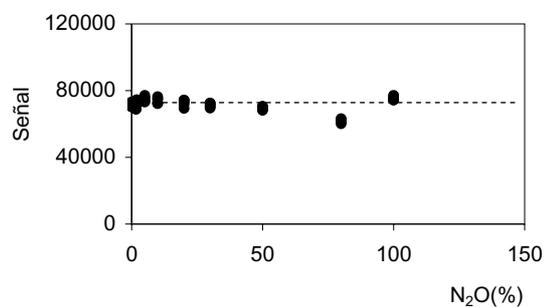


Figura 5.25. Interferencia de N_2O en ausencia de oxígeno.

7.2.2. Interferencia de N_2O en presencia de oxígeno.

En presencia de un 20% de oxígeno se observa al igual que antes que no hay interferencia (Tabla 5.16 y Figura 5.26).

Tabla 5.16. Interferencia de N_2O en presencia de oxígeno.

N_2O (%)	Réplica						media	Interf. (%)
	1	2	3	4	5	6		
0,0	26.569	26.512	26.530	26.487	26.440	26.510	26.508	--
1,7	26.168	26.401	26.370	26.352	26.357	26.384	26.338	0,11
2,0	26.336	26.339	26.355	26.387	26.304	26.247	26.328	0,11
5,0	26.153	26.169	26.154	26.225	26.252	26.381	26.222	0,16
10,0	26.086	26.053	26.082	26.133	26.132	26.108	26.099	0,21
20,0	25.762	25.855	25.605	25.618	25.622	25.613	25.679	0,39
30,0	25.066	25.127	25.134	25.123	25.100	25.317	25.144	0,62
50,0	24.370	24.259	24.573	24.333	24.311	24.858	24.449	0,93
80,0	23.092	22.923	22.914	22.701	22.690	22.718	22.839	1,62

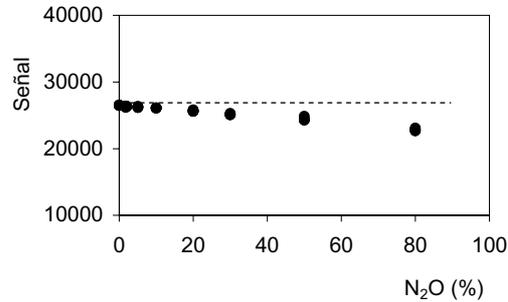


Figura 5.26. Interferencia de N₂O en presencia de oxígeno.

El N₂O no muestra interferencia para este sistema ya que concentraciones de N₂O del 100% originan interferencias menores al 2%, tanto en presencia como en ausencia de oxígeno.

7.3. Interferencia de dióxido de carbono.

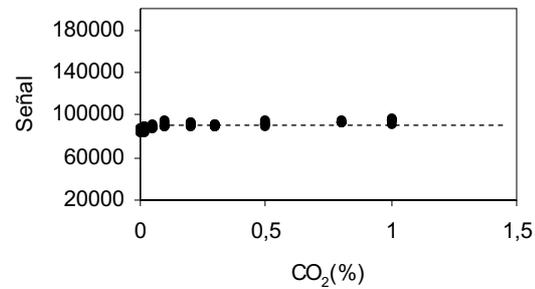
Este gas está presente en la atmósfera en un 0,03%. Este estudio se realizó solo hasta un 1% del gas, pues se observó una pequeña interferencia a esas concentraciones. Como antes, se hace el estudio tanto en ausencia de oxígeno como en presencia de una concentración de oxígeno constante del 20%.

7.3.1. Interferencia de CO₂ en ausencia de oxígeno.

En ausencia de oxígeno se encuentran los resultados mostrados en la Tabla 5.17 y Figura 5.27.

Tabla 5.17. Interferencia de CO₂ en presencia de oxígeno.

CO ₂ (%)	Réplica						media	Interf. (%)
	1	2	3	4	5	6		
0,000	83.653	85.251	85.718	83.751	86.819	86.840	85.319	--
0,017	84.510	85.897	86.178	85.277	85.211	87.162	85.698	0,13
0,020	85.789	84.396	88.853	87.863	89.282	88.489	87.409	0,69
0,050	88.687	87.185	87.743	90.266	91.358	88.300	88.900	1,19
0,100	88.844	88.476	95.487	89.937	92.702	90.411	90.912	1,85
0,200	90.869	89.798	89.635	92.631	92.007	92.647	91.247	1,96
0,300	89.288	90.004	88.876	91.969	90.479	90.010	90.094	1,58
0,500	90.436	89.954	91.367	90.996	93.048	95.878	91.904	2,18
0,800	92.556	92.942	94.614	93.121	92.736	92.942	93.147	2,59
1,000	97.687	94.946	94.329	90.718	95.320	94.960	94.615	3,08

Figura 5.27. Interferencia de CO₂ en ausencia de oxígeno

7.3.2. Interferencia de CO₂ en presencia de oxígeno.

En el caso de mantener una concentración de oxígeno constante igual al 20% se encuentran los resultados que se recogen en la Tabla 5.18 y en Figura 5.28.

Tabla 5.18. Interferencia de CO₂ en presencia de oxígeno.

CO ₂ (%)	Réplica						media	Interf. (%)
	1	2	3	4	5	6		
0,000	24.967	24.960	24.990	24.923	24.938	24.919	24.949	--
0,017	24.785	24.856	24.896	24.881	24.901	24.884	24.867	0,03
0,020	24.861	24.788	24.798	24.738	24.701	24.675	24.760	0,07
0,050	24.646	24.600	24.634	24.612	24.666	24.636	24.632	0,11
0,100	24.698	24.563	24.611	24.620	24.621	24.361	24.579	0,13
0,200	24.579	24.590	24.571	24.555	24.543	24.458	24.549	0,14
0,300	24.456	24.439	24.472	24.432	24.507	24.512	24.470	0,16
0,500	24.140	24.288	24.306	24.356	24.323	24.371	24.297	0,22
0,800	23.172	24.289	24.322	24.357	24.247	24.381	24.120	0,28
1,000	24.492	24.433	24.434	24.343	24.337	24.490	24.421	0,18

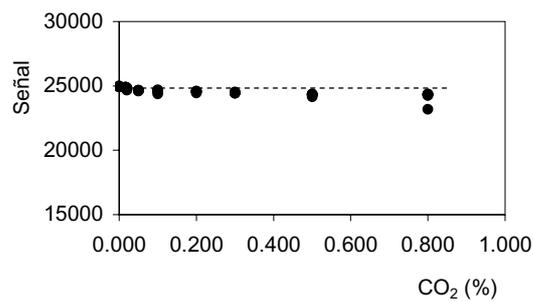


Figura 5.28. Interferencia de CO₂ en presencia de oxígeno.

Observamos que la interferencia cuando tenemos un 1% de dióxido de carbono presente se encuentra alrededor del 2% de la señal. Teniendo en cuenta que en la atmósfera este gas está presente sólo en un 0,03%, la interferencia real no superará el 0,1% de la medida de oxígeno.

7.4. Interferencia de dióxido de azufre (SO₂)

Al igual que en los casos anteriores se estudia la interferencia que origina primero en ausencia de oxígeno y, a continuación, manteniendo constante una concentración de oxígeno del 20%. Como antes se midió con el prototipo P02.

7.4.1. Interferencia de dióxido de azufre en ausencia de oxígeno.

En ausencia de oxígeno se encuentran los resultados mostrados en la Tabla 5.19 y Figura 5.29 destacando la gran interferencia que se produce con la presencia de este gas debido a la atenuación de fosforescencia que provoca sobre el compuesto luminiscente.

Tabla 5.19. Interferencia de dióxido de azufre en ausencia de oxígeno.

SO ₂ (%)	Réplica						media	Interf. (%)
	1	2	3	4	5	6		
0,0	60.917	60.806	59.728	59.556	60.622	60.097	60.288	--
1,7	58.033	57.426	60.046	59.660	56.660	58.492	58.386	1,6
2,0	58.437	55.971	58.992	57.661	57.650	59.571	58.047	1,9
5,0	57.818	56.601	57.801	55.431	57.592	56.914	57.026	2,7
10,0	41.170	41.391	41.399	39.472	38.253	38.364	40.008	16,9

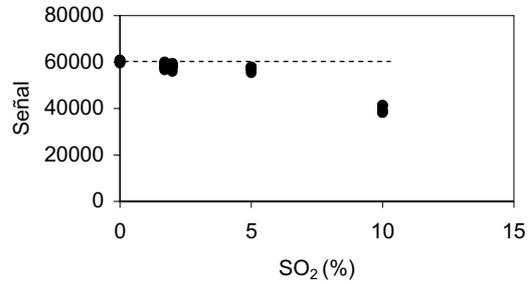


Figura 5.29. Interferencia de SO₂ en ausencia de oxígeno.

7.4.2. Interferencia de SO₂ en presencia de oxígeno.

En el caso de mantener una concentración de oxígeno constante e igual al 20% se encuentran los resultados que se recogen en la Tabla 5.30 y representan en la Figura 5.20 donde podemos observar que existe una gran interferencia en presencia de este gas.

Tabla 5.30. Interferencia de protóxido de SO₂ en presencia de oxígeno.

SO ₂ (%)	Réplica						media	Interf. %
	1	2	3	4	5	6		
0,0	36.167	36.234	36.239	36.346	36.367	36.305	36.276	
1,7	34.538	34.032	33.591	33.310	33.501	33.005	33.656	2,2
2,0	32.587	32.104	31.686	31.412	31.230	31.311	31.714	3,8
5,0	29.095	27.607	26.789	26.302	25.009	26.101	26.757	7,9

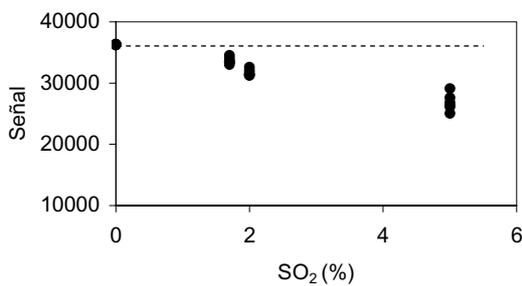


Figura 5.20. Interferencia de SO₂ en presencia de oxígeno.

El SO_2 vemos que sí muestra interferencia para estos sistemas estando en torno al 20% cuando la concentración de SO_2 es del 10% en ausencia de oxígeno. Es esta una gran interferencia que tiene sentido debido a que el dióxido de azufre es un gas atenuador de luminiscencia, como se ha indicado en bibliografía, en la que se ha utilizado este hecho para la determinación de SO_2 ^{18,19}.

7.5. Interferencia de sulfuro de hidrógeno (H_2S)

7.5.1. Interferencia del H_2S en ausencia de oxígeno

En ausencia de oxígeno se encuentran los resultados mostrados en la Tabla 5.31 y Figura 5.21, destacando la escasa interferencia que muestra.

Tabla 5.31. Interferencia de H_2S en ausencia de oxígeno.

H_2S (%)	Réplica						media	Interf. (%)
	1	2	3	4	5	6		
0,0	72.812	76.532	73.848	72.391	72.913	72.178	73.446	
1,7	73.199	72.317	73.835	73.418	72.567	72.340	72.946	0,5
2,0	73.300	73.420	73.845	73.510	73.335	73.798	73.535	0,1
5,0	74.314	75.652	75.431	74.755	74.693	74.476	74.887	0,8

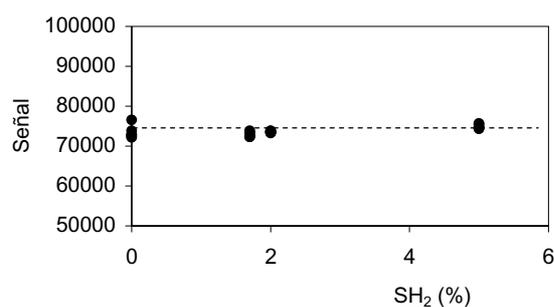


Figura 5.21. Interferencia del H_2S en ausencia de

¹⁸ D.B. Papkovsky, M.A. Uskova, G.V. Ponomarev, T. Korpela, S. Kulmala y G.G. Guilbault, Anal. Chim. Acta 374, 1 (1998).

7.5.2. Interferencia del H₂S en presencia de oxígeno.

En el caso de mantener una concentración de oxígeno constante igual al 20% se encuentran los resultados que se recogen en la Tabla 5.32 y en Figura 5.22.

Tabla 5.32. Interferencia del sulfhídrico en presencia de oxígeno.

H ₂ S (%)	Réplica						media	Interf. %
	1	2	3	4	5	6		
0,0	37.458	37.462	37.381	37.418	37.371	37.574	37.444	
1,7	37.906	37.885	38.475	38.326	38.452	38.492	38.254	0,4
2,0	39.125	39.317	39.438	39.305	39.513	39.726	39.403	1,0
5,0	40.120	40.322	40.280	40.458	40.753	40.636	40.427	1,6

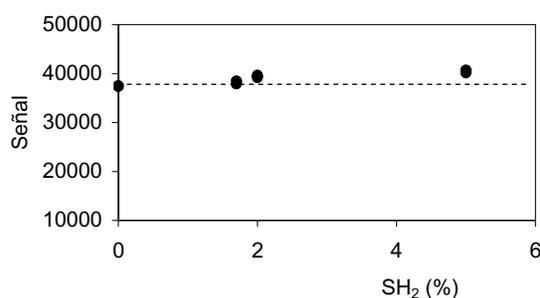


Figura 5.22. Interferencia de H₂S en presencia de oxígeno.

En conclusión, se han estudiado una serie de gases como posibles interferentes: CH₄, CO₂, SO₂, N₂O y H₂S, habiéndose comprobado que el único gas que es un notable interferente es el dióxido de azufre, debido a que también actúa como atenuador de fosforescencia, por lo que su efecto es reversible. La Tabla 6.26 muestra el porcentaje de gas que originaría una interferencia superior o igual al 3% en la medida de la concentración para una mezcla del 21% de oxígeno.

¹⁹ T.M.A. Razek, M.J. Miller, S.S.M. Asan y M.A. Arnold, Talanta 50, 491 (1999).

Tabla 6.26. Porcentaje de gas que provoca una interferencia $\leq 2\%$ en señal trabajando a 20% de O_2 .

Compuesto	Concentración (%)
Metano	43,1
Protóxido de nitrógeno	80,0*
Dióxido de carbono	1,0*
Dióxido de azufre	3,2
Sulfuro de hidrógeno	5,0*

* Concentración máxima ensayada

8. Conclusiones

En conclusión a los estudios realizados en este capítulo podemos decir que se ha logrado la fabricación de membranas capaces de ser utilizadas para la determinación de oxígeno con los prototipos diseñados, en este caso en el P02, en un rango que se extiende hasta el 30% de O_2 . Con las membranas de poliestireno y aditivo atenuador de oxígeno singlete hemos conseguido aumentar la sensibilidad y disminuir notablemente la fotodescomposición de del sistema, pues la señal es razonablemente estable en el tiempo. La deriva de la señal que se obtiene es de un 0,25% al día midiendo con estas membranas de PS y aditivo DABCO durante 60 días en condiciones del 20% de oxígeno, mientras que para las membranas de poliestireno sin DABCO era del 0,7% al día.

Se ha hecho un estudio del efecto de la temperatura sobre la luminiscencia en este sistema comprobando la necesidad de hacer medidas o bien a una determinada temperatura controlada o mediante la programación del microcontrolador con un calibrado dependiente de la temperatura. El prototipo P02 no está programado con una función de calibrado que corrija ese efecto que tiene la temperatura sobre la señal luminiscente.

Se han estudiado diferentes gases que pueden actuar como interferentes comprobando que solamente el SO_2 es un notable interferente debido a que es también un atenuador de luminiscencia.

Llegados a este punto se diseñó un tercer prototipo denominado P03 que era de similares características al P02 pero que se construyó en una placa de circuito impreso que reducía las dimensiones de este prototipo portátil, como ya se comentó en el Capítulo 3 de esta Memoria de Doctorado.

CAPÍTULO 6
MEJORA DE LA ZONA SENSORA.
CARACTERIZACIÓN DEL
PROTOTIPO P04

1. Introducción

Una vez desarrollada una membrana sensora estable para la medida de oxígeno y que disponemos de un instrumento portátil de pequeñas dimensiones capaz de medir esa membrana, con unos resultados comparables a los conseguidos con la instrumentación convencional, se trató de mejorar sistema de medida, robusteciendo la zona sensora, mejorando el diseño e introduciendo nuevas funciones en el prototipo.

La forma de medida con los prototipos anteriores requiere la introducción y fijación de la membrana en un soporte, en el cual siempre puede haber pequeñas vibraciones y pequeñas variaciones de posición de la membrana, lo que influirá en la reproducibilidad de las medidas.

Se planteó la posibilidad de reducir toda la zona de membrana que obligaba a este diseño poco compacto y con dificultades de alineación de los componentes optoelectrónicos y la membrana sensora. Para ello, se pensó en la deposición del material de membrana sobre el propio fotodetector, pues eso llevaría aparejadas una serie de ventajas como son: diseño más compacto y más robusto al desaparecer la membrana y su soporte, mayor eficiencia en la recogida de emisión fosforescente, mayor eficacia en la alineación de componentes optoelectrónicos, reducción del costo de la zona sensora, al necesitarse menor volumen de

cóctel para recubrir el fotodetector que para preparar la membrana y, por último, una mayor facilidad para sustituir el sensor agotado.

En este capítulo se estudia la respuesta de estos fotodetectores recubiertos con la sustancia sensora y se caracteriza el nuevo prototipo desarrollado, P04. Hemos realizado también una calibración del sistema con diferentes concentraciones de oxígeno y a diferentes temperaturas. Concluimos con la calibración con un solo punto y las características técnicas del prototipo desarrollado.

2. Preparación de fotodetectores recubiertos

Para lograr el recubrimiento homogéneo de la zona sensora del fotodetector se ensayaron diversos procedimientos como la inmersión de este en el cóctel de reactivos o la deposición directa del material sobre el fotodetector. Ésta última estrategia es la que proporcionó mejores resultados y es la que se muestra a continuación.

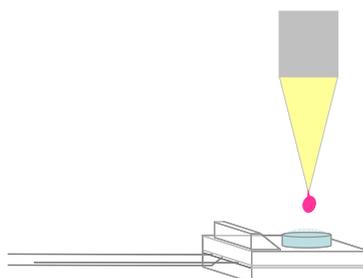


Figura 6.1. Deposición del material en el fotodetector.

Lo que se hizo fue depositar sobre el fotodiodo un pequeño volumen de cóctel del tipo anteriormente usado para la preparación de las membranas. La deposición se hizo como indica la Figura 6.1. Experiencias previas en el prototipo P02 realizadas mostraron que el empleo de fotodetectores recubiertos da buen resultado y simplifica el diseño instrumental.

Para estudiar la influencia de la cantidad depositada sobre el fotodetector, se prepararon fotodiodos recubiertos con diferentes cantidades de disolución; en concreto se depositaron 5, 10 y 15 μL de cóctel. Se ensayaron diferentes formas de llevar a cabo la

deposición de la membrana sensora sobre el fotodetector, encontrando que el procedimiento que mejor resultado proporciona es el que se indica a continuación. Se depositaron cantidades de 5 μL de un cóctel de poliestireno con aditivo estabilizante, sobre la superficie sensora del detector con ayuda de una micropipeta. El cóctel utilizado es el mismo que hemos usado para la preparación de membranas de poliestireno con un 25% de DABCO y la cantidad establecida de complejo PtOEP. Después de añadir los primeros 5 μL dejamos secar y volvemos a poner otros 5 μL hasta obtener la cantidad final deseada. Para finalizar, dejamos secar los fotodiodos en un recinto cerrado bajo atmósfera de THF de manera que el secado sea lento y homogéneo.

Para realizar este estudio se prepararon tres tipos de fotodetectores conteniendo cada uno, como anteriormente se indica, 5, 10 y 15 μL , respectivamente, y se prepararon tres réplicas de cada uno. Estos fotodetectores se denominaron de la forma siguiente: F1, F2 y F3 a los tres fotodetectores preparados con 5 μL ; F4, F5 y F6 a los tres preparados con 10 μL y F7, F8 y F9 a los que tienen 15 μL de cóctel depositado.

3. Caracterización de los fotodetectores

La realización de la caracterización de estos fotodiodos se hizo para cada uno de ellos situándolos en su zócalo adecuado dentro de la zona sensora del prototipo. El diseño y esquema de esta zona sensora se indicó en el capítulo 3.

3.1. Respuesta a oxígeno

En primer lugar se estudió la respuesta a oxígeno que muestra el prototipo P04 con los fotodetectores recubiertos. En las Tablas 6.1 a 6.9 mostramos los valores obtenidos, así como el término $(I_0/I) - 1$ para cada uno de los 9 fotodiodos preparados. El experimento se realizó haciendo tres series de medidas. En cada serie se registró la señal obtenida para las distintas concentraciones de oxígeno ensayadas.

Tabla 6.1. Respuesta a oxígeno fotodiodo F1 (5 μ l de cóctel).

Fotodiodo F1						
O₂ (%)	Réplica 1		Réplica 2		Réplica 3	
	Señal	(I₀/I)-1	Señal	(I₀/I) -1	Señal	(I₀/I) -1
0	215.070	0,00	190.383	0,00	173.210	0,00
2	128.775	0,67	120.699	0,58	114.505	0,51
4	98.197	1,19	93.993	1,03	89.832	0,93
6	76.809	1,80	72.972	1,61	70.284	1,46
8	62.693	2,43	59.685	2,19	58.966	1,94
10	51.884	3,15	50.360	2,78	50.026	2,46
12	43.972	3,89	42.990	3,43	42.670	3,06
14	37.753	4,70	37.328	4,10	37.099	3,67
16	32.861	5,54	32.688	4,82	32.434	4,34
18	28.833	6,46	28.754	5,62	28.627	5,05
20	25.484	7,44	25.574	6,44	25.673	5,75
22	22.706	8,47	22.842	7,33	22.283	6,77
24	20.324	9,58	20.462	8,30	20.156	7,59

Tabla 6.2. Respuesta a oxígeno fotodiodo F2 (5 μ l de cóctel).

Fotodiodo F2						
O₂	Réplica 1		Réplica 2		Réplica 3	
(%)	Señal	(I₀/I)-1	Señal	(I₀/I) -1	Señal	(I₀/I) -1
0	196.254	0,00	177.542	0,00	202.738	0,00
2	122.772	0,60	116.547	0,52	125.019	0,62
4	94.403	1,08	90.446	0,96	95.192	1,13
6	73.929	1,65	72.049	1,46	74.387	1,73
8	59.673	2,29	58.979	2,01	60.460	2,35
10	49.704	2,95	49.295	2,60	50.247	3,03
12	42.065	3,67	41.764	3,25	42.266	3,80
14	36.084	4,44	36.064	3,92	36.262	4,59
16	31.341	5,26	31.498	4,64	31.303	5,48
18	28.062	5,99	27.614	5,43	27.359	6,41
20	24.265	7,09	24.429	6,27	24.047	7,43
22	21.398	8,17	21.665	7,19	21.320	8,51
24	19.104	9,27	19.285	8,21	18.999	9,67

Tabla 6.3. Respuesta a oxígeno fotodiodo F3 (5 μ l de cóctel).

Fotodiodo F3						
O₂	Réplica 1		Réplica 2		Réplica 3	
(%)	Señal	(I₀/I)-1	Señal	(I₀/I) -1	Señal	(I₀/I) -1
0	211.875	0	216.409	0,00	214.062	0,00
2	132.668	0,6	133.932	0,62	133.323	0,61
4	101.999	1,08	102.913	1,10	102.660	1,09
6	80.596	1,63	81.211	1,66	81.130	1,64
8	65.792	2,22	66.551	2,25	66.297	2,23
10	55.028	2,85	55.025	2,93	55.495	2,86
12	46.789	3,53	47.326	3,57	47.778	3,48
14	40.310	4,26	40.760	4,31	41.605	4,15
16	35.091	5,04	35.374	5,12	36.572	4,85
18	30.910	5,85	31.275	5,92	32.243	5,64
20	27.362	6,74	27.731	6,80	28.040	6,63
22	24.458	7,66	24.968	7,67	25.307	7,46
24	22.000	8,63	22.467	8,63	23.104	8,27

Tabla 6.4. Respuesta a oxígeno fotodiodo F4 (10 μ l de cóctel).

Fotodiodo F4						
O₂	Réplica 1		Réplica 2		Réplica 3	
(%)	Señal	(I₀/I)-1	Señal	(I₀/I) -1	Señal	(I₀/I) -1
0	236.986	0,00	236.155	0,00	238.435	0,00
2	142.380	0,66	145.156	0,63	146.153	0,63
4	108.362	1,19	110.723	1,13	112.033	1,13
6	85.108	1,78	87.678	1,69	88.724	1,69
8	69.502	2,41	72.003	2,28	72.840	2,27
10	58.038	3,08	60.382	2,91	61.089	2,90
12	49.455	3,79	51.646	3,57	52.228	3,57
14	42.741	4,54	44.730	4,28	45.203	4,27
16	37.292	5,35	39.293	5,01	39.557	5,03
18	32.951	6,19	34.762	5,79	34.958	5,82
20	29.275	7,10	30.856	6,65	31.151	6,65
22	26.238	8,03	27.732	7,52	28.151	7,47
24	23.592	9,05	25.036	8,43	25.405	8,39

Tabla 6.5. Respuesta a oxígeno fotodiodo F5 (10 μ l de cóctel).

Fotodiodo F5						
O₂	Réplica 1		Réplica 2		Réplica 3	
(%)	Señal	(I₀/I)-1	Señal	(I₀/I) -1	Señal	(I₀/I) -1
0	232.904	0,00	233.098	0,00	232.973	0,00
2	141.877	0,64	141.783	0,64	141.446	0,65
4	108.516	1,15	108.108	1,16	107.686	1,16
6	85.512	1,72	85.638	1,72	84.978	1,74
8	70.143	2,32	69.989	2,33	69.261	2,36
10	58.468	2,98	58.493	2,99	57.999	3,02
12	49.925	3,67	49.725	3,69	49.308	3,72
14	43.053	4,41	43.017	4,42	42.523	4,48
16	37.682	5,18	37.506	5,21	37.154	5,27
18	33.150	6,03	33.038	6,06	32.572	6,15
20	29.376	6,93	29.333	6,95	28.944	7,05
22	26319	7,85	26.085	7,94	25.829	8,02
24	23.605	8,87	23.434	8,95	23.238	9,03

Tabla 6.6. Respuesta a oxígeno fotodiodo F6 (10 μ l de cóctel).

Fotodiodo F6						
O₂	Réplica 1		Réplica 2		Réplica 3	
(%)	Señal	(I₀/I)-1	Señal	(I₀/I) -1	Señal	(I₀/I) -1
0	226.916	0,00	231.893	0,00	233.436	0,00
2	138.163	0,64	138.163	0,68	140.583	0,66
4	105.469	1,15	106.543	1,18	106.535	1,19
6	82.961	1,74	83.782	1,77	83.715	1,79
8	67.857	2,34	68.139	2,40	68.418	2,41
10	56.682	3,00	57.001	3,07	57.139	3,09
12	48.400	3,69	48.619	3,77	48.699	3,79
14	41.687	4,44	41.926	4,53	41.849	4,58
16	36.414	5,23	36.576	5,34	36.544	5,39
18	32.046	6,08	32.123	6,22	32.245	6,24
20	28.525	6,95	28.480	7,14	28.944	7,07
22	25.485	7,90	25.495	8,10	25.829	8,04
24	22.945	8,89	22.935	9,11	23.238	9,05

Tabla 6.7. Respuesta a oxígeno fotodiodo F7 (15 µl de cóctel).

Fotodiodo F7						
O₂	Réplica 1		Réplica 2		Réplica 3	
(%)	Señal	(I₀/I)-1	Señal	(I₀/I) -1	Señal	(I₀/I) -1
0	243.296	0,00	252.000	0,00	252.000	0,00
2	161.343	0,51	162.963	0,55	166.794	0,51
4	127.945	0,90	128.645	0,96	130.528	0,93
6	103.538	1,35	104.320	1,42	105.584	1,39
8	87.002	1,80	86.862	1,90	88.437	1,85
10	74.769	2,25	73.999	2,41	75.722	2,33
12	64.637	2,76	64.323	2,92	65.850	2,83
14	56.543	3,30	56.885	3,43	57.620	3,37
16	49.833	3,88	50.731	3,97	50.895	3,95
18	44.411	4,48	45.640	4,52	45.231	4,57
20	40.180	5,06	40.969	5,15	40.497	5,22
22	36.624	5,64	37.946	5,64	36.686	5,87
24	33.417	6,28	34.010	6,41	33.572	6,51

Tabla 6.8. Respuesta a oxígeno fotodiodo F8 (15 μ l de cóctel).

Fotodiodo F8						
O₂	Réplica 1		Réplica 2		Réplica 3	
(%)	Señal	(I₀/I)-1	Señal	(I₀/I) -1	Señal	(I₀/I) -1
0	251.304	0,00	250.301	0,00	251.469	0,00
2	152.939	0,64	153.097	0,63	153.388	0,64
4	117.780	1,13	118.302	1,12	117.852	1,13
6	93.366	1,69	93.955	1,66	93.532	1,69
8	76.925	2,27	77.233	2,24	76.878	2,27
10	64.807	2,88	65.225	2,84	64.799	2,88
12	55.622	3,52	56.087	3,46	55.554	3,53
14	48.519	4,18	48.670	4,14	48.057	4,23
16	42.576	4,90	42.760	4,85	42.349	4,94
18	37.894	5,63	37.909	5,60	37.730	5,66
20	33.819	6,43	33.916	6,38	33.705	6,46
22	30.437	7,26	30.480	7,21	30.414	7,27
24	27.603	8,10	27.658	8,05	27.544	8,13

Tabla 6.9. Respuesta a oxígeno fotodiodo F9 (15 μ l de cóctel).

Fotodiodo F9						
O₂	Réplica 1		Réplica 2		Réplica 3	
(%)	Señal	(I₀/I)-1	Señal	(I₀/I) -1	Señal	(I₀/I) -1
0	252.000	0,00	252.000	0,00	252.000	0,00
2	161.101	0,56	167.048	0,51	165.513	0,52
4	124.697	1,02	129.829	0,94	128.794	0,96
6	99.461	1,53	104.578	1,41	103.441	1,44
8	82.308	2,06	86.599	1,91	86.020	1,93
10	69.890	2,61	73.615	2,42	73.275	2,44
12	60.354	3,18	63.642	2,96	63.368	2,98
14	52.775	3,77	55.892	3,51	55.424	3,55
16	46.519	4,42	49.373	4,10	49.028	4,14
18	41.508	5,07	44.001	4,73	43.718	4,76
20	37.226	5,77	39.661	5,35	39.330	5,41
22	33.770	6,46	35.691	6,06	35.530	6,09
24	30.645	7,22	32.765	6,69	32.439	6,77

A partir de los datos anteriores se realizó la representación de Stern-Volmer, observando en todos los casos una curvatura positiva similar a la que se estudió con las membranas sensoras en el anterior capítulo 5 de esta Memoria. En la Tabla 6.10 se recogen las ecuaciones de ajuste para: 1) la ecuación de Stern-Volmer, comprobando que es lineal hasta el 12% de concentración de O₂ (Figura 6.2); 2) la ecuación de Stern-Volmer cuadrática comprobando ese ajuste en todo el rango de concentración ensayado (Figura 6.3); y 3) la ecuación modificada de Stern-Volmer donde también observamos una relación lineal para todo el rango estudiado (Figura 6.4).

Tabla 6.10. Ecuaciones de ajuste para los distintos fotodiodos.

Fotodiodo	Stern-Volmer	Stern-Volmer cuadrática	Stern-Volmer modificada
F1	$y=0,285x+0,036$ $r^2 = 0,969$	$y=0,006x^2+0,213x+0,089$ $r^2 = 0,970$	$y=3,558x+0,995$ $r^2 = 0,974$
F2	$y=0,293x-0,061$ $r^2 = 0,983$	$y=0,006x^2+0,190x+0,077$ $r^2 = 0,986$	$y=3,465x+0,986$ $r^2 = 0,985$
F3	$y=0,281x-0,009$ $r^2 = 0,999$	$y=0,005x^2+0,227x+0,074$ $r^2 = 0,999$	$y=3,453x+0,995$ $r^2 = 0,994$
F4	$y=0,301x-0,026$ $r^2 = 0,996$	$y=0,005x^2+0,227x+0,074$ $r^2 = 0,997$	$y=3,198x+1,007$ $r^2 = 0,993$
F5	$y=0,303x-0,024$ $r^2 = 0,998$	$y=0,006x^2+0,234x+0,094$ $r^2 = 0,999$	$y=3,198x+0,006$ $r^2 = 0,993$
F6	$y=0,308x-0,021$ $r^2 = 0,998$	$y=0,005x^2+0,243x+0,086$ $r^2 = 0,999$	$y=3,112x+0,006$ $r^2 = 0,993$
F7	$y=0,233x+0,009$ $r^2 = 0,993$	$y=0,003x^2+0,202x+0,059$ $r^2 = 0,999$	$y=3,896x+0,024$ $r^2 = 0,993$
F8	$y=0,287x+0,001$ $r^2 = 0,999$	$y=0,004x^2+0,239x+0,079$ $r^2 = 0,999$	$y=3,193x+0,017$ $r^2 = 0,993$
F9	$y=0,250x-0,082$ $r^2 = 0,996$	$y=0,003x^2+0,212x+0,056$ $r^2 = 0,997$	$y=3,837x+0,008$ $r^2 = 0,994$

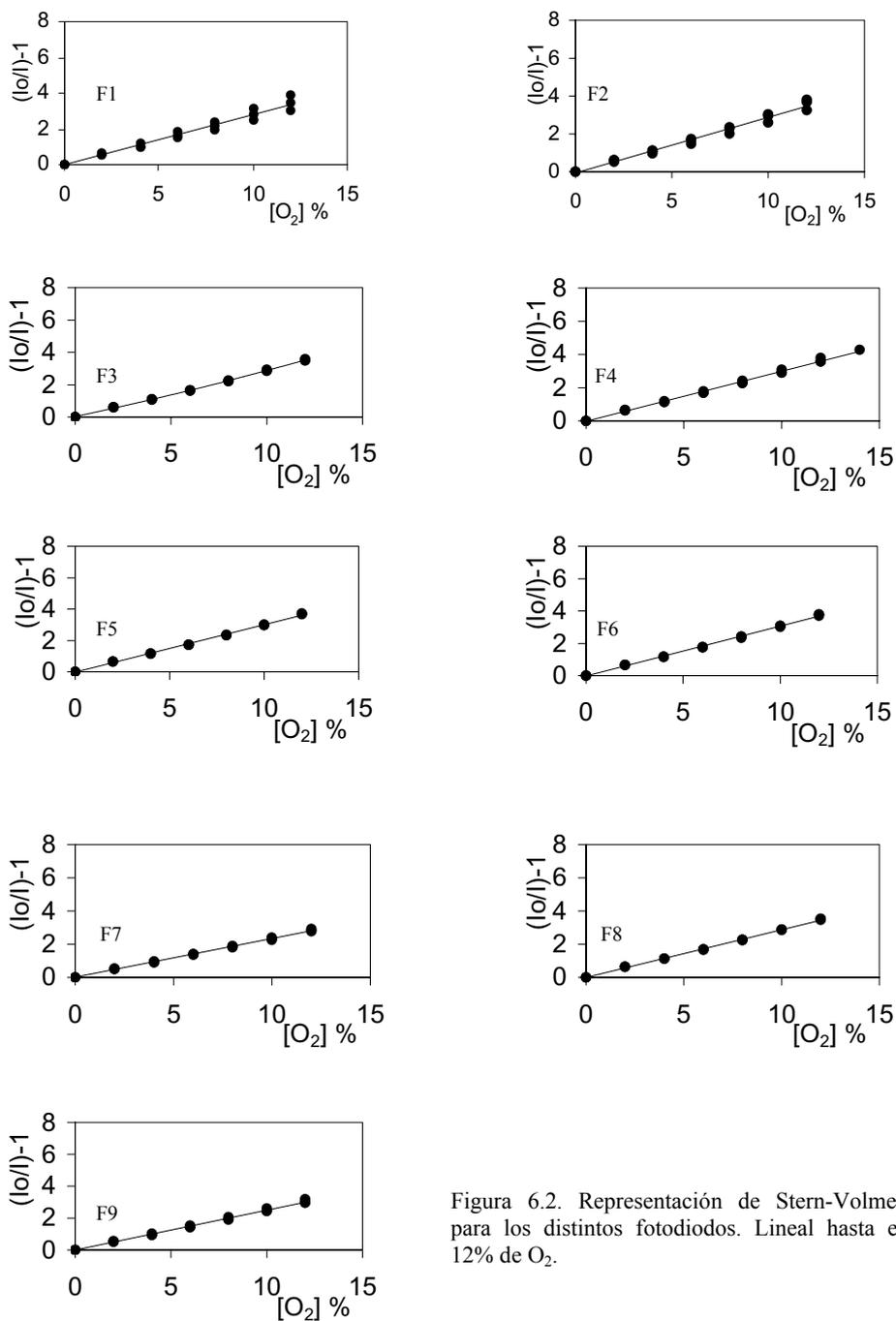


Figura 6.2. Representación de Stern-Volmer para los distintos fotodiodos. Lineal hasta el 12% de O_2 .

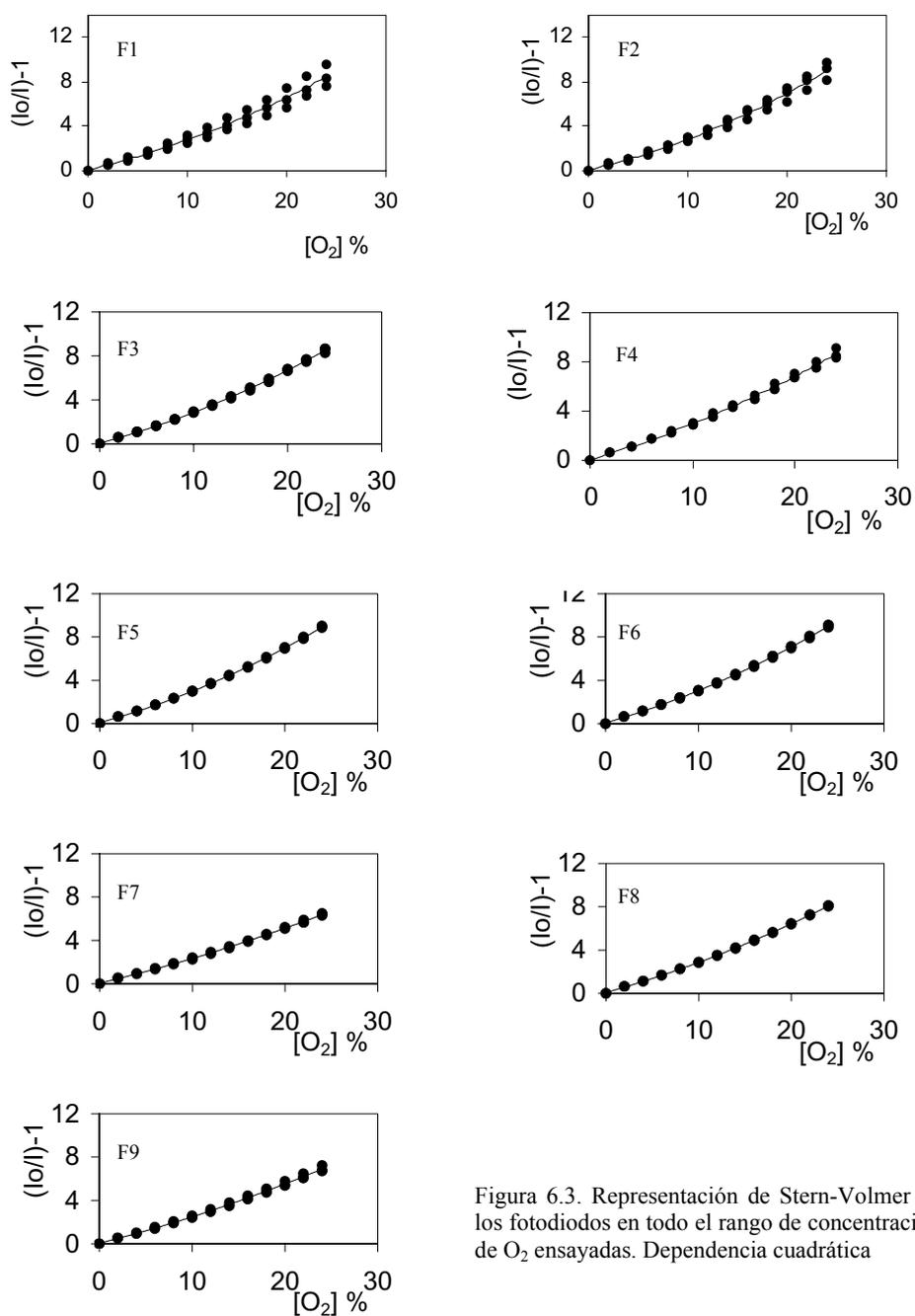


Figura 6.3. Representación de Stern-Volmer para los fotodiodos en todo el rango de concentraciones de O_2 ensayadas. Dependencia cuadrática

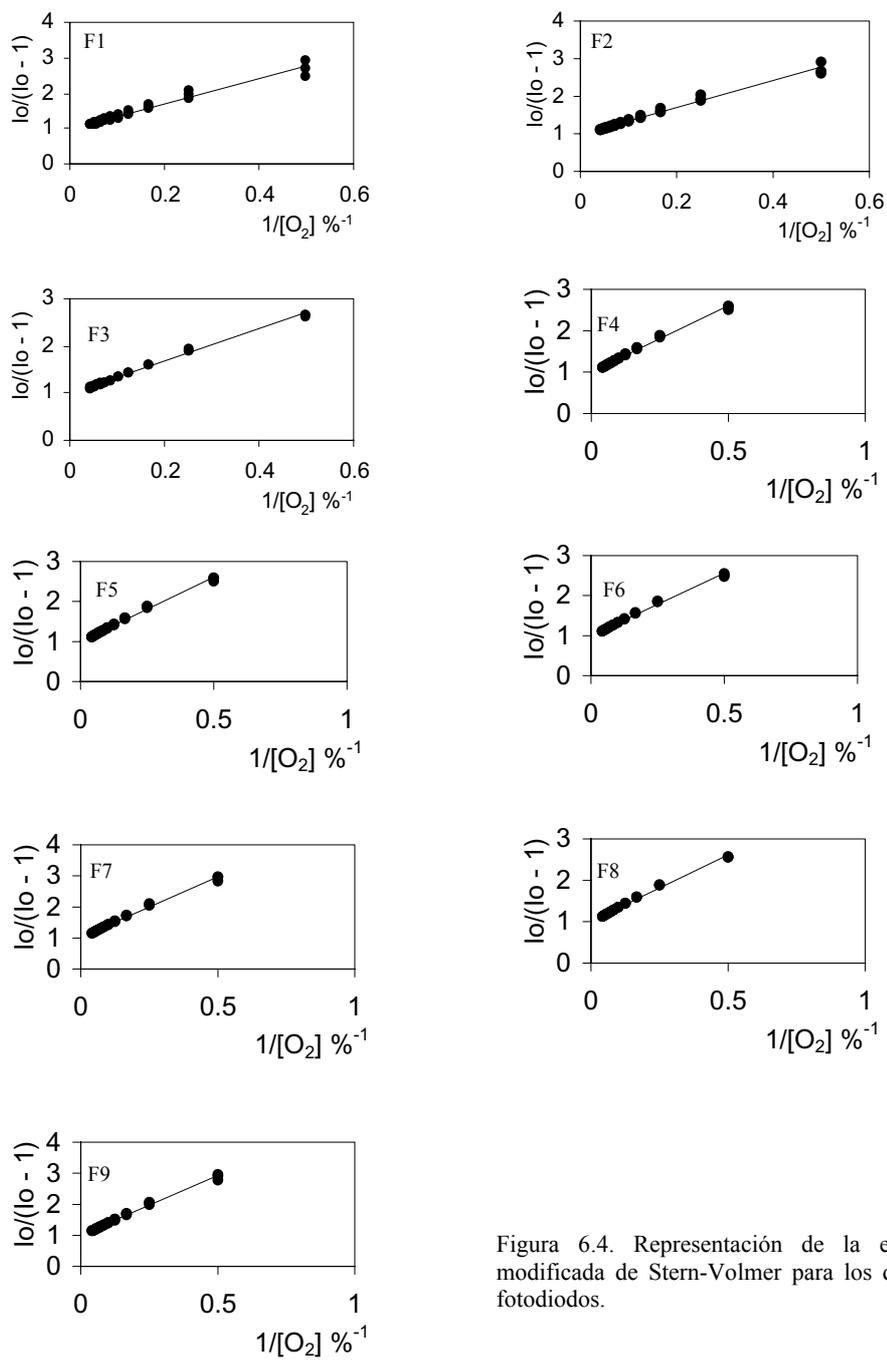


Figura 6.4. Representación de la ecuación modificada de Stern-Volmer para los distintos fotodiodos.

3.2. Capacidad de respuesta.

Se estableció la respuesta de los fotodetectores a la variación alternante de atmósfera desde oxígeno a nitrógeno puros. En las Figuras 6.5 a 6.13 se muestran un ejemplo de los registros originados de recuperación de señal para cada uno de los fotodiodos fabricados. Los tiempos de respuesta $t(N_2 \rightarrow O_2)$ y de recuperación $t(O_2 \rightarrow N_2)$ se muestran en la Tabla 6.4, donde se observa que en todos los casos la señal se recupera bien y de forma reproducible originando buenos resultados.

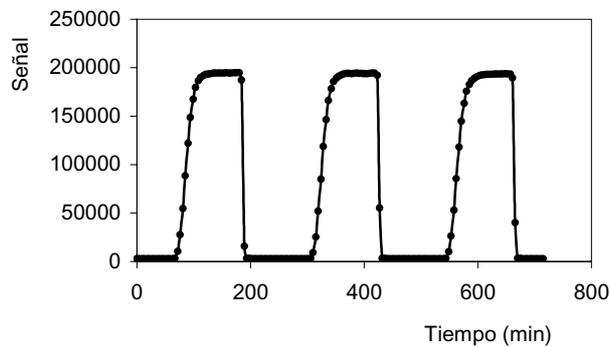


Figura 6.5. Capacidad de respuesta. Fotodiodo F1.

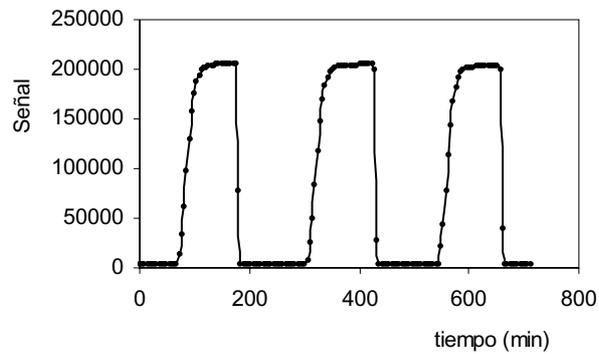


Figura 6.6. Capacidad de respuesta. Fotodiodo F2.

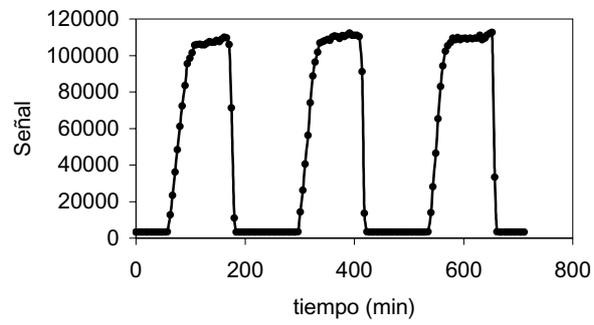


Figura 6.7. Capacidad de respuesta. Fotodiodo F3.

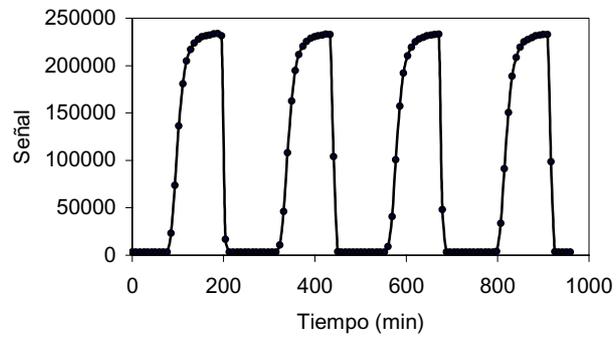


Figura 6.8. Capacidad de respuesta. Fotodiodo F4.

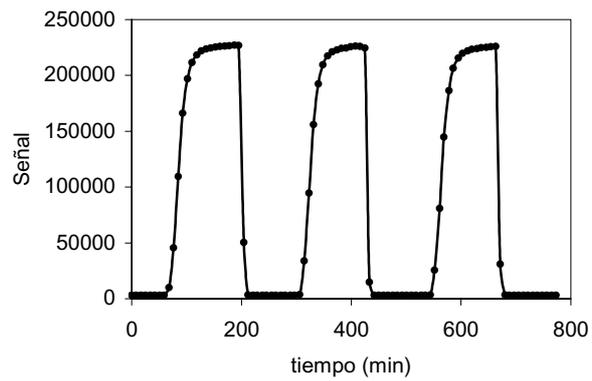


Figura 6.9. Capacidad de respuesta. Fotodiodo F5.

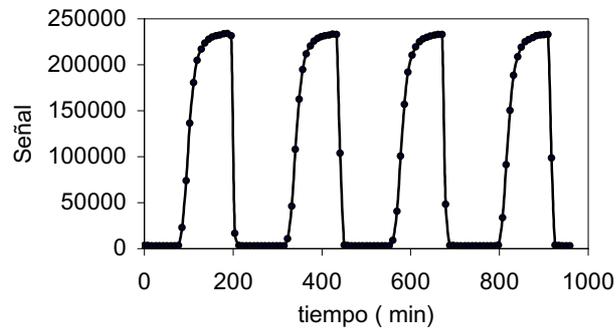


Figura 6.10. Capacidad de respuesta. Fotodiodo F6.

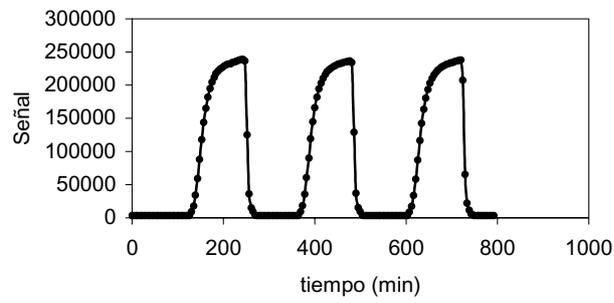


Figura 6.11. Capacidad de respuesta. Fotodiodo F7.

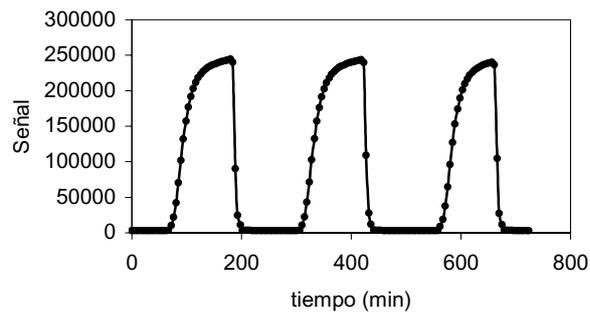


Figura 6.12. Capacidad de respuesta. Fotodiodo F8.

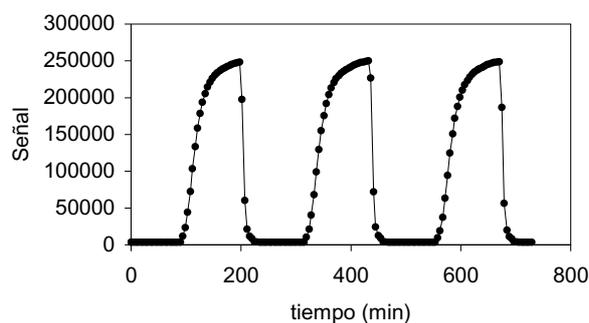


Figura 6.13. Capacidad de respuesta. Fotodiodo F9.

3.3. Comparación de resultados

Los resultados obtenidos de este estudio para cada uno de los fotodiodos ensayados en el prototipo P04 se muestran en la Tabla 6.11. Los valores medios encontrados para los fotodetectores con 5, 10 y 15 μ L de cóctel son muy similares como se observa en la Tabla 6.12.

Observamos que la sensibilidad, como pendiente de la función de Stern-Volmer, es parecida en los tres casos, aunque un poco mayor para los preparados con 10 μ L. El tiempo de respuesta, por su parte, se incrementa al aumentar la cantidad de cóctel depositada, así como la desviación estándar relativa, que también aumenta ligeramente con el aumento de la cantidad depositada. Los valores medios del cociente I_0/I_{24} representados para los tres tipos de fotodiodos, que dan idea de la variación de señal del sistema, descienden ligeramente y el valor de señal máximo en ausencia de oxígeno aumenta con la cantidad depositada. A pesar de la similitud de resultados obtenidos, hemos seleccionado 10 μ L como volumen adecuado para recubrir los fotodiodos ya que ofrecen buena señal y sensibilidad.

Tabla 6.11. Comparación de resultados obtenidos para los distintos fotodiodos estudiados.

Con 5μL		Con 10μL		Con 15 μL	
Fotodiodo 1		Fotodiodo 4		Fotodiodo 7	
Ksv	0,28	Ksv	0,29	Ksv	0,23
DER al 10%	1,95%	DER al 10%	2,66%	DER al 10%	1,15%
DER al 20%	0,36%	DER al 20%	3,31%	DER al 20%	0,98%
t (N ₂ →O ₂)	14 s	t (N ₂ →O ₂)	17 s	t (N ₂ →O ₂)	27 s
t (O ₂ →N ₂)	36 s	t (O ₂ →N ₂)	51 s	t (O ₂ →N ₂)	54 s
Fotodiodo 2		Fotodiodo 5		Fotodiodo 8	
Ksv	0,28	Ksv	0,29	Ksv	0,28
DER al 10%	0,95%	DER al 10%	0,48%	DER al 10%	0,37%
DER al 20%	0,79%	DER al 20%	0,81%	DER al 20%	0,31%
t (N ₂ →O ₂)	13 s	t (N ₂ →O ₂)	17 s	t (N ₂ →O ₂)	18 s
t (O ₂ →N ₂)	36 s	t (O ₂ →N ₂)	42 s	t (O ₂ →N ₂)	48 s
Fotodiodo 3		Fotodiodo 6		Fotodiodo 9	
Ksv	0,28	Ksv	0,30	Ksv	0,25
DER al 10%	0,50%	DER al 10%	0,41%	DER al 10%	2,85%
DER al 20%	1,22%	DER al 20%	0,35%	DER al 20%	3,40%
t (N ₂ →O ₂)	14 s	t (N ₂ →O ₂)	17 s	t (N ₂ →O ₂)	27 s
t (O ₂ →N ₂)	33 s	t (O ₂ →N ₂)	51 s	t (O ₂ →N ₂)	59 s

Tabla 6.12. Características de los fotodetectores. Valores medios.

Cantidad depositada	5 μL	10μL	15μL
K_{SV}	0,28	0,29	0,25
$t (\text{N}_2 \rightarrow \text{O}_2)$	14 s	17 s	24 s
$t (\text{O}_2 \rightarrow \text{N}_2)$	35 s	48 s	53 s
DER (10% [O_2])	1,13	1,18	1,45
DER (20% [O_2])	0,79	1,49	1,56
I_0	199.727	228.099	250.707
I_0/I_{24}	10,13	9,93	8,20

3.4. Parámetros analíticos

3.4.1. Función de calibrado

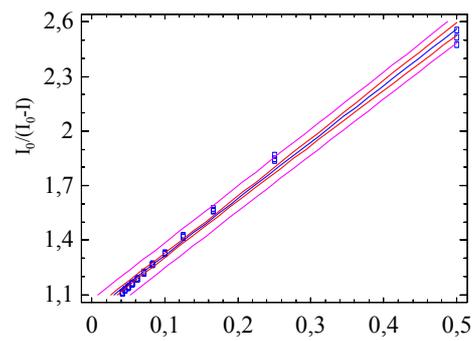
Una vez elegidos los fotodetectores recubiertos con 10 μL , efectuamos una caracterización analítica detallada del prototipo P04 usando estos fotodetectores y realizando tres series de medidas para cada concentración de O_2 .

Se realizó una calibración usando tres réplicas. La calibración se realizó mediante la ecuación de Stern-Volmer modificada pues es lineal en el rango deseado, encontrando la función de calibrado $y = 3,1073x + 1,0025$ (Tabla 6.13), con un valor de $r^2 = 0,995$. La Figura 6.14 muestra la función de calibrado y su banda de confianza.

$1/[O_2]$	$I_0/(I_0-I)$	$I_0/(I_0-I)$	$I_0/(I_0-I)$
0,500	2,557	2,474	2,514
0,250	1,868	1,850	1,840
0,167	1,576	1,566	1,559
0,125	1,427	1,416	1,415
0,100	1,333	1,326	1,324
0,083	1,271	1,265	1,264
0,071	1,225	1,221	1,218
0,063	1,191	1,187	1,186
0,056	1,164	1,161	1,160
0,050	1,144	1,140	1,140
0,045	1,127	1,124	1,123
0,042	1,112	1,110	1,109

Tabla 6.13. Calibración del prototipo P04 para oxígeno.

Figura 6.14. Función de calibrado para el prototipo P04.



3.4.2. Estabilidad

Se estudió la estabilidad que presenta la señal en el prototipo P04 haciendo uso del fotodiodo recubierto F4. Las medidas fueron realizadas bajo las siguientes condiciones: tiempo de excitación previa 0,05 s, tiempo de medida 1s y tiempo de reposo entre medidas de 1 minuto. La duración del experimento fue de 112 horas. Con este estudio se demuestra que la señal ofrecida por el prototipo, midiendo a 22 °C y a oxígeno ambiente, presenta gran estabilidad ya que tras 105 horas de funcionamiento del oxímetro en estas condiciones de adquisición de medidas cada minuto, el decaimiento de la señal es solo de un 4,9% (Figura 6.15).

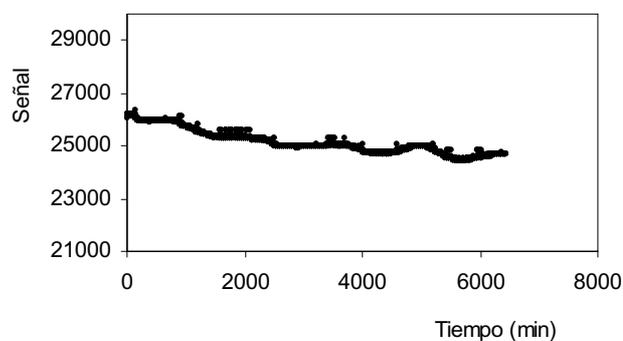


Figura 6.15. Variación de la señal del prototipo P04 medida durante 105 horas de manera continua.

3.4.3. Deriva en la medida de oxígeno

También se estudió la deriva de la señal a lo largo de un periodo de tiempo realizando una medida diaria para una muestra calibrada del 20% de oxígeno durante 20 días. Para este estudio se usó también el fotodetector F4 (Tabla 6.14). Consideramos la deriva como la pendiente de la recta de calibrado de representar la variación porcentual de la concentración de oxígeno respecto al primer día frente al tiempo, debida a una pequeña pérdida de señal,

entre la cantidad de oxígeno medida inicialmente y la obtenida tras un periodo de tiempo dado.

Tabla 6.14. Estimación de la deriva.

Día	Temperatura	Señal al 20%	Variación [O₂](%)
1	21,0°C	32.959	0
4	21,5°C	33.282	-0,22
7	21,0°C	33.710	-0,51
11	21,5°C	33.613	-0,45
12	21,5°C	33.449	-0,33
14	22,0°C	33.490	-0,36
15	22,0°C	33.535	-0,39
18	22,0°C	33.822	-0,58
19	22,0°C	34.016	-0,71
20	22,0°C	33.285	-0,22

De esta manera se calcula una deriva promedio de $-0,02\%$ de oxígeno y la variación con el tiempo muy pequeña. Si consideramos la máxima variación de señal, la deriva diaria es del $0,025\%$; sin embargo, si tenemos en cuenta la diferencia de valores entre el primer y el último día la deriva es del $0,01\%$ diario.

Como conclusión de los estudios realizados tanto en este apartado como en anteriores, se resumen en la Tabla 6.15 los parámetros analíticos que ofrece el prototipo P04 desarrollado.

Parámetros analíticos	Valor
Pendiente	3,113 % ⁻¹
S _{pendiente}	0,045
Rango	1-30 %
DER al 10%	0,41 %
DER al 20%	0,35 %
Tiempo respuesta (N ₂ ⇌ O ₂)	17 s
Tiempo respuesta (O ₂ ⇌ N ₂)	48 s
Deriva	0,02 %/día

Tabla. 6.15. Parámetros analíticos del prototipo P04.

4. Influencia de la temperatura

La temperatura afecta a la intensidad de luminiscencia y al tiempo de vida del estado excitado. Tanto la frecuencia de colisiones entre el oxígeno y el luminóforo como el coeficiente de difusión del oxígeno están influenciados por la temperatura; cuanto mayor sea el número de colisiones, mayor será este tipo de desactivación no radiativa y, por tanto, menor será la luminiscencia emitida por el luminóforo¹, cosa que ya vimos en el Capítulo 5 para las membranas desarrolladas sensibles a oxígeno en el prototipo P02.

En este capítulo estudiaremos cual es la dependencia de la señal con la temperatura para los fotodiodos recubiertos con el material sensible a oxígeno en el prototipo P04 y trataremos de modelarla, para así compensar esta influencia y, a través del un sensor de temperatura en el prototipo, poder seleccionar en el oxímetro portátil la función respuesta para esas condiciones dadas de temperatura.

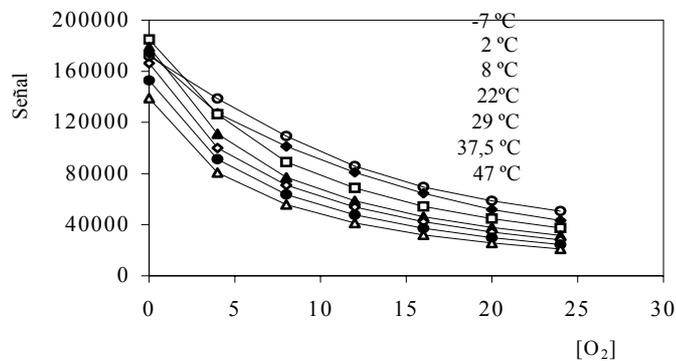
¹ O.S. Wolfbeis, Fluorescence Spectroscopy: New Methods and Applications, Springer, Berlin, (1993).

4.1. Influencia sobre la ecuación de Stern-Volmer

Se realizó un estudio del efecto de temperatura sobre la señal medida y sobre la función de Stern-Volmer obtenida. Esto se hizo con el prototipo P04 en el que situamos el fotodiodo F4. La Tabla 6.16 y Figura 6.16 muestran los resultados.

Tabla 6.16. Señal obtenida a distintas concentraciones de O_2 y diferentes temperaturas

$O_2\%$	-7°C	2°C	9°C	22°C	29°C	37,5°C	47°C
0	171.873	174.062	184.869	179.091	166.344	152.932	138.966
4	138.584	127.201	126.447	110.884	99.963	91.116	80.635
8	109.350	101.290	89.062	77.138	71.013	63.640	55.698
12	85.822	80.898	68.685	58.710	53.800	47.761	41.236
16	69.407	64.570	54.337	46.329	42.313	37.094	32.035
20	58.715	51.807	44.700	37.780	34.150	29.944	25.569
24	50.580	43.277	37.444	31.485	28.189	24.537	20.960



6.16. Dependencia de la señal con la temperatura para el fotodetector F4. Prototipo P04.

Al igual que ya vimos en el Capítulo 5, la señal fosforescente varía linealmente con la temperatura (Figura 6.17).

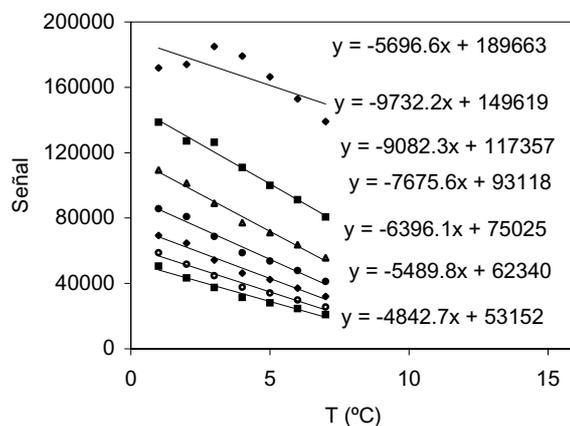


Figura 6.17. Dependencia lineal de la señal medida con la temperatura.

Si aplicamos la ecuación de Stern-Volmer para las distintas temperaturas estudiadas (Figura 6.18), se observa cómo la constante de Stern-Volmer (K_{SV}) aumenta conforme lo hace la temperatura (Tabla 6.17).

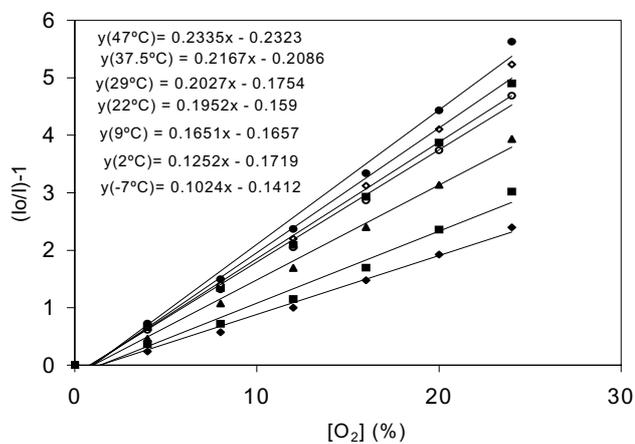


Figura 6.18. Representación de Stern-Volmer para las distintas temperaturas estudiadas.

Se comprueba que la constante de Stern-Volmer (K_{SV}) está relacionada con la temperatura según una ecuación polinómica de segundo grado ($K_{SV} = a + bT + cT^2$) como podemos ver en la siguiente Figura 6.19.

T°C	Ksv
-7,0	0,1024
2,0	0,1252
9,0	0,1651
22,0	0,1952
29,0	0,2027
37,5	0,2167
47,0	0,2335

Tabla 6.17. Valor de la K_{SV} para diferentes temperaturas.

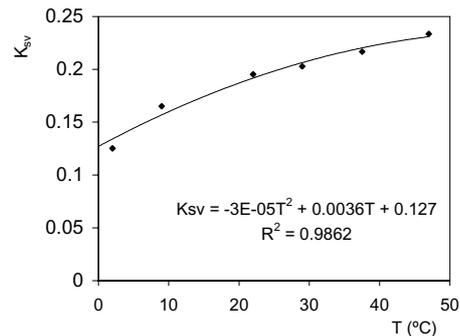


Figura 6.19. Dependencia de K_{SV} con la temperatura

La ecuación polinómica obtenida es $K_{SV} = 0,127 + 0,0036T - 3 \cdot 10^{-5} T^2$ de donde las constantes a , b y c son: $a = 0,127$; $b = 0,0036$ y $c = -3 \cdot 10^{-5}$.

También se estudió la aplicación de la ecuación de Stern-Volmer para curvatura positiva ($I_0/I = 1 + K_1 [O_2] + K_2 [O_2]^2$) (Figura 6.20). Los valores obtenidos de las constantes K_1 y K_2 se muestran en la Tabla 6.18. Un planteamiento similar utiliza la empresa Ocean Optics para su instrumentación Foxy (Fiber Optic Oxygen Sensor)², en la que proponen, en el caso de no termostatar la muestra a medir, incluir un termistor y un termopar tipo-K,

² Ocean Optics, Theory of Operation, <http://www.oceanoptics.com/Products/foxytheory.asp>, (2005)

ambos opcionales, para corregir dicha influencia mediante software en el ordenador personal al que debe ir conectado.

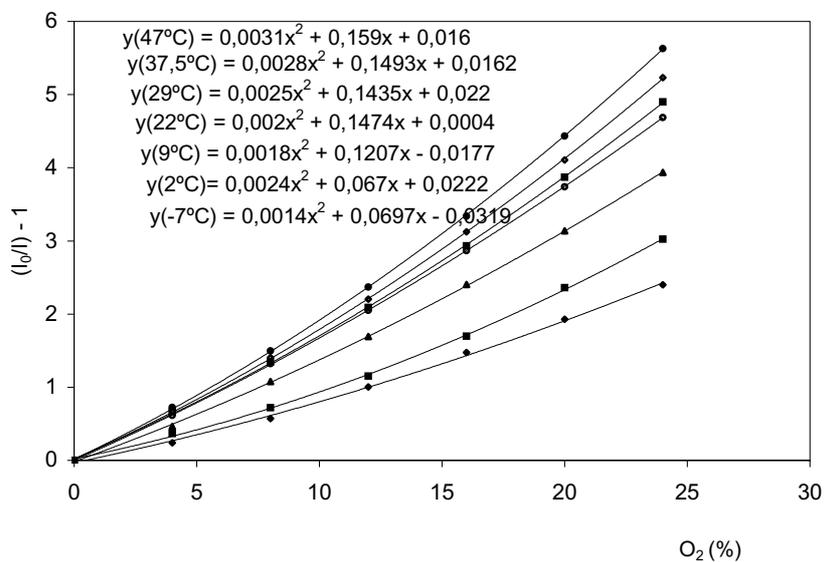


Figura 6.20. Representación de la ecuación de Stern-Volmer para las distintas temperaturas estudiadas.

Tabla 6.18. Valores de K_1 y K_2 a distinta T.

T (°C)	K_1	K_2
-7,0	0,069	0,001
2,0	0,067	--
9,0	0,121	0,002
22,0	0,147	0,002
29,0	0,143	0,003
37,5	0,144	0,003
47,0	0,159	0,003

Los valores de K_1 y K_2 con la temperatura se pueden ajustar a una función polinómica como la anterior ($K_1 = a_1 + b_1 T + c_1 T^2$ y $K_2 = a_2 + b_2 T + c_2 T^2$) (Figuras 6.21 y 6.22), pudiéndose calcular las constantes a, b y c de este calibrado polinómico como se indica en las figuras.

Representando los valores para K_1 y K_2 frente a la temperatura obtenemos lo siguiente:

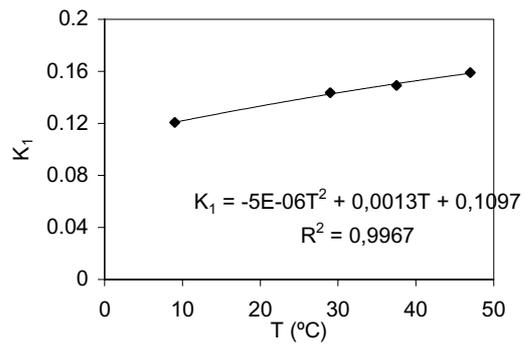


Figura 6.21. Variación de K_1 con la temperatura.

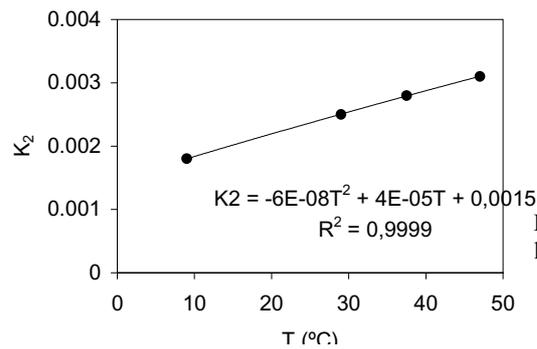


Figura 6.22. Variación de K_2 con la temperatura.

Las ecuaciones que explican el comportamiento de las constantes con la temperatura son las siguientes:

$$K_1 = a_1 + b_1 T + c_1 T^2 \quad (6.1)$$

$$K_2 = a_2 + b_2 T + c_2 T^2 \quad (6.2)$$

5. Calibración en un punto: Autocalibración.

En este apartado se explicará todo el proceso seguido hasta la obtención de un algoritmo que se incluirá en la programación del microcontrolador del instrumento que permite la calibración y posterior recalibración de un fotodetector. Dadas las relaciones funcionales obtenidas en nuestros resultados previos, la dependencia térmica de la concentración de oxígeno se ajusta bien con una función cuadrática, mientras que respecto al número de pulsos I , la dependencia funcional que mejor se ajusta es la inversa de la raíz cuadrada a temperatura constante. Combinando estos resultados, proponemos una función de calibración empírica donde se incluyen términos individuales en temperatura con términos cruzados con el número de pulsos:

$$[O_2] = a_{00} + a_{01}T + A_1 \cdot I^{-1/2} + A_2 \cdot T \cdot I^{-1/2} + A_3 \cdot T^2 \cdot I^{-1/2} \quad (6.3)$$

Se seleccionaron 11 fotodetectores y se numeraron del 1 al 11. A éstos, se les depositó una película del material químico sensible. Cada fotodetector recubierto fue sometido a un proceso de medidas exhaustivas a diferentes temperaturas y concentraciones de oxígeno, obteniendo así un conjunto de datos para cada fotodetector.

$$[O_2]_{i,j} \quad I_{i,j} \quad T_{i,j} \quad i=1..11 \quad j=1..n_i \quad (6.4)$$

Donde $[O_2]_{i,j}$ es la j -ésima concentración de oxígeno medida para el fotodetector i -ésimo, $I_{i,j}$ es la j -ésima medida de pulsos para el fotodetector i -ésimo, $T_{i,j}$ es la j -ésima medida de temperatura para el fotodetector i -ésimo y n_i el número total de medidas realizadas para el fotodetector i -ésimo.

Para cada fotodetector i , se realiza un ajuste lineal a la expresión (6.3) usando para ello las n_i medidas experimentales de cada fotodetector obtenidas, resultando así un total de once grupos de constantes:

$$a_{00}^i, a_{01}^i, A_1^i, A_2^i, A_3^i \quad (6.5)$$

En la Tabla 6.19 se resumen los resultados obtenidos.

Tabla 6.19. Parámetros ajustes al modelo de la ecuación 6.3.

Fotodetector	a_{00}	a_{01}	A_1	A_2	A_3	R^2
1	-16,39	0,162	7275	-84,24	0,172	0,99962
2	-18,12	0,158	8204	-93,27	0,271	0,99943
3	-11,44	0,106	4979	-54,78	0,189	0,99946
4	-14,09	0,120	6213	-64,58	0,166	0,99977
5	-14,64	0,128	6548	-75,11	0,295	0,99976
6	-14,34	0,128	6241	-59,75	-0,005	0,99982
7	-16,83	0,161	7304	-84,76	0,213	0,99980
8	-17,08	0,143	7935	-86,90	0,293	0,99901
9	-17,12	0,137	8004	-87,83	0,363	0,99885
10	-15,33	0,134	6858	-77,00	0,284	0,99961
11	-16,94	0,137	7747	-77,56	0,188	0,99924

Como se puede apreciar, el índice de correlación obtenido es excelente al aplicar la función de calibrado a cada fotodetector individualmente, lo que corrobora la bondad de la función aplicada.

Para simplificar la función, el siguiente paso a realizar es la obtención de relaciones entre esos parámetros para reducir el número de variables independientes en la función.

- Correlaciones entre los parámetros de ajuste.

Si representamos \mathbf{a}_{01} , \mathbf{A}_1 , \mathbf{A}_2 , \mathbf{A}_3 en función de \mathbf{a}_{00} , y realizamos ajustes lineales al siguiente modelo:

$$y_k = m_i \cdot x_k + d_k \quad (6.6)$$

obtenemos las Figuras 6.23 a 6.26 y Tabla 6.20 representadas a continuación.

Tabla 6.20. Ajustes para la correlación de parámetros al modelo de la ecuación 6.3.

y_k	x_k	m_k	d_k	R^2
a_{01}	a_{00}	-7,690E-03	1,698E-02	0,71398
A_1	a_{00}	-5,026E+02	-8,455E+02	0,97498
A_2	a_{00}	6,044E+00	1,780E+01	0,87357
A_3	a_{00}	-2,075E-02	-1,043E-01	0,16550

Aunque en este caso los ajustes no son tan buenos como en el caso anterior, comprobaremos más adelante, que los errores cometidos al tomar estas aproximaciones son asumibles.

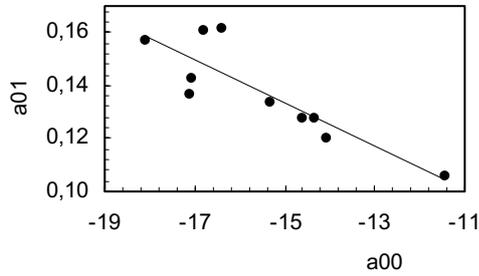


Figura 6.23. correlaciones de parámetros del modelo propuesto. a01 vs a00.

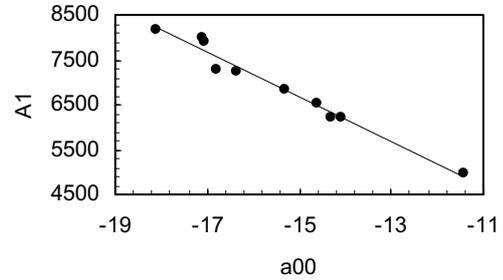


Figura 6.24. correlaciones de parámetros del modelo propuesto. A1 vs a00.

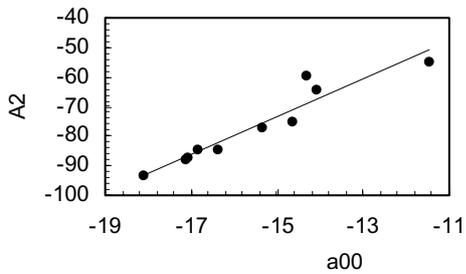


Figura 6.25. correlaciones de parámetros del modelo propuesto. A2 vs a00.

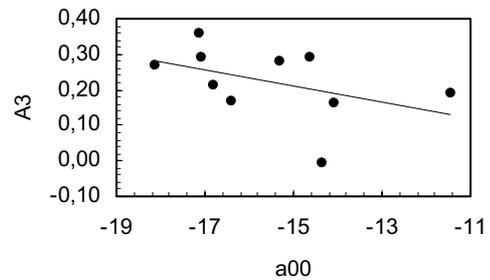


Figura 6.26. Correlaciones de parámetros del modelo propuesto. A3 vs a00.

- Autocalibración.

Si escribimos a_{01} , A_1 , A_2 , A_3 en función de a_{00} de acuerdo con 6.6., se obtiene:

$$\begin{aligned}
 a_{01} &= m_1 \cdot a_{00} + d_1 \\
 A_1 &= m_2 \cdot a_{00} + d_2 \\
 A_2 &= m_3 \cdot a_{00} + d_3 \\
 A_3 &= m_4 \cdot a_{00} + d_4
 \end{aligned}
 \tag{6.7}$$

Sustituyendo en (1.1) y despejando a_{00} :

$$a_{00} = \frac{[O_2] (d_1 \cdot T + d_2 \cdot I^{1/2} + d_3 \cdot T \cdot I^{1/2} + d_4 \cdot T^2 \cdot I^{1/2})}{1 + m_1 \cdot T + m_2 \cdot I^{1/2} + m_3 \cdot T \cdot I^{1/2} + m_4 \cdot T^2 \cdot I^{1/2}} \quad (6.8)$$

Esta expresión, nos permite calibrar un fotodetector ya que si se conoce la concentración de oxígeno, la temperatura y la medida de pulsos, se puede obtener a_{00} y mediante (6.7) el resto de parámetros, al ser m_i y d_i conocidos y comunes para todos los fotodetectores recubiertos. A continuación, se estimará el error cometido al tomar todas las aproximaciones y ajustes indicados en este apartado.

- Errores del instrumento, comparación entre el modelo ajustado para cada fotodetector y la autocalibración.

En este apartado se hará para cada fotodetector la reconstrucción de los parámetros a partir de una autocalibración simulada y se comparará con el resultado obtenido para el ajuste individual del modelo.

Sea $^a a_{00}^i, ^a a_{01}^i, ^a A_1^i, ^a A_2^i, ^a A_3^i$ el conjunto de parámetros del modelo propuesto obtenidos para el fotodetector i , a partir del ajuste lineal de la expresión 6.7. Sea $^c a_{00}^i, ^c a_{01}^i, ^c A_1^i, ^c A_2^i, ^c A_3^i$ el conjunto de parámetros del modelo propuesto para el fotodetector i , obtenidos a partir de las expresiones 6.7 y 6.8 y un dato experimental 6.4.

Sea $^a [O_2]_{i,j}$ el valor obtenido de evaluar la expresión 6.3 con los parámetros $^a a_{00}^i, ^a a_{01}^i, ^a A_1^i, ^a A_2^i, ^a A_3^i$ en el punto experimental $I_{i,j}, T_{i,j}$. Sea $^c [O_2]_{i,j}$ el valor obtenido de evaluar la expresión 6.3 con los parámetros $^c a_{00}^i, ^c a_{01}^i, ^c A_1^i, ^c A_2^i, ^c A_3^i$ en el

punto experimental $I_{i,j}, T_{i,j}$. Definiendo para cada fotodetector i el error absoluto del ajuste en un punto ${}^a \epsilon_i$ y el error absoluto de calibración en un punto ${}^c \epsilon_i$ como:

$${}^a \epsilon_i = {}^a [O_2]_{i,j} \quad [O_2]_{i,j} \quad (6.9a)$$

$${}^c \epsilon_i = {}^c [O_2]_{i,j} \quad [O_2]_{i,j} \quad (6.9b)$$

Si representamos en una gráfica el histograma (en frecuencia relativa) de errores absolutos y el acumulado para cada fotodiodo, obtenemos las gráficas que se representan a continuación (Figuras 6.27 y 6.28). Donde para el acumulado, se considera el $|{}^a \epsilon_i|$ y $|{}^c \epsilon_i|$.

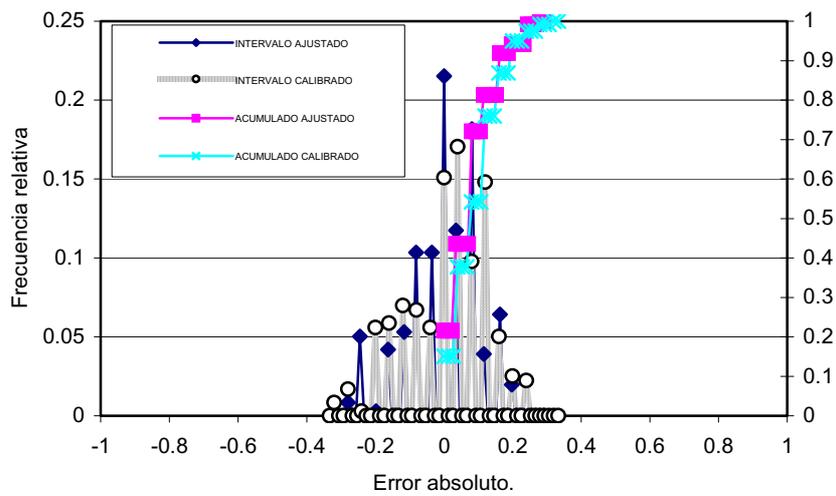


Figura 6.27. Histograma y acumulado de los errores para el fotodiodo 5.

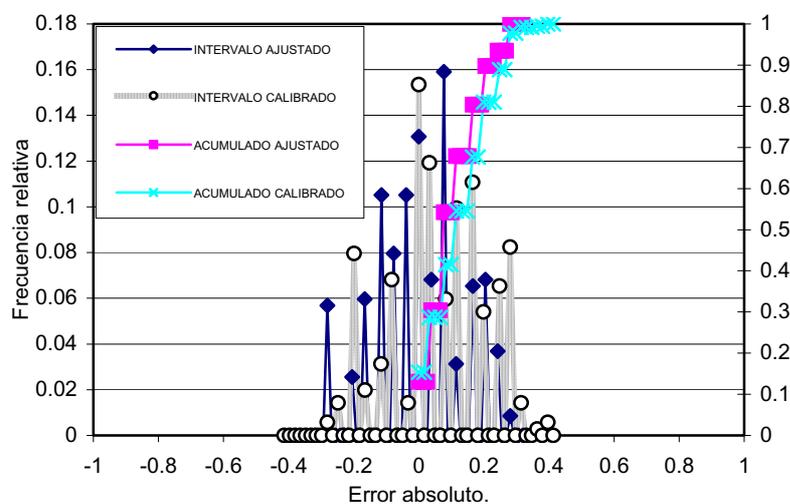


Figura 6.28. Histograma y acumulado de los errores para el fotodiodo 10.

Para poder interpretar si existe alguna zona de funcionamiento del fotodetector que no queda bien representada por el autocalibrado, se representa ϵ_i en función de la temperatura para las distintas concentraciones de oxígeno obteniendo las gráficas representadas a continuación (Figuras 6.29 y 6.30).

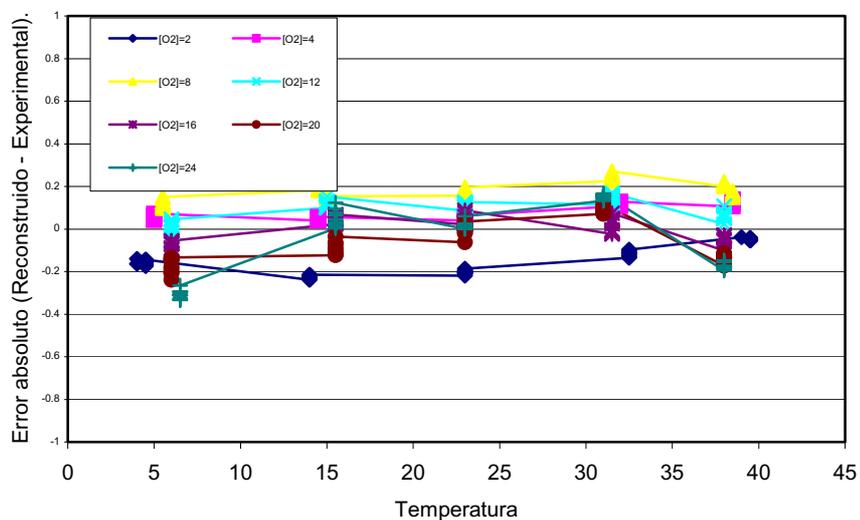


Figura 6.29. Errores absolutos calibrados en función de la temperatura para F5.

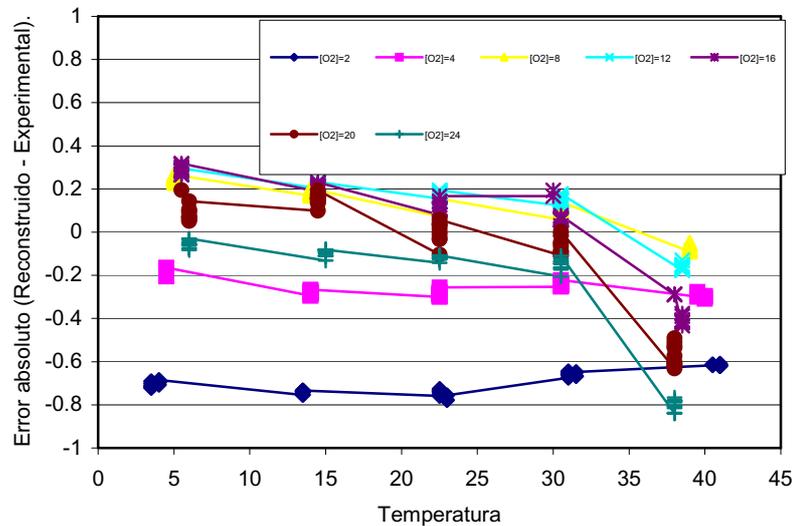


Figura 6.30. Errores absolutos calibrados en función de la temperatura para F10.

Las figuras que se muestran para los fotodetectores recubiertos 5 y 10 son una muestra del comportamiento general del conjunto de fotodetectores. No se puede afirmar que exista una zona de temperaturas o de concentraciones de oxígeno de los analizados donde el modelo común se aleje más que en otra. Por tanto, podemos concluir que su rango de validez cubre las prestaciones deseadas para el sistema de medida.

Para cuantificar el grado de confianza de este modelo y tras un detallado estudio de los histogramas de errores absolutos de cada fotodetector, una desviación típica está por debajo del 0,6 % en concentración de oxígeno en todos los casos. Es decir, el resultado que nos proporciona este modelo presenta una desviación típica absoluta de 0,6 % en concentración de oxígeno. Este valor lo consideramos lo suficientemente bueno como aceptar las múltiples ventajas que proporciona el tener una función de calibración que se puede ajustar y corregir tomando solamente el punto de concentración ambiente, sin necesidad de calibración en condiciones controladas de laboratorio.

En resumen, aplicando la ecuación 6.9 reajustamos toda la función de calibración a las condiciones actuales, corrigiendo, por tanto, posibles desviaciones por envejecimiento del sensor, humedad o presión ambiental.

6. Validación

Con el objetivo de comprobar la utilidad y validez del prototipo desarrollado se midieron diversas mezclas de diferente proporción de oxígeno con el prototipo desarrollado y con una instrumentación comercial. En la Tabla 6.32 observamos los valores obtenidos por el prototipo P04 y el medidor comercial de referencia MicroPac Plus para la monitorización de O₂ basado en un sensor electroquímico. Los valores reflejados en dicha Tabla corresponden a la media de tres réplicas de cada concentración para cada uno de los instrumentos. También está incluida la desviación estándar de estas réplicas así como el valor P del test de comparación de medias, quien nos indica que, en todos los casos, no existe diferencia significativa entre los resultados obtenidos, pues en todos los casos el valor $P_{\text{value}} > 5\%$.

Tabla 6.21. Determinación de oxígeno en diferentes mezclas de gas usando el instrumento MicroPac Plus como instrumento de referencia.

Composición (%)	P04		Medidor (referencia)		P _{val} (%)
	X	S	X	S	
24	24,2	0,058	24,1	0,006	72,5
20	20,3	0,289	19,9	0,115	11,1
16	17,0	0,500	16,1	0,115	7,6
12	12,3	0,289	11,9	0,265	12,8
8	8,2	0,289	7,8	0,115	9,0
Aire (20,9)	21,0	-	20,9	-	-

7. Características técnicas del equipo

Tras su caracterización en el laboratorio, las propiedades técnicas del prototipo P04 desarrollado para la medida de oxígeno ambiental son las siguientes:

- Rango de temperaturas: -10 °C a 50°C.
- Rango de [O₂]: 1-30 %.
- Resolución: 0,5% en concentración.
- Exactitud: 1% en concentración.
- Tiempo de respuesta: < 30 s (10%-90% rango total).
- Derivas: <0,02% en concentración/día.
- Coste \cong 108 Euros

El coste estimado de los componentes electrónicos del prototipo desarrollado se ha calculado prorrateando cada una de las materias y materiales que lo componen es de 107,4 euros (en el año 2004). Hay que tener en cuenta que los materiales usados su calidad y por sus proporciones son mucho más caros que si se tratase de una fabricación industrial. El recubrimiento químico calculado del fotodiodo costaría 0,25 céntimos de euro. Por otro lado, no está contemplada en esta estimación el coste de mano de obra empleada para la fabricación del sensor; por lo que no deja de ser esta una estimación, que sin duda está muy por encima de su coste real en una fabricación industrial en serie.

**DESARROLLO DE
INSTRUMENTACIÓN PORTÁTIL
PARA DIÓXIDO DE CARBONO**

CAPÍTULO 7
SENSOR ÓPTICO PARA
LA DETERMINACIÓN DE
DIÓXIDO DE CARBONO

1. Introducción

Como vimos en el Capítulo 1, para la determinación de CO₂ mediante sensores ópticos se utiliza normalmente la medida de la absorción de radiación o la medida de intensidad de fluorescencia, generalmente en combinación con fibra óptica. Los métodos basados en medidas de intensidad presentan una serie de inconvenientes, pues dicha intensidad de luminiscencia puede venir afectada por cambios en la intensidad de la fuente luminosa, así como por variación en la eficiencia de transmisión óptica o por la fluorescencia intrínseca de la muestra. Más interesante es la medida del tiempo de decaimiento de luminiscencia por las ventajas que presenta al poder ser medida mediante instrumentación barata y con alta resolución

Así, en los últimos años están siendo empleados sensores de dióxido de carbono de tipo óptico basados en medidas de luminiscencia usando tanto técnicas que emplean indicadores ácido-base sensibles a CO₂ como filtro interno^{1,2}, como técnicas basadas en

¹ Y. Amao y N. Nakamura, *Sens. Actuators B*, 100, 347 (2004).

² A. Mills, Q. Chang y N. McMurray, *Anal. Chem.* 64, 1383 (1992).

transferencia de energía (RET) de un luminóforo cuya emisión solapa con el espectro de absorción del indicador de pH^{3,4}.

En este Capítulo se expone el trabajo desarrollado para poner a punto y, posteriormente, caracterizar, sensores ópticos para la medida de dióxido de carbono gaseoso basado en medidas de luminiscencia de un complejo de platino (PtOEP) que actúa como luminóforo y que se encuentra dentro de membranas que contienen un indicador de pH, sensible a dióxido de carbono. Estas medidas se han llevado a cabo con instrumentación convencional y con la instrumentación portátil aquí desarrollada. Uno de los problemas que presentan estos sistemas es que el oxígeno actúa como interferente, haciendo que las medidas haya que realizarlas en ausencia de este gas. Hemos ensayado el empleo de polímeros que actúan como barrera a oxígeno tanto para la preparación de membranas barrera como mediante el encapsulamiento del luminóforo en nanopartículas de estos polímeros.

Para ello hemos procedido en dos fases:

En una primera fase se han desarrollado membranas que contenían un indicador ácido-base lipofilizado que presentaba la característica de que su espectro de absorción solapaba en una de sus formas, ácida o básica, con el espectro de emisión del luminóforo empleado y que era capaz de responder a CO₂ midiendo absorción de radiación. Para ello, se midió la respuesta a CO₂ de esas membranas colorimétricas. A continuación, se prepararon membranas que combinaban estas ahora preparadas con las anteriormente desarrolladas para oxígeno, de forma que se pudiera medir con la instrumentación portátil desarrollada. En este primer estudio se omite la interferencia causada por la presencia de oxígeno operando normalmente en atmósfera de nitrógeno.

³ G. Neurauter, I. Klimant y O.S. Wolfbeis, *Anal. Chim. Acta.*, 382, 67 (1999).

⁴ J.R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Plenum Publisher, New York, p.382 (1999).

En una segunda fase se trató de obviar la interferencia de oxígeno, desarrollando materiales impermeables a oxígeno que contuvieran el luminóforo encapsulado. Con ellos se prepararon membranas sensibles a CO₂ y a las que no afecta el O₂ ambiente, las cuales fueron caracterizadas en el prototipo instrumental denominado P02.

2. Membranas colorimétricas para CO₂

En primer lugar tratamos la preparación y caracterización de membranas del tipo que se han denominado en la Introducción de membrana homogénea, que cambian de color en presencia de CO₂. Para la preparación de estas membranas sensoras se han seleccionado una serie de reactivos como son indicadores de pH, bases lipofílicas (denominadas por algunos autores⁵ agentes transferentes de fase, como ya vimos en la Introducción) y polímeros. Estos compuestos, disueltos en un disolvente adecuado, se han depositado sobre un soporte tipo Mylar formando las membranas tal como ha sido descrito en el Capítulo 2.

2.1. Esquema químico

La mayoría de los sensores ópticos para la determinación óptica de CO₂ utilizan un indicador de pH que cambia de color o de fluorescencia cuando la concentración de protones del medio es alterada por un cambio en la concentración de CO₂ o en la presión parcial de CO₂ en la atmósfera ambiente.

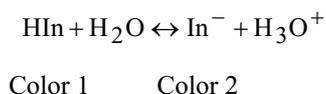
El CO₂ puede variar el pH del medio a través de la formación de ácido carbónico por hidratación y la posterior reacción ácido-base con agua que libera hidrogenoiones. Por tanto, para la medida de CO₂ nos basamos en los equilibrios siguientes:

⁵ X. Ge, Y. Kostov y G. Rao, Biosen. Bioelectronics, 18, 857 (2003).

Etapa	Equilibrio	Constante
Disolución	$\text{CO}_2(\text{g}) \Leftrightarrow \text{CO}_2(\text{d})$	$K_D = 3,3 \times 10^{-2}$
Hidratación	$\text{CO}_2(\text{d}) + \text{H}_2\text{O} \Leftrightarrow \text{H}_2\text{CO}_3$	$K_H = 2,6 \times 10^{-3}$
1ª Disociación	$\text{H}_2\text{CO}_3 + \text{H}_2\text{O} \Leftrightarrow \text{HCO}_3^- + \text{H}_3\text{O}^+$	$K_1 = 1,72 \times 10^{-4}$
2ª Disociación	$\text{HCO}_3^- + \text{H}_2\text{O} \Leftrightarrow \text{CO}_3^{2-} + \text{H}_3\text{O}^+$	$K_2 = 5,59 \times 10^{-11}$

En la membrana colorimétrica sensible a CO_2 debe existir un indicador de pH disuelto en un polímero permeable a ese gas y con adecuadas propiedades ópticas. Además, contiene una sal de amonio cuaternario que cumple una doble función: en primer lugar solubilizar el indicador en la membrana hidrófoba a través de la formación de un par iónico con la forma aniónica de dicho indicador. Es obvio a la vista de lo dicho que el indicador ácido-base debe presentar una forma básica de carácter aniónico. La segunda función de esa sal de amonio cuaternario, ahora en forma de hidróxido, es ajustar el pH de la membrana y, en definitiva, ajustar el equilibrio ácido-base del indicador de forma que presente la máxima sensibilidad hacia el CO_2 . Un aumento en la concentración de esa base disminuiría de forma drástica la respuesta de la membrana hacia el gas, al dificultar que el CO_2 modifique el pH del medio y altere la posición de equilibrio del indicador ácido-base y, en consecuencia, el color.

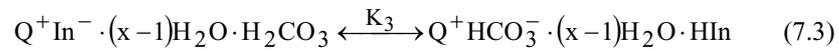
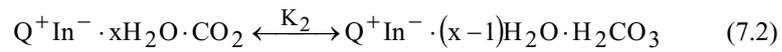
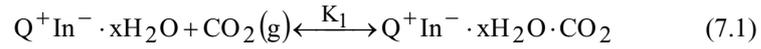
El cambio de color de ese indicador HIn se debe al cambio concomitante de estructura controlado por el equilibrio ácido-base, a través del siguiente equilibrio:



Como ya se ha dicho antes, este indicador se encuentra en la membrana plastificada hidrófoba en forma de par iónico con una sal de amonio cuaternario (Q^+) conteniendo una pequeña número de moléculas de agua de hidratación ($\text{Q}^+ \text{In}^- \cdot x\text{H}_2\text{O}$).

Estas moléculas de agua son necesarias para que se produzca la hidratación del CO_2 y funcione todo el proceso de reconocimiento.

De forma simplificada podríamos describir el proceso de sensado de CO_2 en una membrana colorimétrica en la forma siguiente^{2,6}.



Para las que podemos escribir las constantes:

$$K_1 = \frac{|\text{Q}^+\text{In}^- \cdot x\text{H}_2\text{O} \cdot \text{CO}_2|}{|\text{Q}^+\text{In}^- \cdot x\text{H}_2\text{O}| |\text{CO}_2|} \quad (7.4)$$

$$K_2 = \frac{|\text{Q}^+\text{In}^- \cdot (x-1)\text{H}_2\text{O} \cdot \text{H}_2\text{CO}_3|}{|\text{Q}^+\text{In}^- \cdot x\text{H}_2\text{O} \cdot \text{CO}_2|} \quad (7.5)$$

$$K_3 = \frac{|\text{Q}^+\text{HCO}_3^- \cdot (x-1)\text{H}_2\text{O} \cdot \text{HIn}|}{|\text{Q}^+\text{In}^- \cdot x\text{H}_2\text{O} \cdot \text{H}_2\text{CO}_3|} \quad (7.6)$$

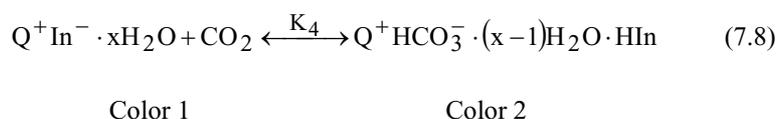
Si suponemos que K_1 y K_2 son muy pequeñas comparadas con K_3 , se sigue que la relación entre la concentración de CO_2 y la concentración de las dos especies principales

⁶ A. Mills, A. Lepre y L. Wild, Sens. Actuators B, 39, 419 (1997).

presentes, $Q^+In^- \cdot (x-1)H_2O \cdot H_2CO_3$; $Q^+HCO_3^- \cdot (x-1)H_2O \cdot HIn$, que son las que presentan diferente color, y por tanto diferente absorbancia, viene dada por la expresión:

$$\frac{|Q^+HCO_3^- \cdot (x-1)H_2O \cdot HIn|}{|Q^+In^- \cdot xH_2O|} = K_1K_2K_3|CO_2| \quad (7.7)$$

En estas condiciones se puede escribir el proceso global como:



Caracterizado por $K_4 = \frac{|Q^+HCO_3^- \cdot (x-1)H_2O \cdot HIn|}{|Q^+In^- \cdot xH_2O||CO_2|}$, donde $K_4 = K_1K_2K_3$

Si usamos la inversa de la constante anterior a la que denotaremos como A ($A=1/K_4$) y sustituimos $|Q^+In^- \cdot xH_2O|$ a partir de la concentración analítica de indicador C_o , cuya definición es: $C_o = |Q^+In^- \cdot xH_2O| + |Q^+HCO_3^- \cdot (x-1)H_2O \cdot HIn|$, resulta la ecuación:

$$|Q^+HCO_3^- \cdot (x-1)H_2O \cdot HIn| = \frac{C_o|CO_2|}{A + |CO_2|} \quad (7.9)$$

Esta ecuación indica que estos sensores deben dar una respuesta hiperbólica de la señal analítica (absorbancia, fluorescencia) con respecto al porcentaje de CO_2 , como se observa en la práctica^{6,1,7,8}.

⁷ B.H. Weigl y O.S. Wolfbeis, Anal.Chim. Acta, 302, 249 (1995).

La señal analítica será proporcional, a través de la constante de proporcionalidad K , a la concentración de $Q^+HCO_3^- \cdot (x-1)H_2O \cdot Hln$ y la expresaremos como una absorbancia relativa definida según:

$$\frac{A_o - A}{A_o - A_{100}} \quad (7.10)$$

donde A_o es la absorbancia en ausencia de CO_2 y que será máxima por medirse a una longitud de onda correspondiente a la forma desprotonada del indicador de pH, por su parte A_{100} será la absorbancia a un 100% de CO_2 (o a la concentración máxima ensayada) y presentará el valor mínimo de absorbancia y, por último, A es la absorbancia a la proporción ensayada.

Diremos que:

$$\frac{A_o - A}{A_o - A_{100}} = K \left| Q^+HCO_3^- \cdot (x-1)H_2O \cdot Hln \right| \quad (7.11)$$

Si ahora sustituimos de ecuación 7.9 resulta:

$$\frac{A_o - A}{A_o - A_{100}} = K \frac{C_o |CO_2|}{A + |CO_2|} \quad (7.12)$$

La inversa de esta ecuación nos permite un ajuste lineal:

$$\frac{A_o - A_{100}}{A_o - A} = \frac{1}{KC_o} + \frac{A}{KC_o} \cdot \frac{1}{|CO_2|} \quad (7.13)$$

⁸ A. Mills y Q. Chang, Analyst, 117, 1461 (1992).

Esta ecuación será la que utilizaremos para estudiar la respuesta de las membranas colorimétricas que desarrollaremos como paso previo a las membranas luminiscentes que son nuestro objetivo.

2.2. Indicadores de pH y polímeros.

Los indicadores ácido-base utilizados deben ser suficientemente lipofílicos para que sean solubles en el polímero y no sean lixiviados con facilidad, así ocurre con el Sudan III; aunque también se han utilizado indicadores convencionales solubles en agua a través de la presencia de grupos solubilizantes, como son los sulfónicos entre otros. En este caso, deben lipofilizarse mediante la formación de pares iónicos. En la siguiente Tabla 7.1 y 7.2 se recoge la estructura química, el pK_a y la longitud de onda habitual de medida y rango de aplicación en porcentaje de CO_2 de los indicadores más utilizados para la determinación de ese gas.

Entre ellos tenemos al rojo fenol⁶, cuyo pK_a es 7,52 y cuya respuesta no es muy sensible a CO_2 , pero su variación es rápida. En bibliografía se ha ofrecido como tiempo de respuesta $t_{90\downarrow} = 198$ ms, termostataado a 50°C, (t_{90} es el tiempo que tarda en alcanzar el 90% de la señal). Es aplicable en un rango de concentraciones que va desde 0 hasta un 50% de CO_2 y la longitud de onda de absorción de su forma básica es de 586 nm.

El púrpura de metacresol, tienen un pK_a de 8,28 y los tiempos de respuesta en este caso son: $t_{90\downarrow} = 28$ s y $t_{90\uparrow} = 70$ s en etilcelulosa, mientras que cuando se emplea como plastificante tributilfosfato, los tiempos de respuesta son $t_{90\downarrow} = 3$ s y $t_{90\uparrow} = 31$ s⁹.

El indicador mas utilizado para la determinación de dióxido de carbono en bibliografía ha sido el rojo cresol^{10,11} ($pK_a = 7,95$), cuyo espectro de absorción de su

⁹ A. Mills y M. Lela, *Analyst*, 121, 535 (1996).

¹⁰ B. Müller y P.C. Hauser, *Analyst*, 121, 339 (1996).

¹¹ F. Baldini, A. Falai, A.R. Gaudio, D. Landi, A. Lueger, A. Mencaglia, D. Scherr y W. Trettnak, *Sens. Actuators B*, 6887, 1 (2003).

forma básica muestra un máximo a 586 nm y que se puede aplicar para concentraciones de dióxido de carbono entre 0% y 15%.

Tabla 7.1 Indicadores de pH usados en sensores ópticos de CO₂

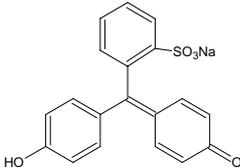
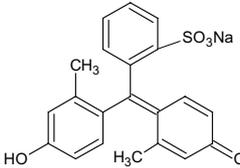
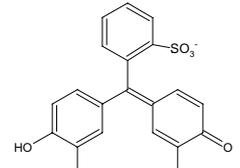
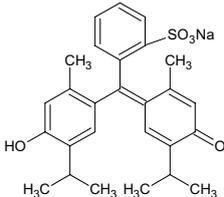
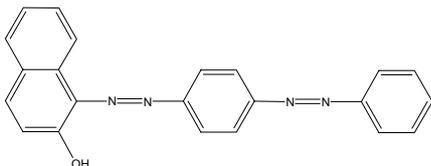
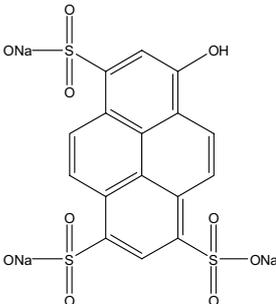
Indicadores	Estructura química	pKa	λ(nm)	rango(%)
Rojo fenol		7,52	586	0-50
Púrpura m-cresol		8,28	593	0-5
Rojo cresol		7,95	590	0-15
Azul de timol		8,8	612	0-3

Tabla 7.2 Indicadores de pH usados en sensores ópticos de CO₂

Indicadores	Estructura química	λ (nm)	rango(%)
Sudan III		580	0-100
HPTS		-	0-0,5

El azul de timol también ha sido usado como indicador en este tipo de sensores¹² ($pK_a = 8,8$), para un intervalo de concentraciones del 0% al 3% de CO₂. Por su parte, el Sudan III es un indicador empleado en sensores ópticos en la determinación por transferencia de energía de dióxido de carbono¹³. Se trata de un indicador lipofílico cuyo máximo de absorción de la forma aniónica se encuentra alrededor de 600 nm. El rango de aplicación llega hasta el 100% de CO₂.

¹² O.S. Wolfbeis, I. Klimant y G. Neurauder, Anal. Chim. Acta, 382, 67 (1999).

El ácido 8-hidroxi pireno-1,3,6-trisulfónico (HPTS) es el indicador fluorescente más usado en sensores ópticos de CO₂. En un trabajo⁵ reciente en el que se prepara un sensor de silicón con un límite de detección de 0,03% y un tiempo de respuesta y de recuperación de 0,66 y 1,94 min, respectivamente.

De todos estos indicadores, nosotros ensayamos aquellos cuyo espectro de absorción presenta solapamiento, en una de sus formas, con el espectro de emisión del complejo octaetilporfirina Pt(II); característica que sólo la cumple el azul de timol.

También hemos probado otros indicadores similares a este, y que presentan la característica buscada, como son el azul de bromotimol y el azul de bromofenol, cuyos valores de pK_a son 6,8 y 3,8, respectivamente.

Al objeto de poder introducirlos en una membrana sensora, que presenta carácter hidrófobo, es necesario lipofilizarlos, para ello se prepararon en forma de pares iónicos con compuestos de amonio cuaternario, en la forma descrita en el Capítulo 2.

Como vimos en la Introducción se han desarrollado para CO₂ distintos tipos de membranas basadas en diferentes polímeros. Para los sensores de membrana homogénea, que son los que pretendemos desarrollar en esta Memoria, los polímeros más usados son la etilcelulosa (EC)³, los poliuretanos¹⁴ y los materiales sol gel¹⁵. Por ello, se han seleccionado los anteriores materiales para su uso en este trabajo.

2.3. Preparación y caracterización de las membranas colorimétricas para CO₂

Para que responda la membrana sensora a CO₂, es necesario que el indicador presente se encuentre parcialmente en forma básica, esto es, que el equilibrio ácido-base

¹³ C. Bültzingslöwen, A.K. McEvoy, C. MacDonagh y B.D. MacCraith, *Anal. Chim. Acta.* 480, 275 (2003).

¹⁴ H. Soonkap, N. Alan, B. Monte y H. Henry, Patente EP0601816 (1994).

¹⁵ C. Malins y M.D. MacCraith, *Analyst*, 123, 2373 (1998).

del indicador esté desplazado en una cierta extensión, al objeto de que los protones procedentes de la disociación del ácido carbónico y, a su vez, de la hidratación del CO_2 , modifiquen suficientemente este equilibrio ácido-base y, por ende, el color del indicador. Con este objetivo se añade una base lipofílica como es el hidróxido de tetraoctil amonio (TOAOH), que es la que se seleccionó con este fin.

Se prepararon membranas conteniendo los indicadores de pH ya antes comentados: azul de bromotimol, azul de bromofenol y azul de timol, en diversas matrices poliméricas, que ordenadas de menor a mayor hidrofobicidad son: poliuretano tipo D-4, etilcelulosa, poliestireno y cloruro de polivinilo. En el caso de las membranas de poliestireno y PVC apenas se obtuvo respuesta a dióxido de carbono por lo que se desechó el uso de estos polímeros.

A continuación, se resume el estudio llevado a cabo para preparar y caracterizar las diferentes membranas sensoras fabricadas con etilcelulosa y poliuretano.

2.3.1. *Membranas sensoras de etilcelulosa*

Se prepararon membranas sensoras de etilcelulosa con cada uno de los indicadores ácido-base seleccionados, tal como se indica a continuación.

2.3.1.1. *Membranas con azul de bromotimol lipofilizado.*

A 1 mL de disolución de 0,5 g de etilcelulosa en 10 mL de una mezcla tolueno:etanol (80:20), le añadimos 320 μL de disolución de 4,4 mg de azul bromotimol lipofilizado disuelto en 2 mL de la misma mezcla tolueno:etanol (80:20) y conteniendo cantidades variables de hidróxido de trimetilhexadecil amonio; en concreto: 32, 52 y 72 μL . De esta forma se prepararon 3 cócteles (C1, C2 y C3) en los que la concentración de azul de bromotimol lipofilizado fue de $7,1 \times 10^{-4}$ mol/L y las concentraciones de base lipofílica fueron de $8,89 \times 10^{-3}$, $1,66 \times 10^{-2}$ y $2,01 \times 10^{-2}$ mol/L, respectivamente. El cociente r entre las concentraciones de base lipofílica y de indicador para los distintos cócteles fabricados es 12,5, 20,35 y 28,1, respectivamente. Con los cócteles fabricados se obtuvieron las membranas M1 a M3. Para ello, se depositaron 25 μL de cóctel sobre un

soporte de poliéster tipo Mylar utilizando el sistema rotatorio de velocidad de giro variable descrito en el Capítulo 2 y se guardaron dichas membranas en la oscuridad y en bolsas de plástico selladas hasta su utilización.

Tabla 7.3. Cócteles de azul de bromotimol

Cóctel	μL	[Base]	[Indicador]	r
C1	32	$8,89 \cdot 10^{-3}$	$7,10 \cdot 10^{-4}$	12,5
C2	52	$1,66 \cdot 10^{-2}$	$7,10 \cdot 10^{-4}$	20,3
C3	72	$2,01 \cdot 10^{-2}$	$7,10 \cdot 10^{-4}$	28,1

La respuesta de estas membranas a dióxido de carbono fue medida con el espectrofotómetro de diodos Hewlett Packard HP-8453. El espectro de absorción de estas membranas (Figura 7.1) muestran los máximos de absorción centrados a 395 y 635 nm. La respuesta que muestran estas membranas a las variaciones de concentración de CO_2 medidas a 635 nm, así como las variaciones máximas de señal (ΔA) producidas por cada una de las membranas se recogen en la Tabla 7.4.

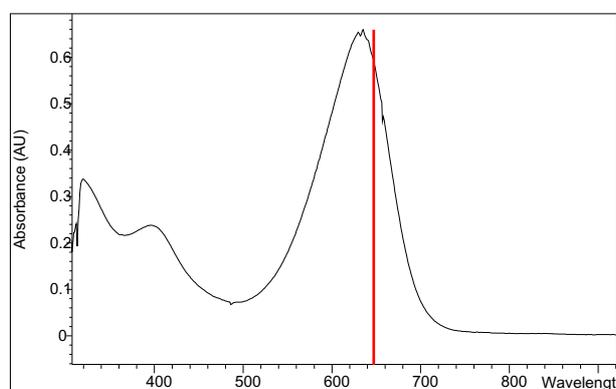


Figura 7.1. Espectro de absorción de azul de bromotimol lipofilizado en etilcelulosa.

CO ₂ (%)	Membrana		
	M1	M2	M3
0	0,321	1,162	1,455
100	0,253	1,093	1,4293
ΔA	0,068	0,069	0,026

Tabla 7.4. Respuesta de las membranas de azul de bromotimol en etilcelulosa.

Como vemos las membranas preparadas muestran poca variación de señal desde un 0 a un 100% de CO₂. Estas membranas presentan escasa variación con el CO₂. Se seleccionó de todas formas la membrana M2 que presenta la mayor variación de señal y mayor absorción que la M1. Esta membrana se estudió bajo diferentes concentraciones de CO₂ (Tabla 7.5), observando que la variación es pequeña y casi lineal (Figura 7.2), con un valor de pendiente es de 0,0007, valor muy pequeño, lo que supone que esta membrana es muy poco sensible para la determinación colorimétrica de dióxido de carbono.

CO ₂ (%)	A	$A_0 - A_{100} / A_0 - A$
0	1,162	-
2	1,159	25,48
4	1,157	14,64
6	1,155	10,27
10	1,152	6,81
20	1,145	4,05
30	1,139	3,04
50	1,129	2,15
100	1,093	1,00

Tabla 7.5. Valores obtenidos para la membrana de azul de bromotimol en etilcelulosa para CO₂.

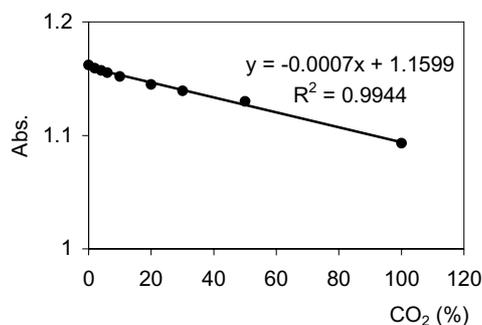


Figura 7.2. Membrana de azul de bromotimol para CO₂. Variación de absorbancia con la concentración.

Si usamos el modelo planteado para la linealización de resultados en membranas colorimétricas (ecuación 7.13) se obtiene la Figura 7.3, obteniéndose una relación lineal, como es evidente, cuya ecuación es $y = 48,022x + 1,911$, r^2 de 0,997.

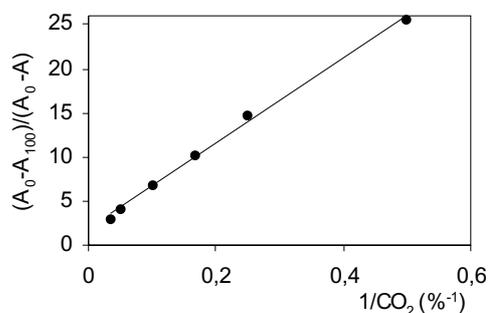


Figura 7.3. Membrana de azul de bromotimol para CO_2 . Ajuste lineal.

2.3.1.2. Membranas con azul de timol lipofilizado

Las membranas de azul de timol lipofilizado se prepararon de forma análoga, de manera que preparamos 10 cócteles (C1-C10) que contenían: $7,1 \times 10^{-4}$ mol/L de azul de timol lipofilizado y diferentes cantidades de hidróxido de trimetil hexadecil amonio (15, 45, 60, 80, 100, 115, 130, 150, 175 y 200 μL). En la Tabla 7.6 se indica la composición de los diferentes cócteles y la relación base /indicador usada en cada caso. Con estos cócteles se prepararon las membranas M1 a M10. El espectro de absorción del azul de timol lipofilizado en membranas de etilcelulosa muestra una banda de absorción a 612 nm (Figura 7.4).

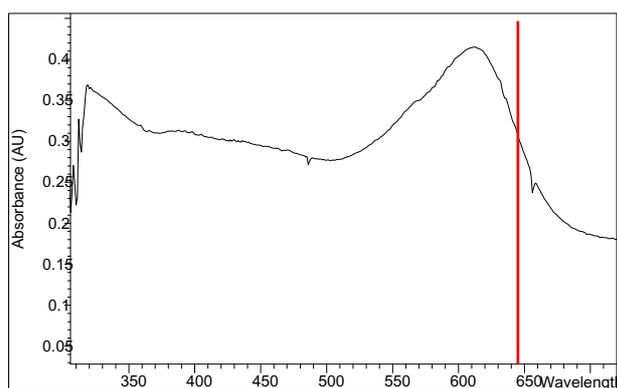


Figura 7.4. Espectro de absorción de azul de timol lipofilizado en EC.

En la Tabla 7.7 se recoge la respuesta absorciométrica para CO₂ de las diferentes membranas de azul de timol lipofilizado en etilcelulosa preparadas. Para el caso de las membranas M1 y M2, el cóctel queda de color amarillo, color de la forma ácida del indicador, por lo que no pueden usarse.

Tabla 7.6. Composición de los cócteles con azul de timol.

Cóctel	μL	[Base]	[Indicador]	r
C1	15	4,17·10 ⁻³	7,10·10 ⁻⁴	5,9
C2	45	1,25·10 ⁻²	7,10·10 ⁻⁴	17,6
C3	60	1,55x10 ⁻²	7,10·10 ⁻⁴	23,4
C4	80	2,22x10 ⁻²	7,10·10 ⁻⁴	31,3
C5	100	2,77x10 ⁻²	7,10·10 ⁻⁴	39,0
C6	115	3,19x10 ⁻²	7,10·10 ⁻⁴	45,0
C7	130	3,61x10 ⁻²	7,10·10 ⁻⁴	50,9
C8	150	4,17x10 ⁻²	7,10·10 ⁻⁴	58,7
C9	175	4,86x10 ⁻²	7,10·10 ⁻⁴	68,5
C10	200	5,56x10 ⁻²	7,10·10 ⁻⁴	78,3

Los mejores resultados en cuanto a la variación de absorbancia (ΔA) han sido obtenidos para la membrana M7, por lo que se usó esa membrana para realizar un calibrado (Tabla 7.8). Se observa, como era de esperar, una disminución de absorbancia exponencial en el rango de concentraciones desde 0 hasta 100 % de CO₂ (Figura 7.9), al igual que ha sido descrito para otros sensores de CO₂ de este tipo³⁻⁶, linealizando la respuesta en la forma antes indicada obteniendo la ecuación $y = 1.420x + 1.043$ con $r^2 = 0.979$ (Figura 7.10).

Tabla 7.7. Membrana de azul de timol lipofilizado para CO₂. Variación de absorbancia con la concentración.

CO ₂ (%)	Membrana					
	M3	M4	M5	M7	M8	M9
0	0,376	0,458	0,443	0,725	0,501	0,579
1,9	0,353	0,421	0,392	0,534	0,403	0,533
4,0	-	0,414	0,371	0,511	0,376	0,512
10,0	0,338	0,410	0,361	0,496	-	0,498
ΔA	0,039	0,048	0,082	0,229	0,125	0,081

Tabla 7.8. Calibrado con azul de timol en etilcelulosa (M7).

CO ₂ %	A	$A_0 - A_{100} / A_0 - A$
0	1,236	-
2	0,606	1,73
4	0,475	1,43
10	0,349	1,23
30	0,259	1,11
50	0,203	1,05
100	0,147	1,00

Figura 7.10. Membrana M7 de azul de timol lipofilizado. Ajuste lineal

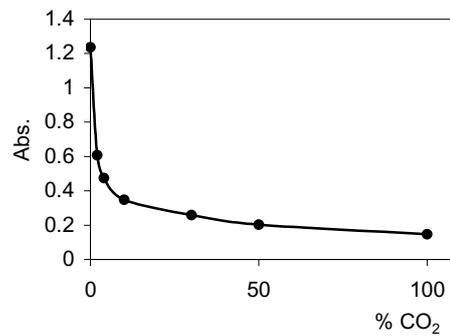
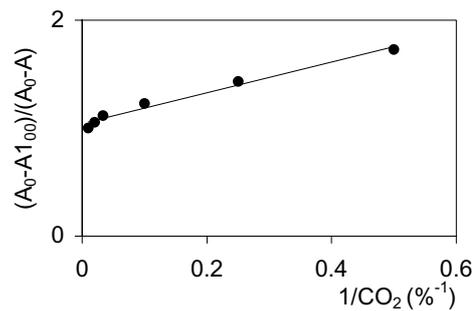


Figura 7.9. Membrana M7 de azul de timol lipofilizado. Variación de absorbancia con la concentración



Si este calibrado lo realizamos para menores porcentajes de CO_2 , se obtiene una relación lineal hasta el 0,2% (Tabla 7.9 y Figura 7.11), de acuerdo con la ecuación $y = 0,257x - 0,975$ ($r^2 = 0,935$), expresada en la forma lineal en la Figura 7.12.

Tabla 7.9. Calibrado con la membrana M7 de azul de timol en etilcelulosa.

$\text{CO}_2\%$	Abs.	$A_0 - A_{100}/A_0 - A$
0	0,484	-
0,02	0,481	13,441
0,03	0,477	6,093
0,04	0,473	4,117
0,06	0,468	2,892
0,08	0,464	2,240
0,10	0,459	1,858
0,16	0,449	1,306
0,20	0,439	1,000

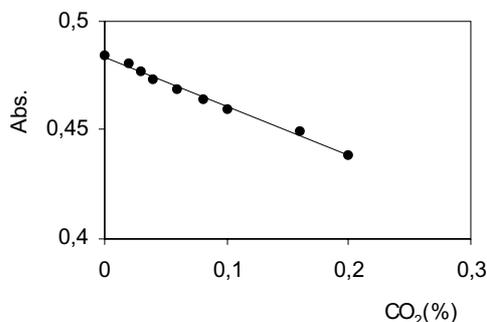


Figura 7.11. Membrana M7 de azul de timol lipofilizado. Variación de absorbancia con la concentración.

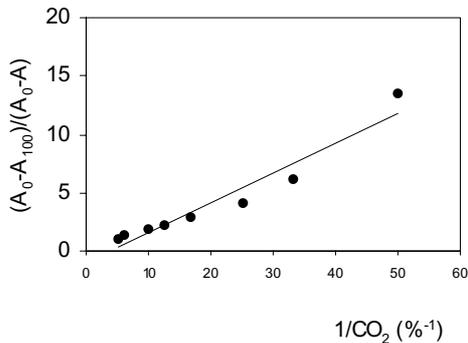


Figura 7.12. Membrana M7 de azul de timol lipofilizado. Ajuste lineal.

2.3.1.3. Membranas con azul de bromofenol lipofilizado

De manera análoga a las membranas anteriormente preparadas, se fabricaron membranas conteniendo el indicador azul de bromofenol lipofilizado. El espectro de absorción de estas membranas (Figura 7.13) muestra un máximo de absorción centrado en 605 nm. Con estas membranas no se observó variación de señal con el CO_2 , como por

otra parte, era de esperar debido al bajo valor de pKa del azul de bromofenol, por lo que se desechó su uso.

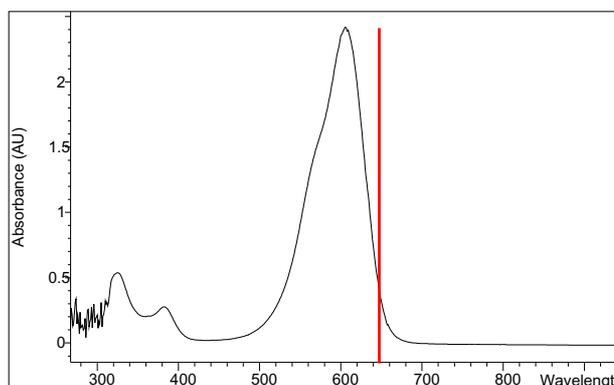


Figura 7.13. Espectro de absorción de membranas azul de bromofenol lipofilizado en etilcelulosa.

2.3.2. Membranas sensoras de poliuretano D4

Otro de los polímeros usados para la fabricación de las membranas colorimétricas fue poliuretano D4. En este caso sólo se ensayó con azul de timol, ya que en las anteriores experimentos demostraron que los otros dos indicadores ácido-base no respondían adecuadamente a cambios de concentración de CO_2 al no tener valores de pKa adecuados.

Para la preparación de estas membranas se disolvieron 120 mg de poliuretano D4 en 2 mL de una mezcla agua:etanol del 10% (disolución 1). A continuación, se pesaron 4,4 mg de par iónico de azul de timol que se disolvieron en 2 ml de tolueno:etanol 80:20 (disolución 2). A 1 mL de disolución 1 le añadimos 320 μL de la disolución 2 y cantidades variables de hidróxido de trimetilhexadecil amonio (10, 20, 60, 90, 160 y 220 μL) con lo que obtuvimos los cócteles C1 a C6; cuyas concentraciones se recogen en la Tabla 7.10. Con estos cócteles fabricamos, al igual que en los casos anteriores, las membranas M1 a M6.

Tabla 7.10. Composición de los cócteles con azul de timol en D4.

Cóctel	μL	[Base]	[Indicador]	r
C1	10	$2,78 \cdot 10^{-3}$	$7,10 \cdot 10^{-4}$	3,9
C2	20	$5,56 \cdot 10^{-3}$	$7,10 \cdot 10^{-4}$	7,8
C3	60	$1,67 \cdot 10^{-2}$	$7,10 \cdot 10^{-4}$	23,5
C4	90	$2,50 \cdot 10^{-2}$	$7,10 \cdot 10^{-4}$	35,2
C5	160	$4,45 \cdot 10^{-2}$	$7,10 \cdot 10^{-4}$	62,6
C6	220	$6,11 \cdot 10^{-2}$	$7,10 \cdot 10^{-4}$	86,1

Tabla 7.11. Respuestas de las membranas de azul de timol en D4.

CO_2 (%)	Membrana					
	M1	M2	M3	M4	M5	M6
0	0,354	0,2096	0,562	0,483	0,616	0,441
2,4	0,364	0,222	0,551	0,414	0,566	0,374
5	0,1465	0,078	0,265	0,102	0,103	0,123
ΔA	0,207	0,132	0,297	0,381	0,513	0,318

En la Tabla 7.11 se recoge la respuesta absorciométrica para CO_2 de las membranas preparadas conteniendo azul de timol en poliuretano. La máxima variación de señal por la presencia de CO_2 (Figura 7.14) la muestra la membrana M5, que usa una relación base/azul de timol de 62,6 y que, por tanto, se eligió como membrana de trabajo.

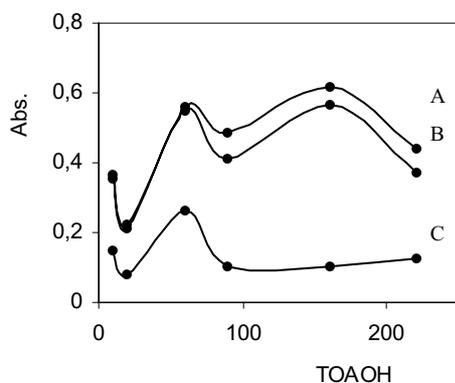


Figura 7.14 Valores de A de las membranas M1-M6 (con diferentes cantidades de TOAOH) bajo diferentes concentraciones: A) 100% nitrógeno; B) 2,4 de CO₂ y C) 5% de CO₂

Una vez seleccionada la composición óptima de estas membranas sensoras se procedió a la caracterización de su respuesta frente a CO₂. En la Figura 7.15 se muestra el espectro de absorción de la membrana M5 de azul de timol lipofilizado en poliuretano D-4 (máximo a 620 nm) y su variación con el porcentaje de CO₂.

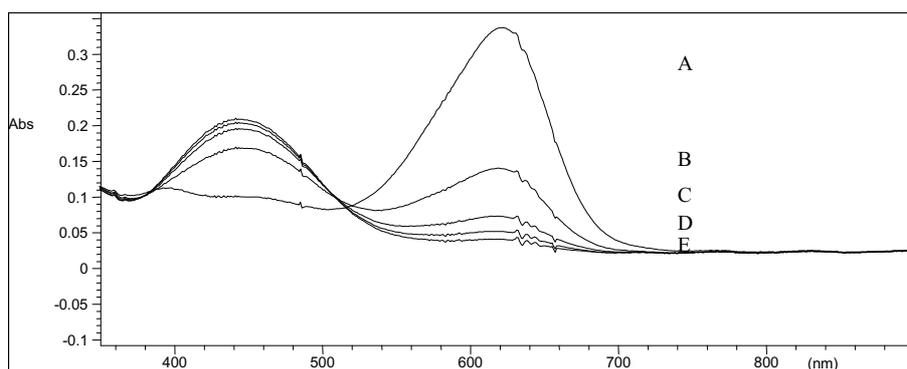


Figura 7.15 Espectro de absorción para la membrana M-5 sensora de azul de timol en D-4 expuesta a diferentes concentraciones de CO₂: A) 0%; B) 1,9%; C) 2,4%; D) 5% y E) 10%.

La variación de absorbancia para esa membrana M-5 muestra el mismo comportamiento (Tabla 7.12 y Figura 7.16) que otras ya vistas previamente y que se pueden linealizar usando el mismo modelo (Figura 7.17). $y = 1,1292x + 0,9851$ $r^2 = 0,7413$.

Tabla 7.12. Valores obtenidos para la membrana M5 de azul de timol en etilcelulosa para CO₂

CO ₂ %	A	$A_0 - A_{100} / A_0 - A$
0	0,337	-
1,9	0,140	1,711
2,4	0,073	1,277
5	0,060	1,219
10	0,041	1,138

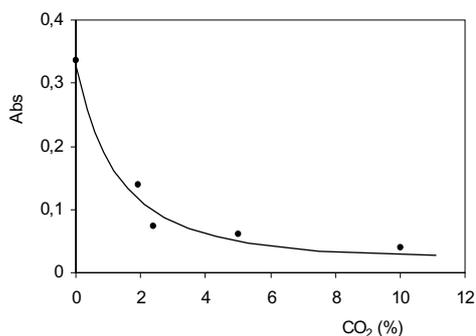


Figura 7.16. Membrana M5 de azul de timol lipofilizado. Variación de absorbancia con la concentración.

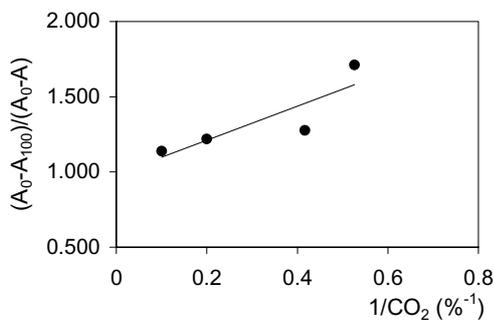


Figura 7.17. Membrana M5 de azul de timol lipofilizado. Modelo lineal.

2.3.3. Membranas sensoras de material sol gel

También se ensayó el empleo de materiales sol gel como polímero de membrana, siguiendo un procedimiento similar al empleado por Wolfbeis *et al.*¹⁶ utilizando metil trietoxisilano (MTEOS) como producto de partida. Para ello, a 4 mL de MTEOS se añadieron 1,45 mL de ácido clorhídrico 0,1N y agitó durante dos horas en agitador

¹⁶ C. Bültzingslöwen, A.K. McEvoy, C. McDonagh, B.D. MacCraith, I. Klimant, C. Krause y O.S. Wolfbeis, *Analyst*, 127, 1478 (2002).

magnético para mezclar las dos fases e iniciar la reacción de condensación. Para la preparación del cóctel se añadieron a 2 mL de esta disolución, 0,2mL de TOAOH y 0,5 ml de disolución de azul de timol lipofilizado en etanol (2,2 mg en 1mL de etanol). Para la preparación de la membrana se usaron 30 μ L de cóctel en un soporte. En este caso utilizamos como soporte tanto el poliéster tipo Mylar usado en anteriores membranas, como láminas de vidrio de 0,2 mm de espesor. Para que la gota se adhiriera bien a la lámina fue necesario activar los grupos silanol de la superficie del vidrio, mediante un procedimiento estándar con ácido nítrico concentrado durante 12 horas y posterior lavado con agua destilada y etanol, seguido de un secado a 100°C durante 1 hora.

De las diferentes pruebas realizadas utilizando sol gel no hemos conseguido preparar membranas que respondieran mínimamente a cambios en la concentración de CO₂ por lo que se desechó la posibilidad del uso de este material con el luminóforo para el desarrollo de sensores para este gas.

Tabla 7.13. Comparación de membranas colorimétricas

Polímero	Indicador	ΔA (0-10%)	Exponencial	Linealización (b)
EC	Bromotimol	0,069*	no	48,022
EC	Timol	0,229	si	1,420
EC	Fenol	-	no	-
D4	Timol	0,513	si	1,129

*en este caso ΔA va desde 0 a 100% de CO₂.

En la Tabla 7.13 comparamos los resultados obtenidos para las distintas membranas colorimétricas según el polímero formador de membrana y el indicador lipofílico utilizado. Representamos la variación de absorbancia (ΔA) entre 0 y 10% de CO₂ e indicamos si la dependencia de la absorbancia con la concentración de CO₂ es lineal, como indica la bibliografía, o no sigue comportamiento lineal; también se indica el valor de la pendiente de la ecuación obtenida siguiendo el modelo de linealización para este tipo de membranas. De los indicadores utilizados sólo el azul de timol lipofilizado

responde a dióxido de carbono siguiendo el comportamiento que predice la bibliografía, tanto para las membranas con D4 como para las de EC.

3. Preparación y caracterización de membranas para CO₂ conteniendo luminóforo interno

En este apartado se resumen algunos de los estudios realizados para el desarrollo de sensores ópticos de CO₂ basados en medidas de luminiscencia por combinación de cambios colorimétricos de un indicador de pH y un luminóforo interno.

3.1. Esquema químico

La adición de un luminóforo a la membrana que no presente propiedades ácido-base, puede permitir el uso de medidas de luminiscencia que respondan a variaciones en la concentración de CO₂ ambiente. Esto puede ocurrir por dos mecanismos diferentes: 1) que una de las formas del indicador ácido-base actúe como filtro de la radiación luminiscente (fluorescencia o fosforescencia) emitida por el luminóforo inerte; 2) que ocurra una transferencia de energía sin emisión fotónica desde el luminóforo (donor) a una de las formas del indicador ácido-base (aceptor). Cada uno de estos mecanismos tiene sus requerimientos y dependiendo de las condiciones actuará, o predominará, uno de ellos.

3.1.1. Sensores luminiscentes basados en filtro interno

La presencia de especies que absorban radiación luminiscente originada por la excitación de un luminóforo, dará como resultado una disminución del número de fotones que alcanzan el detector del luminómetro. En consecuencia, la presencia en una membrana, junto con un indicador ácido-base en condiciones tales que responda a la concentración de CO₂, de un luminóforo inerte cuyo espectro de emisión solape con el de absorción de una de las formas de este indicador, originará una señal luminiscente que dependerá del CO₂ presente, de acuerdo con la ecuación 7.9 ya vista.

$$\left| \text{Q}^+ \text{HCO}_3^- \cdot (x-1) \text{H}_2\text{O} \cdot \text{HIn} \right| = \frac{C_o |\text{CO}_2|}{A + |\text{CO}_2|}$$

El conjunto de reacciones que ocurren para originar la respuesta es exactamente el mismo que el anteriormente comentado para membranas colorimétricas, con la salvedad de que la señal que ahora se mide, en lugar de ser la absorbancia de la membrana es la intensidad de luminiscencia de la misma. En consecuencia, la ecuación 7.9 se cumplirá también aquí. No obstante, en este caso, la señal analítica será una señal relativa de luminiscencia relacionada con la especie $\text{Q}^+ \text{HCO}_3^- \cdot (x-1) \text{H}_2\text{O} \cdot \text{HIn}$, en concreto: $I - I_o / I_{100} - I_o$, pues ahora la luminiscencia máxima se origina cuando la concentración de CO_2 es máxima (I_{100}), ya que todo el indicador estará en forma protonada y no ocurrirá filtro interno. Consecuentemente, será mínima cuando no exista CO_2 en el medio (I_o).

Como antes, diremos que:

$$\frac{I - I_o}{I_{100} - I_o} = K \left| \text{Q}^+ \text{HCO}_3^- \cdot (x-1) \text{H}_2\text{O} \cdot \text{HIn} \right| \quad (7.14)$$

Si ahora sustituimos en la ecuación 7.9 resulta:

$$\frac{I - I_o}{I_{100} - I_o} = K \frac{C_o |\text{CO}_2|}{A + |\text{CO}_2|} \quad (7.15)$$

Al igual que para las membranas colorimétricas antes comentadas, esta ecuación nos señala que estos sensores deben dar también una variación hiperbólica de la señal analítica (variación de fluorescencia por filtro interno) con respecto al porcentaje de CO_2 , como han descrito algunos autores^{17,2,6,1}.

La inversa de esta ecuación nos permite un ajuste lineal para el caso en que se de exclusivamente o predomine el proceso de filtro interno:

$$\frac{I_{100} - I_0}{I - I_0} = \frac{1}{KC_0} + \frac{A}{KC_0} \cdot \frac{1}{|CO_2|} \quad (7.16)$$

3.1.2. *Sensores luminiscentes basados en transferencia de energía de resonancia*

La luminiscencia por transferencia de energía de resonancia (RET) es debida a una interacción entre los estados electrónicos excitados de dos moléculas, en las que la energía de excitación es trasferida de una molécula donora a una aceptora sin emisión de fotones. La eficiencia de RET depende de la distancia entre las moléculas donora y aceptora.

Para que se dé luminiscencia por transferencia de energía de resonancia se deben usar dos luminóforos o bien un luminóforo y un colorante, donde el aceptor luminóforo A o bien el aceptor colorante A atenúa la fluorescencia del donor fluoróforo o fosforóforo D. En el caso de que A sea un colorante cuyo espectro solape con el de emisión del fluoróforo o del fosforóforo D y si las dos moléculas A y D están próximas, la emisión del luminóforo D disminuirá como consecuencia de la transferencia de energía de fluoróforo al colorante, disminuyendo, en consecuencia, la emisión luminiscente de aquel.

Deben darse tres condiciones para que ocurra luminiscencia por transferencia de energía de resonancia:

1. D y A deben estar cerca ($\sim 10\text{--}100 \text{ \AA}$).
2. La orientación de los dipolos de ambas moléculas debe ser aproximadamente paralela.
3. El espectro de emisión del donor D debe solapar con el espectro de absorción de A.

El porcentaje de transferencia de energía de resonancia viene definido por la ecuación de Förster:

$$kT = (R_0/R)^6/\tau_D \quad (7.17)$$

Donde kT es el porcentaje de transferencia, R_0 es el radio de Förster, R es la distancia que separa a los fluoróforos y τ_D es el tiempo de decaimiento del donador. Por otra parte, R_0 , es definido como la distancia a la cual la eficiencia de la transferencia es del 50% (eficiencia = $R_0^6/(R_0^6+R^6)$). El porcentaje de transferencia será igual al porcentaje de decaimiento. El radio de Förster depende de varios factores como son: factor de orientación κ^2 ; rendimiento cuántico de luminiscencia del donador ϕ_D ; grado de solapamiento del espectro $J(\lambda)$ y del índice de refracción del medio n , según:

$$R_0^6 = 8,785 \times 10^{-5} (\kappa^2 \phi_D J(\lambda))/n^4 \quad (7.18)$$

κ^2 es igual a 4 para dipolos de transición paralelos, 0 para transiciones orientadas perpendicularmente y 2/3 para orientaciones aleatorias.

Como consecuencia del proceso RET se observara una disminución tanto de la intensidad de luminiscencia como del tiempo de vida del luminóforo. Señales ambas, intensidad o tiempo de vida, que se pueden utilizar para obtener las funciones de calibrado para membranas basadas en este mecanismo.

Para establecer la función de calibrado en membranas de este tipo³, hay que tener en cuenta que las medidas de intensidad de luminiscencia o tiempo de vida se relacionan solo con la concentración de la forma desprotonada del indicador en la membrana, $Q^+In^- \cdot xH_2O$. Así, el tiempo de decaimiento es un parámetro que refleja la concentración de la forma desprotonada del indicador.

El cociente t_{max}/t puede expresarse como:

$$\frac{t_{max}}{t} = \frac{K_F + K_{ET}}{K_F} \quad (7.19)$$

donde K_{ET} es el porcentaje de transferencia de energía, K_F es el porcentaje de todas las demás desactivaciones incluyendo la fluorescencia y t_{max} es el tiempo de decaimiento cuando el indicador se encuentra protonado y no hay transferencia de energía, lo que ocurrirá a altas concentraciones de CO_2 .

De la ecuación de Förster se sabe que el porcentaje de transferencia de energía K_{ET} es proporcional a la integral de solapamiento J . Como el espectro de absorción del indicador protonado no solapa con la emisión luminiscente, entonces la integral de solapamiento J será proporcional a la cantidad de indicador desprotonado en membrana $|Q^+In^- \cdot xH_2O|$. Por otra parte, para una membrana de composición definida K_F es constante e independiente de la proporción de CO_2 , con lo que se puede afirmar:

$$\frac{\tau_{max}}{\tau} - 1 \cong \frac{K_{ET}}{K_F} \cong J \cong |Q^+In^- \cdot xH_2O| \quad (7.20)$$

Este modelo corresponde, a efectos prácticos, a una situación de atenuación dinámica de luminiscencia como las descritas por la ecuación de Stern-Volmer. Como la relación de concentraciones de forma protonada y desprotonada del indicador es proporcional a la presión parcial de CO_2 en fase gas y, por tanto, a su concentración, podemos escribir:

$$\frac{C_o - |Q^+In^- \cdot xH_2O|}{|Q^+In^- \cdot xH_2O|} = K[CO_2] \quad (7.21)$$

si usamos la concentración analítica de indicador C antes definida. Si ahora combinamos las ecuaciones 7.20 y 7.21 resulta una función lineal de los datos de tiempo de decaimiento con con concentración de CO_2 .

$$\frac{[(t_{max}/t_0) - 1] - [(t_{max}/t) - 1]}{[(t_{max}/t) - 1]} = R = K[CO_2] \quad (7.22)$$

donde t_0 es el tiempo de decaimiento medido en ausencia de CO_2 .

En el caso de hacer el calibrado con intensidades de fluorescencia resultaría una ecuación similar:

$$\frac{[(I_{\max}/I_0) - 1] - [(I_{\max}/I) - 1]}{[(I_{\max}/I) - 1]} = R = K[\text{CO}_2] \quad (7.23)$$

donde I_0 será la intensidad de fosforescencia medida en ausencia de CO_2 .

3.2. Tipos de sensores desarrollados

Nuestro objetivo es el desarrollo de membranas sensoras que, mediante transferencia de energía o mediante filtro interno, respondieran a CO_2 y que pudiesen ser combinadas con la instrumentación portátil previamente desarrollada. Para ello, se prepararon una serie de membranas en las que se utilizó azul de timol lipofilizado como indicador de pH y octaetilporfirina Pt(II) como luminóforo. Este luminóforo es el mismo que anteriormente se había usado para la medida óptica de oxígeno. Como vimos el complejo PtOEP emite fosforescencia a 645 nm y el azul de timol lipofilizado en su forma desprotonada (azul) solapa con dicho espectro de emisión del luminóforo (Figura 7.18).

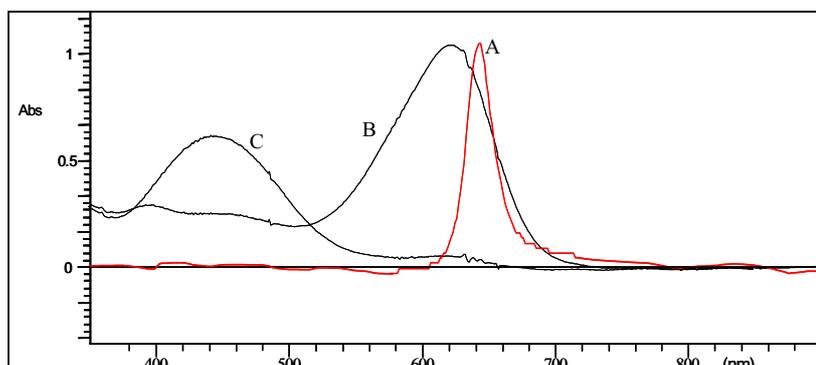


Figura 7.18. Espectro de emisión de PtOEP (A) y de absorción del azul de timol a un 10% (B) y a 0% de CO_2 (C) demostrando la superposición de donador y receptor en su forma aniónica.

Se estudiaron tres tipos de membranas diferentes: 1) membranas que contienen tanto el luminóforo como el indicador de pH; 2) superposición de una membrana sensible CO₂ sobre otra que contiene el luminóforo y 3) cuando el luminóforo y indicador se encuentran en una misma membrana pero con la salvedad de que el luminóforo se encuentra atrapado en nanopartículas de un determinado material polimérico.

3.3. Membranas conteniendo donador y aceptor

La preparación de membranas que simultáneamente contienen el luminóforo y el indicador ácido-base (Figura 7.19). no es sencilla por el diferente carácter lipofílico que muestran y, en consecuencia, la diferente solubilidad en disolventes orgánicos. Como polímeros se ensayaron los poliuretanos D4 y D6 y la etilcelulosa (EC). El poliuretano presenta problemas pues no permite disolver al complejo octaetilporfirina Pt(II) en el medio hidroalcohólico que usa, razón por la cual fue descartado su uso.

3.3.1. Membranas de etilcelulosa.

Con el empleo de etilcelulosa es posible la preparación de membranas, aunque en ningún caso muestran fosforescencia, sino fluorescencia, posiblemente debido a una atenuación por la utilización de un medio con ciertas características hidrofílicas, como es el caso.



Figura 7.19. Membrana con donador y aceptor.

Para la preparación de membranas de etilcelulosa se añaden a 1 mL de disolución de 0,5 g de etilcelulosa en 10 mL de una mezcla tolueno:etanol 80:20 v/v le añadimos 320 µL de disolución de 4,4 mg de azul timol lipofilizado disuelto en 2 mL del mismo disolvente tolueno:etanol (80:20), así como 0,5 mg de PtOEP y 52 µL de hidróxido de tetraoctil amonio 0,37 M.

Se comprobó en primer lugar que estas membranas no muestran fosforescencia, aunque sí fluorescencia. Por

ello, se estudio la variación de fluorescencia con el porcentaje de CO₂, en ausencia de oxígeno, con un espectrofluorímetro de sobremesa (Cary Eclipse) (Tabla 7.14 y Figura 7.20).

El mecanismo de disminución de la señal fluorescente con el porcentaje de CO₂, no es evidente, pues tanto podría ser filtro interno como RET y en el momento de la realización de este estudio no se disponía en nuestro Grupo de Investigación de un espectrómetro de luminiscencia que nos permitiera medir tiempos de vida de fluorescencia, al objeto de poder dilucidar la cuestión. Por ello, se trató de ajustar los datos experimentales obtenidos con las ecuaciones antes discutidas tanto para filtro interno (ecuación 7.13) como para RET (ecuación 7.23).

CO ₂ (%)	I _r	R	I ₀ -I ₁₀₀ /I ₀ -I
0,00	243	0,00	
0,02	262	0,16	13,95
0,03	287	0,42	6,02
0,04	333	1,08	2,94
0,06	361	1,68	2,25
0,08	384	2,38	1,88
0,10	388	2,53	1,83
0,20	427	4,75	1,44
0,40	461	9,70	1,22
0,50	484	20,99	1,10
1,00	508	-	1,00

Tabla 7.14. Variación de fluorescencia con el porcentaje de CO₂ para membranas de etilcelulosa.

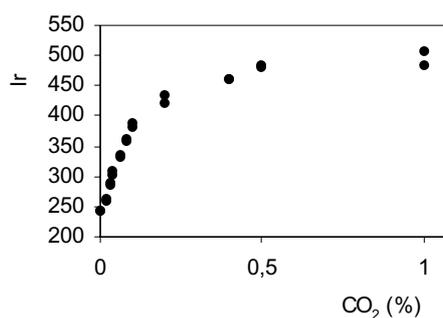


Figura 7.20. Variación de fluorescencia con el porcentaje de CO₂ para membranas de etilcelulosa.

En el caso de usar la ecuación para filtro interno (Figura 7.21) se obtiene la ecuación $y = 0,117x + 0,84$ ($r^2 = 0,982$) como el último en la figura se sale de la linealidad

decimos que el límite inferior del rango para el caso del calibrado con filtro interno es de 0,04 %. En el caso de RET (Figura 7.22) la función obtenida es $y = 24,3x + 0,0198$ ($r^2 = 0,994$) y lineal sólo hasta el 0,4% de CO_2 . Si se observan esas dos figuras parece sugerirse como mecanismo de respuesta para la membrana preparada, un proceso de transferencia de energía que da mejor ajuste lineal, mecanismo por otra parte, que es coherente con el tipo de membrana preparada en la que coexisten moléculas de donador y aceptor en la misma. El rango en el que es lineal el calibrado tanto por RET como por filtro interno se indicará más adelante en las Tablas 7.27 y 7.28 para todas las membranas ensayadas.

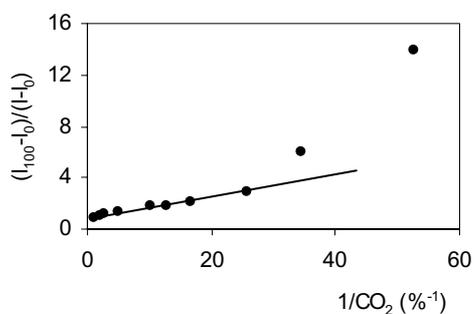


Figura 7.21. Ajuste al modelo de filtro interno.

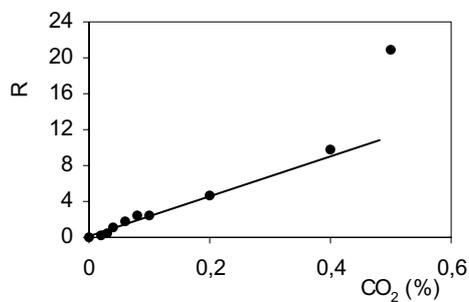


Figura 7.22. Ajuste al modelo RET.

Es posible, en consecuencia, la fabricación de membranas de etilcelulosa que respondan a CO_2 midiendo fluorescencia. Si embargo, en esta Memoria se persigue el desarrollo de instrumentación portátil para la medida de CO_2 basada en la medida de fosforescencia, razón por la cual hay que descartar estas membranas.

3.4. Membranas dobles de donor y receptor.



Figura 7.23.
Membrana doble
de donador y
receptor

Para intentar solventar este problema y lograr membranas fosforescentes se ensayaron membranas en las que donador y receptor estuvieran separados y situados cada uno en una cara diferente del soporte de Mylar (Figura 7.23). Existen en la bibliografía trabajos recientes para CO_2 en los cuales se usa esta idea de la doble membrana conteniendo en ese caso α -naftolftaleina como indicador y tetrafenilporfirina como fluoróforo y al que denominan indicador de referencia¹.

La membrana usada de azul de timol lipofilizado en etilcelulosa fue del tipo que denominamos páginas atrás T7 y los resultados que se obtuvieron con el prototipo P02, se recogen en la Tabla 7.15 y Figura 7.24. Observamos que la sensibilidad que muestra este tipo de membrana doble es pequeña, por lo que no se continuó profundizando en este planteamiento.

Tabla 7.15. Membrana doble de azul de timol lipofilizado y PtOEP. Variación de señal en P02 con % de CO_2 .

$\text{CO}_2(\%)$	Señal
0	38.867
1,9	59.773
4,0	62.331
8,0	63.579
12,0	70.006
20,0	71.031

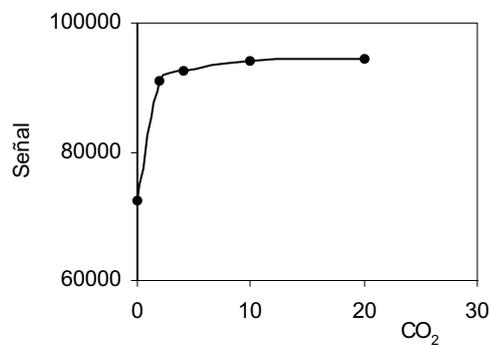


Figura 7.24. Membrana doble de azul de timol lipofilizado y PtOEP. Variación de señal en P02 con CO_2

3.5. Membranas bicapa de donador y aceptor.

Otra forma estudiada para lograr membranas fosforescentes con mejores propiedades es usar membranas bicapa, superponiendo dos membranas, una sensible a CO_2 y otra conteniendo el luminóforo (Figura 7.25). De esta manera la distancia entre membranas será menor lo que posibilita el sentido de CO_2 .



Figura 7.25.
Membrana bicapa
de donador y aceptor.

Se trató de preparar membranas de etilcelulosa con azul de timol lipofilizado sobre otra de poliestireno sensible a oxígeno, pero no se obtuvo respuesta alguna a CO_2 . Probablemente el problema esté relacionado con que el disolvente empleado para disolver la etilcelulosa, tolueno, disuelve parcialmente la membrana previa de poliestireno. Ello justificaría el mal aspecto y comportamiento de las membranas.

Posteriormente, se utilizó poliuretano tipo D-4 como material de membrana para preparar la segunda capa sensible a dióxido de carbono. En esta ocasión, al ser el disolvente una mezcla de etanol:agua, no se encontró problemas de disolución de componentes de la capa inferior.

La preparación de la doble membrana sensora de PS y D-4 se hizo en dos pasos, en el primero se formó la membrana sensora que contiene el luminóforo, esto se realizó de la misma forma que en el caso de la membrana sensible a oxígeno indicada en el Capítulo 5 de esta Memoria. Una vez seca se deposita una segunda capa de 25 μL del cóctel descrito anteriormente en el apartado 2.4.2 de este capítulo, para la membrana sensora M4 de azul de timol lipofilizado en D4.

3.5.1. Espectro de emisión fosforescente

Se midió la variación de intensidad de fosforescencia con un espectrofluorímetro convencional Cary Eclipse, encontrando que la intensidad de fosforescencia aumenta con la concentración de CO_2 (Figura 7.26).

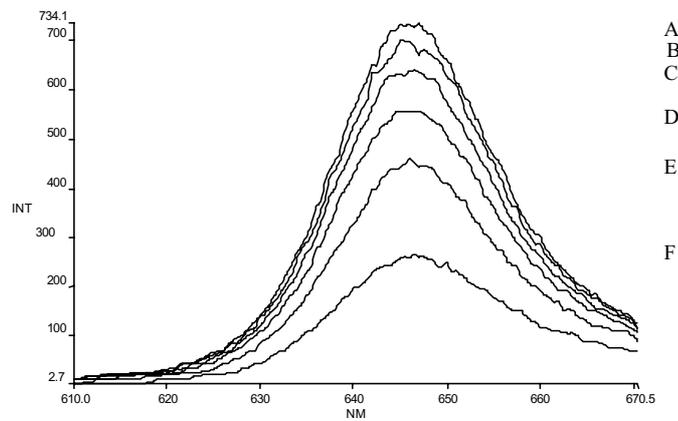


Figura 7.26. Espectro de fosforescencia de la membrana bicapa a diferentes porcentajes de CO₂: A) 1%; B) 0,8%; C) 0,6%; D) 0,4%; E) 0,2%; F) 100% N₂.

3.5.2. Respuesta del sensor

Con el empleo de la membrana bicapa conteniendo el aceptor, azul timol lipofilizado en poliuretano, y donador, complejo PtOEP y DABCO en poliestireno, es posible determinar dióxido de carbono. Para ello, se procedió a realizar dos calibrados diferentes, uno en intensidades de fosforescencia con un espectrofluorímetro convencional y otro en tiempos de vida con el prototipo P02. En ambos casos se calibró hasta un 1% en dióxido de carbono. Para realizar estos calibrados hemos trabajado en ausencia de oxígeno y midiendo tres réplicas para cada valor de concentración.

- Mediante la instrumentación convencional

Cuando usamos instrumentación de sobremesa (espectrofluorímetro Cari Eclipse) se obtuvieron los resultados recogidos en la Tabla 7.16 y Figura 7.27, los cuales ofrecen la pauta de comportamiento habitual.

CO ₂ (%)	I	R	I ₀ -I ₁₀₀ /I ₀ -I
0	165	0,00	-
0,04	185	0,20	15,00
0,08	221	0,65	5,36
0,12	242	0,97	3,90
0,16	282	1,80	2,56
0,2	287	1,93	2,46
0,24	306	2,50	2,13
0,28	310	2,64	2,07
0,4	348	4,41	1,64
0,52	384	7,62	1,37
0,60	405	11,27	1,25
0,80	438	28,49	1,10
1	465		1,00

Tabla 7.16. Valores de fosforescencia medidos para la membrana bicapa con instrumentación convencional. I es el valor medio de tres réplicas.

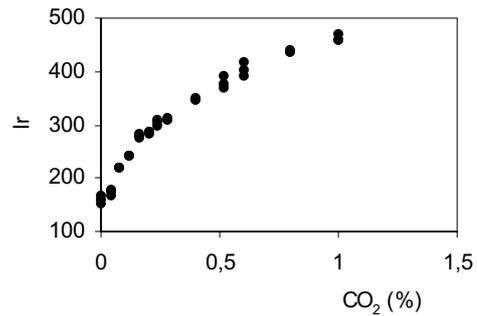


Figura 7.27. Variación de intensidad de fosforescencia con % CO₂ con instrumentación convencional para membrana bicapa. Tres medidas para cada concentración.

Como en el caso anterior se aplicaron los dos modelos propuestos, obteniendo para el caso del mecanismo de transferencia de energía (Figura 7.28) la función $y = 11,018x - 0,183$ con un $r^2 = 0,985$ y es válida para un intervalo de concentraciones que va hasta el 0,4% de CO₂. Para el caso de la linealización mediante el mecanismo de filtro interno la ecuación que se obtienen es $y = 0,374x + 0,620$ con un r^2 de 0,988. (Figura 7.29)

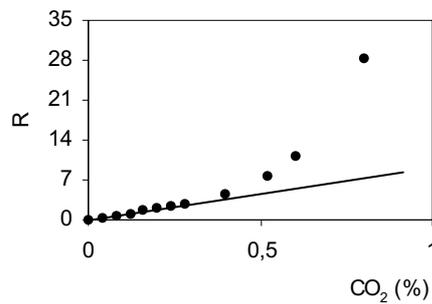


Figura 7.28. Ajuste lineal mediante el modelo RET. Instrumentación convencional.

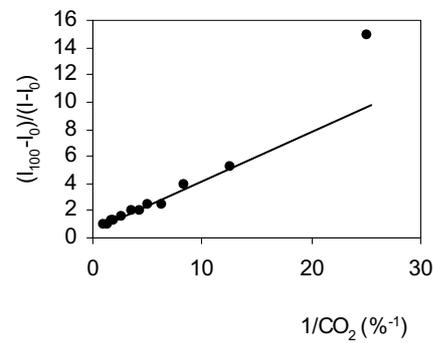


Figura 7.29. Ajuste lineal mediante el modelo de filtro interno. Instrumentación convencional.

En conclusión, parece que podrían coexistir procesos de filtro interno con los de transferencia de energía, ya que ambos sistemas se ajustan a los modelos propuestos. El modelo que mejor ajusta es el de filtro interno con un valor de $r^2 = 0,988$. Estos resultados parecen coherentes con el hecho de que la superficie de contacto de las dos membranas es pequeña y la transferencia de energía sólo se produciría en una pequeña fracción del espesor total. Este espesor se puede estimar en 14 μm para la membrana de poliestireno y 161 μm para la de poliuretano y la eficiencia de la transferencia de energía es muy pequeña (<del 1,56%) a partir de los 30 nm de distancia entre donador y aceptor⁷.

- Mediante el prototipo P02.

Se realizaron calibrados similares con el prototipo P02. En la tabla 7.17 se muestran los valores medios de intensidad de fosforescencia para las tres réplicas medidas de cada concentración de CO₂ así como los valores de R obtenidos (Figura 7.30).

CO ₂ (%)	señal	R	I ₀ -I ₁₀₀ /I ₀ -I
0	76.506	0,00	-
0,04	82.022	0,52	3,41
0,08	82.094	0,53	3,36
0,12	84.092	0,84	2,48
0,20	86.651	1,46	1,85
0,24	87.482	1,75	1,71
0,60	89.201	2,59	1,48
1	92.348	6,69	1,19

Tabla 7.17. Valores obtenidos con la doble membrana de PS y D4. Prototipo P02. La señal es la media de tres réplicas.

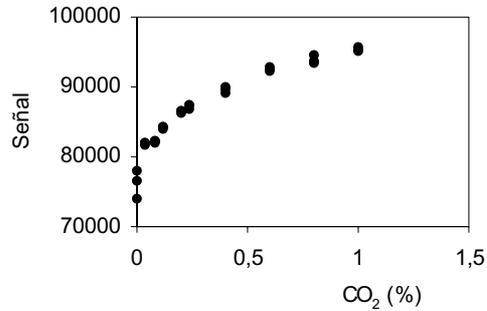


Figura 7.30. Calibrado en señal obtenida con la CO₂ con el prototipo P02.

En este caso la función obtenida suponiendo RET es $y = 6,948x + 0,623$ con un $r^2 = 0,978$ (Figura 7.31), lineal hasta el 0,4%. Para el caso del ajuste mediante filtro interno la ecuación que se obtiene es $y = 0,191x + 0,937$ con un $r^2 = 0,995$ ensayadas (Figura 7.32).

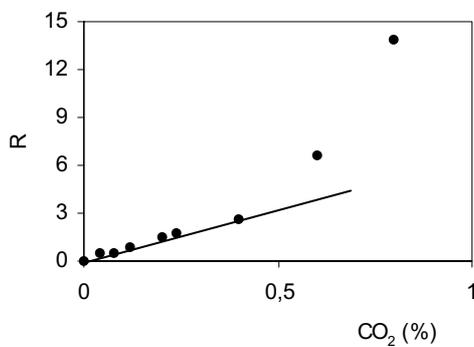


Figura 7.31. Ajuste lineal mediante el modelo RET. Prototipo P02.

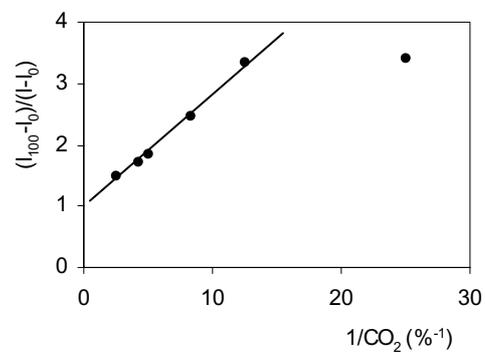


Figura 7.32. Ajuste lineal mediante el modelo de filtro interno. Prototipo P02.

Los resultados obtenidos son similares tanto usando instrumentación convencional como con el prototipo P02, demostrándose la posibilidad de medir el CO_2 con este sistema mediante la instrumentación portátil desarrollada. En el caso del oxímetro los dos ajustes son comparables, por tanto se podría hablar de la existencia del mecanismo de filtro interno y del de transferencia de energía, como antes se ha indicado. Por otra parte, hay que considerar que al parámetro analítico medido en el prototipo desarrollado contribuyen tanto el tiempo de vida como la intensidad del proceso fosforescente como se vio en el Capítulo 3. Ello puede justificar el que los resultados de aplicar ambos modelos de resultados similares.

3.5.3. Capacidad de respuesta

Se estableció la respuesta de las membranas sensoras a la variación cíclica de atmósfera conteniendo en cada ciclo un 1% de CO_2 en primer lugar y, a continuación atmósfera de nitrógeno puro. Esto se hizo midiendo con el oxímetro P02 de dos formas, en la primera se mantuvo una concentración de oxígeno de un 20% y en la segunda se trabajó en ausencia de oxígeno. Se observa que en los dos casos el proceso es reversible recuperándose la señal en cada repetición.

Para las medidas realizadas en presencia de un 20% de oxígeno los tiempos de respuesta t ($80\% \text{N}_2 \rightarrow 1\% \text{CO}_2$) y de recuperación t ($1\% \text{CO}_2 \rightarrow 80\% \text{N}_2$) fueron de 95 y 237 s, respectivamente. La variación de señal se representa en la Figura 7.33.

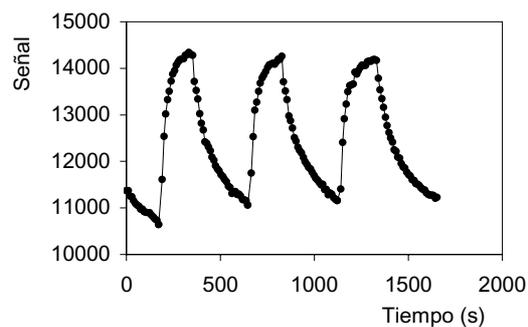


Figura 7.33. Respuesta de P02 a variación cíclica de CO_2 al 1% a $\text{N}_2:\text{O}_2$ 80:20.

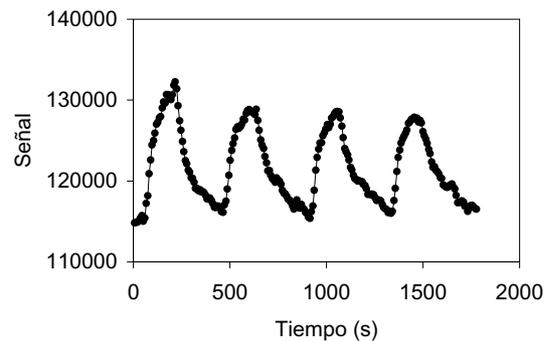


Figura 7.34. Respuesta de P02 a variación cíclica de CO₂ al 1% a 100% N₂.

En el caso de realizar las medidas en ausencia de oxígeno los tiempos de respuesta $t(N_2 \rightarrow 1\%CO_2)$ y recuperación $t(1\%CO_2 \rightarrow N_2)$ fueron de 90 y 225 s, respectivamente (Figura 7.34). Como era de esperar, cuando se trabaja en presencia de oxígeno las señales obtenidas son menores, del orden de un 10% respecto a cuando se trabaja en ausencia, debido a la atenuación que originan. Como es habitual en estos sensores de membrana homogénea, también llamados de membrana desnuda, los tiempos de respuesta y de recuperación no son iguales, siendo mayor el tiempo de recuperación que el de respuesta. Fenómeno que ha sido justificado de forma cualitativa para sensores de respuesta hiperbólica contralada por difusión por Mills y Chang⁶.

Con este sistema de doble membrana se logra medir CO₂ tanto con la instrumentación convencional como mediante el prototipo desarrollado, en rangos de hasta el 0,4 de CO₂. Sin embargo, la principal desventaja que presentan estas membranas sensoras es la interferencia producida por el oxígeno debido a la gran sensibilidad que presenta la porfirina usada como donador luminiscente hacia este gas. Esto hace que tengamos que trabajar con una proporción de oxígeno controlada, con el problema que conlleva la realización de calibrados de esta forma, o trabajar en ausencia de oxígeno que, por otra parte, no es una situación real.

4. Preparación y caracterización de membranas para CO₂ conteniendo luminóforo interno e insensibles a oxígeno.

4.1. Membrana sensora bicapa para CO₂

Debido al problema que presenta la interferencia de oxígeno sobre la membrana sensora fosforescente, se desarrollaron membranas en las que el luminóforo se encuentra protegido con polímeros impermeables a oxígeno. De esta manera, se podrían hacer las medidas de CO₂ en presencia de este gas, que por otra parte está presente en la atmósfera en un alto porcentaje. Para la preparación de estas membranas que eviten la influencia de oxígeno se ensayaron diversos materiales poliméricos con baja permeabilidad a este gas.

4.1.1. Materiales poliméricos impermeables a oxígeno.

En la Tabla 7.18 se recogen diferentes materiales poliméricos¹⁸ junto con su porcentaje de transmisión de oxígeno (OTR) expresados en cm³·mL/100s en 24 h a 25°C, 65% de humedad relativa y 1atm de presión.

De entre todos estos polímeros hemos elegido para nuestro estudio el polietileno vinil alcohol EVAL, poliacrilonitrilo PAN y el copolímero de vinilo y vinilideno PVCD, debido a que poseen alta impermeabilidad a oxígeno y pueden ser disueltos fácilmente en disolventes orgánicos y formar membranas sensoras.

De hecho, unos de los polímeros más usados en alimentación para impedir el paso de oxígeno y otros gases es el Saran Film, que es una marca registrada de Dow Chemical Company y que está formado por un 86% de PVCD y un 14% de PAN.

¹⁸ R.B. Armstrong, EVAL Company of America, (2002)

Tabla 7.18. Comparación de varios polímeros usados como barrera a oxígeno.

MATERIAL	OTR
EVOH	0,05-0,18
PVDC	0,15-0,90
Acrilonitrilo	0,8
MXD6	0,15
Tereftalato de polietileno (PET)	2,6
Nylon	2,1
Polietileno (PE) baja densidad	420
Polietileno (PE) alta densidad	150
Polipropileno (PP)	150
Poliestireno (PS)	350

El EVAL es un polímero hidrofílico que se disuelve en la mezcla n-propanol/agua 65/35. La porfirina no es soluble en n-propanol, aunque sí en la mezcla n-propanol/THF, pero en esta última no es soluble el EVAL. Por este motivo, y a pesar de las diferentes pruebas realizadas, no pudimos fabricar membranas con EVAL que permitieran aislar el luminóforo del oxígeno.

Sí es posible, sin embargo, disolver el luminóforo en dimetilformamida (DMF) que es un disolvente habitual para preparar membranas con PAN, aunque la fosforescencia del luminóforo en este polímero no es muy intensa. Para la fabricación de membranas de PAN se disolvieron 5 mg de PtOEP y 0,1 g de PAN en 1,0 mL de DMF. Con 35 μ L de ese cóctel se prepararon membranas sensoras sobre una lámina transparente de poliéster con la ayuda del sistema rotatorio de velocidad de giro variable. Tras dejar la membrana girando a temperatura ambiente, durante unos minutos, se deja estar en un

recipiente hermético obteniéndose de este modo una película con las características habituales.

En la Figura 7.35 se muestra el espectro de emisión fosforescente del luminóforo en una membrana de PAN registrado bajo atmósferas de aire y de nitrógeno. El espectro está realizado con rendijas de excitación y emisión de 5 nm. Se observa muy poca influencia del oxígeno sobre la fosforescencia cuando el PtOEP se encuentra protegido por PAN. Sin embargo, la intensidad de fosforescencia relativa emitida por el complejo en estas membranas de PAN es baja si la comparamos con la que se obtenía en PS o PVC en estas mismas condiciones, posiblemente debido a la atenuación originada por este polímero que es mucho más hidrofílico. Por esta razón, baja fosforescencia, el oxímetro P02 no origina respuesta con esta membrana y por tanto se descartó el uso de PAN como material para la fabricación del sensor.

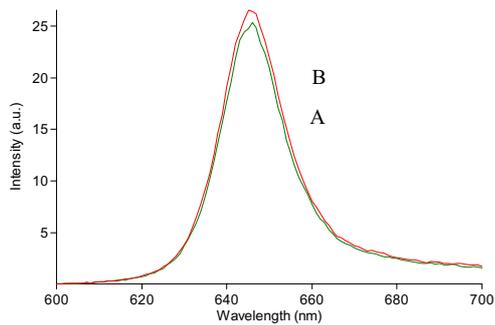


Figura 7.35. Espectro de fosforescencia de PtOEP en membrana de PAN bajo atmósfera de: A) aire, B) nitrógeno.

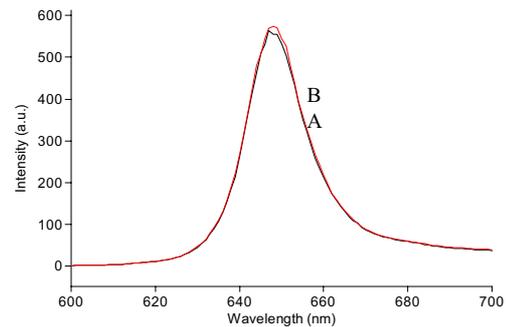


Figura 7.36. Espectro de fosforescencia de PtOEP en membrana de PVCD bajo atmósfera de: A) aire, B) nitrógeno.

Un tercer material ensayado fue el PVCD. Para la preparación de membranas de PVCD con PtOEP se operó de la forma siguiente: se pesó en un vial de vidrio 0,5 mg de

PtOEP y 0.1 g de PVCD que se disuelven en 1,0 mL de THF con ayuda de un baño de ultrasonidos. Depositamos 50 μ l del cóctel sobre Mylar para preparar la membrana.

Estas membranas sí presentan gran fosforescencia y es posible medirlas con el oxímetro P02, en concreto, presentan una fosforescencia del orden de un 70% mayor que la misma membrana preparada con poliestireno. Además actúan como buena barrera a oxígeno, como podemos observar en la Figura 7.36 donde se muestra el espectro de emisión de PtOEP en PVCD en presencia aire y de nitrógeno.

4.1.2. *Caracterización de la membrana bicapa de PVCD y D4.*

Una vez seleccionado el PVCD como material polimérico adecuado para proteger la fosforescencia del luminóforo PtOEP del oxígeno ambiente, se empleó un sistema basado en una membrana bicapa en la superponemos una membrana sensora de azul de timol lipofilizado en poliuretano D4, ya descrita en el apartado 2.3.2, sobre una membrana insensible a oxígeno que contiene PtOEP. Esta primera membrana está formada por un copolímero, cloruro de polivinilo-co-vinilideno PVCD, que actúa como barrera a oxígeno, en el que se encuentra disperso y protegido del oxígeno el compuesto luminiscente. La segunda capa está formada por una membrana de un polímero hidrofílico poliuretano D4 en la que se encuentra el par iónico formado por azul de timol y el hexadeciltrimetil amonio, el cual, como ya hemos visto, cambia de color en presencia de CO₂ con el consecuente incremento de fosforescencia.

La fabricación de la doble membrana se hizo en dos pasos, en el primero se formó la membrana impermeable a oxígeno que contiene el luminóforo. Para ello, se preparó un cóctel en el que se disolvieron, 0,1 g de PVCD en 1 mL de THF en baño de ultrasonidos para facilitar la disolución del polímero, tras lo cual se añaden 0,5 mg de PtOEP. La membrana se prepara con 20 μ L de este cóctel sobre un soporte de Mylar en la forma habitual. Una vez seco, se deposita una segunda capa de 25 μ L del cóctel de composición M4, ya antes comentado.

A continuación, se recogen los resultados obtenidos en cuanto a respuesta del sensor a dióxido de carbono, linealización, variación de tiempo de vida y capacidad de respuesta y, todo ello, tanto con instrumentación convencional como con el prototipo P02.

4.1.2.1. Respuesta del sensor

- Mediante instrumentación convencional

Al incrementar la concentración de CO_2 se observa un incremento de fosforescencia de la misma forma ya vista para las anteriores membranas (Figura 7.37). Este experimento se lleva a cabo en atmósfera de nitrógeno en la que se modifica el porcentaje de CO_2 , una vez se comprobó que el oxígeno no afectaba prácticamente a la señal. Se usaron tres réplicas para cada concentración de CO_2 y los valores obtenidos para estas membranas aparecen en la Tabla 7.19..

Tabla 7.19. Valores obtenidos con la doble membrana de PVCD y D4. Instrumentación convencional. Prototipo P02. La señal es la media de tres réplicas.

$\text{CO}_2(\%)$	I	R	$I_0 - I_{100}/I_0 - I$
0	2760,00	-	-
0,1	2990,55	3,30	
0,4	3131,21	2,05	
0,8	3252,31	1,55	
1,4	3333,83	1,33	
2,5	3428,42	1,15	
5	352	-	1,00

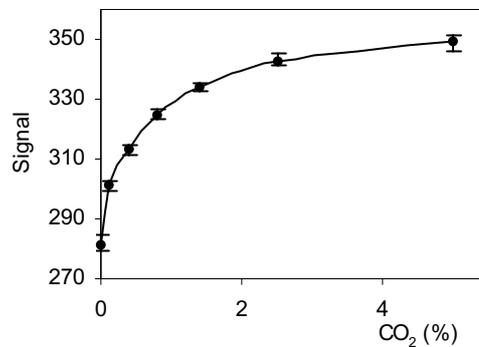


Figura 7.37. Variación de intensidad de fosforescencia para la membrana bicapa PVCD/D4.

Como en los casos anteriores se aplicaron a los datos obtenidos los dos modelos propuestos. Como se observa en la Figura 7.38, la representación gráfica para el caso de RET, esto es R frente a la concentración de CO₂, obedece la ecuación $y = 3,245x - 0,092$ ($r^2 = 0,986$), Para el caso del modelo de filtro interno (Figura 7.39), la ecuación que se obtiene es $y = 0,444x + 0,968$ ($r^2 = 0,989$).

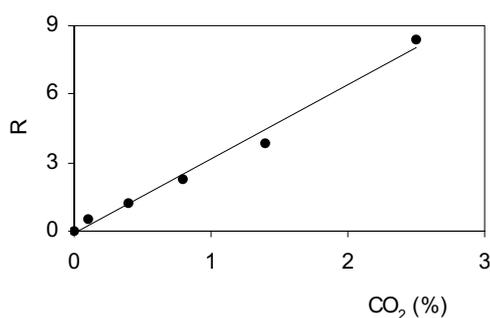


Figura 7.38. Ajuste lineal mediante el modelo RET. Instrumentación convencional.

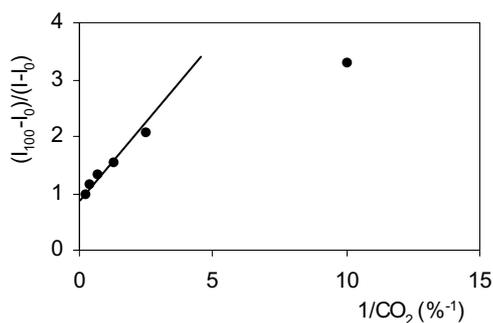


Figura 7.39. Ajuste lineal mediante el modelo de filtro interno. Instrumentación convencional.

Si comparamos los resultados con los encontrados para las membranas bicapa antes estudiadas de poliestireno y poliuretano, observamos que en este caso encontramos linealidad hasta el 2,5% también es cierto que hemos ensayado hasta el 5% de CO₂ y antes sólo hasta el 1% por otra parte, y al igual que lo que se comentó para las anteriores membranas bicapa, parecen coexistir los dos mecanismos de respuesta, filtro interno y transferencia de energía, ya que ambos sistemas se ajustan a los modelos propuestos. En este caso los datos se ajustan mejor al modelo RET.

Al objeto de aportar datos que permitan dilucidar entre ambos mecanismos, se midió la variación de tiempos de vida de fosforescencia del luminóforo en la membrana de PVCD bajo diferentes atmósferas de CO₂. Como se ha indicado con anterioridad los dos mecanismos se diferencian en que en los de RET hay una variación de tiempos de vida de la especie excitada, mientras que en el de filtro interno no hay ninguna interacción entre donador y aceptor por lo que no se modifican dichos tiempos.

Tabla 7.20. Variación del tiempo de vida para distintas concentraciones de CO₂.

[CO ₂] (%)	Tiempo (ms)
0	0,06
1	0,068
4	0,075

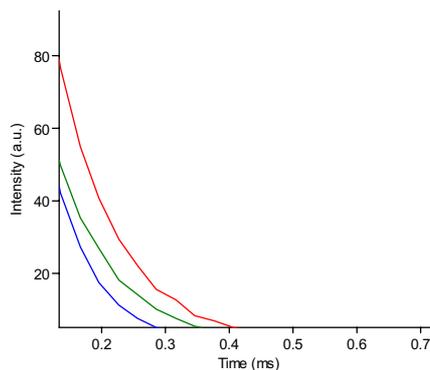


Figura 7.40. Evolución de la señal fosforescente con el tiempo para varias concentraciones de CO₂.

Para realizar el estudio ello se utilizó el espectrofluorímetro Cary Eclipse que permite este tipo de medida para señales fosforescentes. Los datos experimentales obtenidos (Tabla 7.20 y Figura 7.40) muestran un claro incremento de tiempos de vida (un 25% al pasar de un 0 a un 4% de CO₂), lo cual abonaría la hipótesis anterior de que coexisten ambos tipos de procesos en estas membranas. El proceso RET estaría restringido a la zona de contacto de ambas membranas y la inmediatamente adyacente, mientras que el de filtro interno ocurriría en toda la extensión de la membrana superior que contiene el indicador ácido-base.

- Mediante el prototipo P02

A continuación se realizó el calibrado insertando la membrana en el prototipo P02, para el que obtuvieron los datos representados en la Figura 7.41. En este caso no se hicieron réplicas.

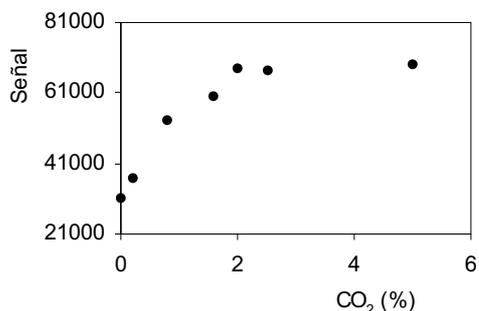


Figura 7.41. Variación de la señal con el contenido en CO₂ para el prototipo P02.

Cuando se ajustan a los dos modelos empleados encontramos para el modelo RET (Figura 7.42) un ajuste a la ecuación $y = 4,592x - 0,344y$ con $r^2 = 0,991$ y que muestra linealidad hasta el 1,6 % de CO_2 , observándose una curvatura positiva a porcentajes mayores, al igual que se observó en el caso de realizar la medida con un espectrofluorímetro convencional. Para el caso del modelo de filtro interno (Figura 7.43), se obtiene la ecuación $y = 1,313x + 0,496$ con un $r^2 = 0,992$ válida para todo el rango de concentraciones ensayadas.

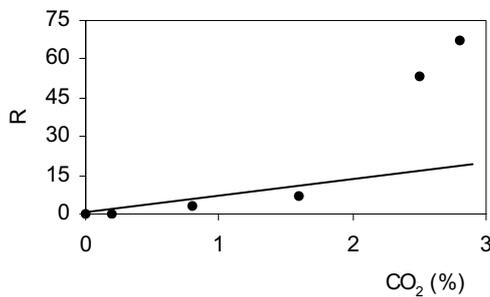


Figura 7.42. Ajuste lineal mediante el modelo RET. Prototipo P02.

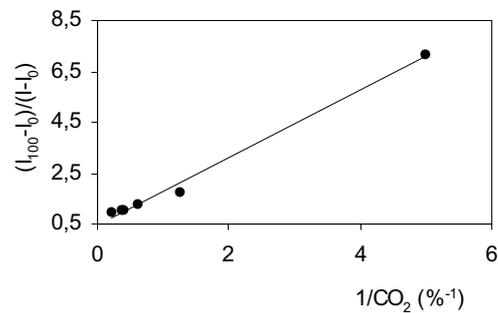


Figura 7.43. Ajuste lineal mediante el modelo de filtro interno. Prototipo P02.

4.1.2.2. Capacidad de respuesta

Utilizando el prototipo P02 con las membranas de PVCD y poliuretano se midió la capacidad de respuesta de las membranas a la variación alternante de atmósfera con un 1% de CO_2 y atmósfera de nitrógeno. Los tiempos de respuesta $t(\text{N}_2 \rightarrow 1\% \text{CO}_2)$ y de recuperación $t(1\% \text{CO}_2 \rightarrow \text{N}_2)$ encontrados fueron de 57 y 115 s, respectivamente, valores idénticos a los encontrados midiendo con instrumentación convencional. Un ejemplo de la variación de señal encontrada se muestra en la Figura 7.44.

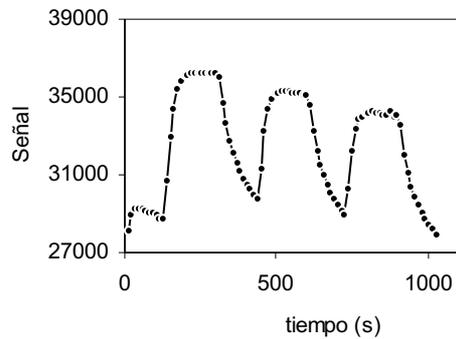


Figura 7.44. Respuesta de P02 a variación cíclica de CO_2 al 1% a N_2 .

4.2. Membrana sensora con nanopartículas

El sistema de membrana bicapa que acabamos de discutir, permite la medida de CO_2 con nuestra instrumentación convencional y evita la influencia de oxígeno. Sin embargo, esta disposición tiene algunos inconvenientes:

En primer lugar, la distancia entre luminóforo que se sitúa en una de las capas y el indicador de pH que se sitúa en la otra, es grande lo que provocará una baja eficiencia del proceso de transferencia de energía y que predomine el mecanismo de sistema de filtro interno.

En segundo lugar, con el sistema de membrana bicapa no se podría llevar a cabo el recubrimiento de los fotodetectores con el material de membrana en la manera en que hemos hecho para la fabricación del prototipo de medida de oxígeno. La razón es que si en la cara externa del fotodiodo se deposita la capa sensible a CO_2 y le superponemos la capa impermeable a oxígeno, el sistema no sería sensible a CO_2 porque esta capa sensible a CO_2 no quedaría expuesta al ambiente externo que es donde se encuentra el analito, que no podría atravesar la primera capa. Por otra parte, si depositamos primero la capa impermeable a oxígeno y superponemos la capa sensible a CO_2 el fotodetector no detectará la absorción de luz por parte del indicador de pH.

Depositar el material de membrana sobre el fotodetector hace al sistema más robusto y por las ventajas que conlleva, pretendemos usar ese sistema en el desarrollo del sensor para la determinación de CO₂.

El uso de nanopartículas con el luminóforo atrapado en su interior abre la posibilidad de recubrimiento del fotodetector, ya que de esta forma tanto el luminóforo como el indicador de pH se podrán encontrar homogéneamente repartidos en la película sensora. Si estas nanopartículas son de materiales impermeables a oxígeno, minimizaremos la influencia de este gas sobre el sistema. Y en tercer lugar, disminuirémos la distancia entre el luminóforo y el indicador de pH, con lo que facilitaremos la transferencia de energía de resonancia.

Las nanopartículas están siendo muy usadas en la actualidad como marcadores fluorescentes¹⁹, entre otros usos analíticos e incluso se pueden adquirir comercialmente con diferentes tipos de luminóforos atrapados en su interior²⁰. Wolfbeis y col. han usado estas nanopartículas para el desarrollo de sensores de CO₂ en membranas de sol gel¹⁶.

4.2.1. Preparación de nanopartículas

Existen diferentes técnicas para la preparación de nanopartículas como ya se ha indicado en la Introducción, siendo las más usadas las técnicas de polimerización^{21;22} y las de precipitación^{23,24,25}.

¹⁹ S.Peper y E.Bakker, *Sensors Update*, 13 (2004).

²⁰ Molecular Probes Inc, www.probes.com, (2005).

²¹ K. Landfester y M. Antonietti, *Macromol. Rapid Commun.*, 21, 820 (2000).

²² D.R. Walt, T.K. Mandal y M.S. Fleming, *US Patent* 6,720,007 (2004).

²³ A. Celesa, Y. Quin, S. Peper y E. Bakker, *Anal. Chem.*, 75, 133 (2003).

²⁴ N.R. Foster, F. Dehghani, K.M. Charoenthaikool y B. Warwick, *AAPS PharmSci.* 5, (2) (2003).

²⁵ I. Tsagkatakis, S.Peper y E. Bakker, *Anal. Chem.*, 73, 315, (2001).

De las distintas estrategias utilizadas en esta Memoria de Doctorado para la fabricación de nanopartículas: polimerización en microemulsión, precipitación usando ultrasonidos y precipitación por goteo, la que mejores resultados nos ha dado es la precipitación por goteo²⁶, por ello solo nos referiremos a este último procedimiento.

Mediante este procedimiento preparamos nanopartículas de poliacrilonitrilo, PAN, y PVCD. Las nanopartículas de PAN se preparan disolviendo en un matraz erlrmeyer 0,120 g de PAN y 2 mg de PtOEP en 25 mL de DMF. La disolución se agita vigorosamente con un agitador magnético y se le añaden gota a gota lentamente 75 mL de una disolución de HCl 10^{-4} M mediante una bureta a una velocidad de unos 0,2 mL/min (Figura 7.45). La suspensión obtenida se centrifuga y lava por tres veces con agua destilada, tras lo cual dicha suspensión se calienta a 70°C para eliminar trazas de DMF. Tras ello, volvemos a centrifugar y lavar con etanol llevando a un volumen final de 4 mL.

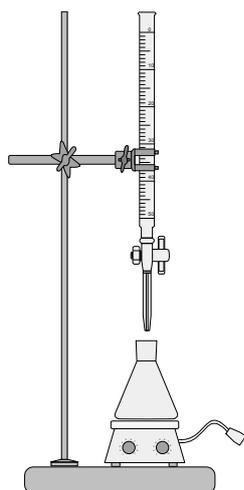


Figura 7.45 Esquema del montaje realizado para la preparación de nanopartículas.

²⁶ J.M. Kürner, I. Klimant, C. Krause, H. Preu, W. Kunz y O.S. Wolfbeis, *Bioconjugate Chem.*, 12, 883 (2001).

Para preparar las nanopartículas de PVCD se disuelven en un matraz enlermeyer 0,118 g de PVCD y 2 mg de PtOEP en 3 mL de THF y se lleva hasta 25mL con DMF. La disolución se agita vigorosamente con un agitador magnético y se le añaden por goteo lentamente 75 mL de una disolución de HCl 10^{-4} M mediante una bureta a una velocidad de unos 0,2 mL/min. La suspensión obtenida se centrifuga y se lleva a 4 mL de etanol, con objeto de que la concentración de porfirina esté en torno a 500 mg/L. De este modo tenemos 4 mL de suspensión de nanopartículas en etanol que usaremos para la fabricación de los cócteles necesarios para la preparación de membranas con nanopartículas.

4.2.2. Caracterización física

Las Figuras 7.46 y 7.47 muestran las fotografías de microscopía electrónica de barrido obtenidas de las nanopartículas de PAN y PVCD preparadas; en el caso de las nanopartículas de PAN la muestra fue metalizada con carbono y en el caso de las nanopartículas de PVCD se metalizó con oro. El tamaño de las partículas de PAN está en torno a 50 nm, mientras que el tamaño en las nanopartículas de PVCD es algo mayor aunque son menos homogéneas. Tanto unas como otras se encuentran aglomeradas como puede observarse en estas fotografías.

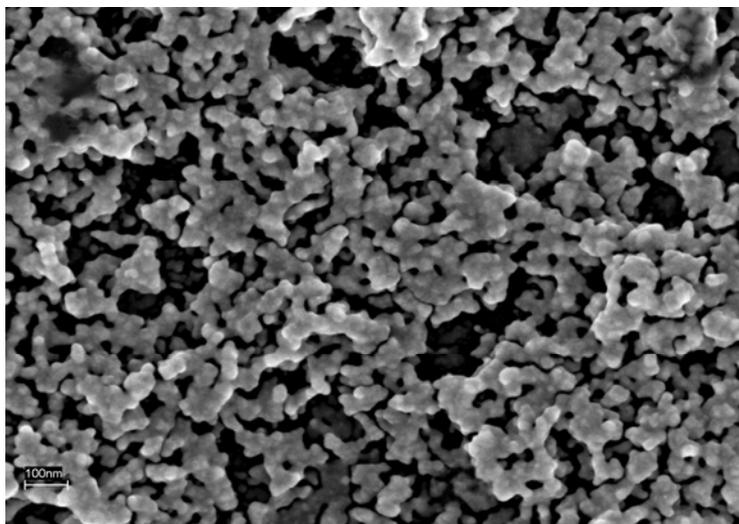


Figura 7.46. Microscopía electrónica de barrido. Nanopartículas de PAN.

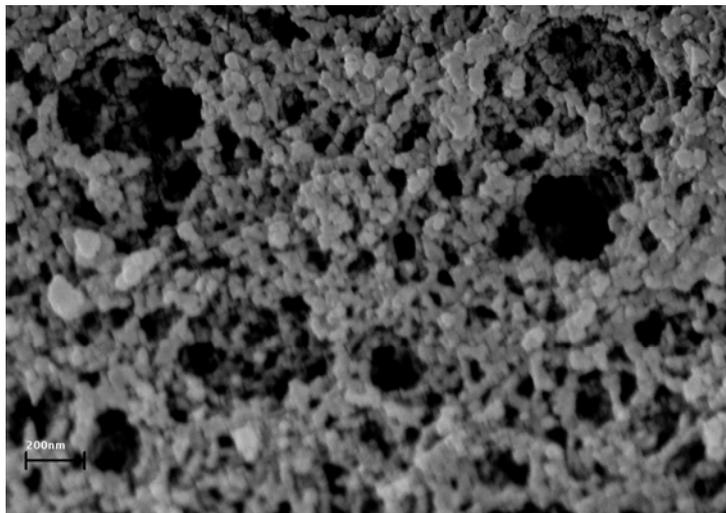


Figura 7.47. Microscopía electrónica de barrido. Nanopartículas de PVC.

4.2.3. Membranas sensoras de poliuretano D-4 con nanopartículas.

La membrana de poliuretano se prepara de manera análoga a la indicada en el apartado 2.3.2, solo que variando la forma de preparar la disolución de poliuretano ya que cantidad necesaria de etanol se añade conteniendo las nanopartículas suspendidas, a partir de la suspensión final obtenida que contenía 500 mg/L de PtOEP.

Para preparar la suspensión de poliuretano D-4 con nanopartículas se pesan 147 mg de hidrogel D4 que se disuelven en 0,2 mL de agua y se añaden 1,8 mL de suspensión de nanopartículas de PVC en etanol. Se toman 0,450 mL de la anterior disolución de D4 y se le añaden 160 μ L de disolución de azul de timol lipofilizado y 80 μ L de base lipofílica tras lo cual se prepara la membrana sensora depositando 30 μ L sobre una lámina de Mylar.

4.2.3.1. Respuesta del sensor

Se estableció la respuesta del sensor mediante la instrumentación convencional, con el espectrofluorímetro Cary Eclipse, obteniéndose los espectros de emisión fosforescente bajo diferentes concentraciones de CO₂. Se hicieron tres réplicas para cada

medida (Figura 7.48), observándose un aumento de la fosforescencia al aumentar la concentración de analito. El espectro fue obtenido con rendijas de excitación y emisión de 10 nm.

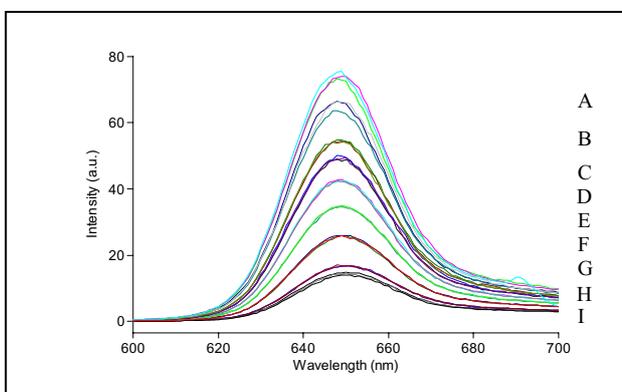


Figura 7.48. Espectro de fosforescencia de membranas de poliuretano con nanopartículas. A) 5%; B) 4.8% C) 3%; D)2.5%; E)2%; F) 1.5% G)1%; H)0.4%; y I) 0% de CO₂.

Representando los valores de intensidad de fosforescencia obtenidos al máximo de emisión frente a la concentración de CO₂ (Figura 7.49), se obtiene una curva de forma algo diferente a la habitual y, sobre todo, que presenta baja intensidad de fosforescencia comparada con las anteriores membranas de PS o de PVC. La Tabla 7.21 muestra los valores obtenidos con estas membranas.

CO ₂ (%)	I	R	$I_0 - I_{100} / I_0 - I$
0	14	0	-
0,4	16	0,18	29,50
1	25	1,19	5,36
1,5	34	2,67	2,95
2	41	4,40	2,19
2,5	49	7,60	1,69
3	54	10,98	1,48
4	66	38,73	1,13
5	73	-	1,00

Tabla 7.21. Valores obtenidos con la membrana de D4 con nanopartículas. Instrumentación convencional. El valor de intensidad es la media de tres réplicas.

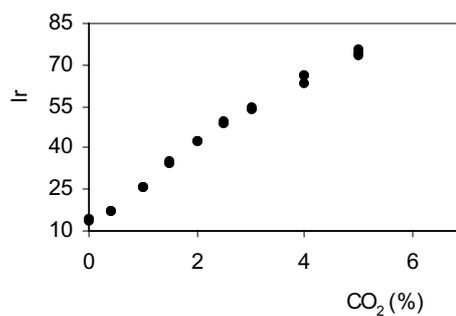


Figura 7.49 Intensidad relativa de fosforescencia frente a la concentración en membranas de D4 con nanopartículas.

Estas membranas no dan una intensidad suficiente como para ser medidas mediante el prototipo P02, posiblemente debido a atenuación por el agua presente necesaria para disolver el D4, así que sólo presentamos los datos obtenidos mediante instrumentación convencional. Por otra parte, estas membranas no son estables, desapareciendo la fosforescencia en pocas horas.

Los resultados obtenidos se ajustaron a los dos modelos propuestos, encontrado que para el modelo RET (Figura 7.50) se obtiene la ecuación $y = 2,222x - 0,488$, $r^2=0,941$, que muestra linealidad hasta el 2% de CO_2 con un mal ajuste y para el de filtro interno (Figura 7.51) se obtiene la función $y = 5,408x - 0,332$; $r^2 = 0,977$, con el que el límite de detección mediante filtro interno es del 1% condicionado por el tramo lineal.

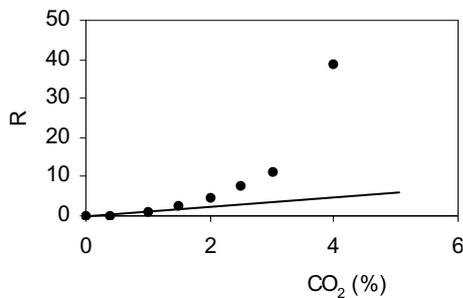


Figura 7.50. Calibrado lineal usando RET. Membrana de D4 con nanopartículas.

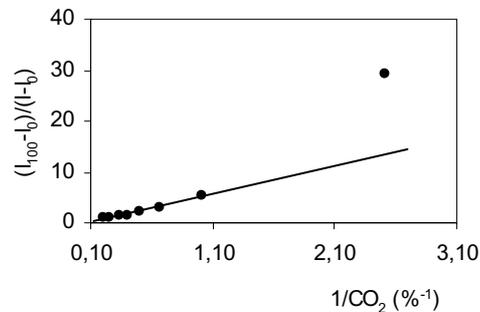


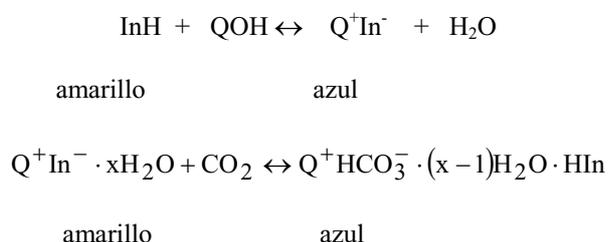
Figura 7.51. Calibrado lineal usando filtro interno. Membrana de D4 con nanopartículas.

Dado el mejor ajuste al modelo de filtro interno, cabría pensar se da un mejor ajuste lineal lo que hace pensar que en estas membranas que contienen las nanopartículas en poliuretano D4 el proceso dominante será el de filtro interno.

4.2.4. Membranas sensoras de EC con nanopartículas

Para la obtención de estas membranas se preparó un primer cóctel que contenía 1 mL de azul de timol lipofilizado y 60 μL de base lipofílica. La adición de estos 60 μL de

base lipofílica se hizo en alícuotas de 20 μ L y después de añadir cada porción, el cóctel se saturó pasando una corriente de dióxido de carbono¹⁶ y, a continuación, N₂. Esto se debe a que cuando se añadía directamente todo el hidróxido de amonio cuaternario, las nanopartículas presentes en el cóctel precipitaban y se oscurecían y el cóctel resultante también presentaba un color más intenso, no mostrando las membranas resultantes fosforescencia. Por este motivo se pasaba una corriente de CO₂, eliminando así el exceso de hidróxido que pudiese quedar y, a continuación, una corriente de nitrógeno para eliminar el exceso de CO₂ con lo que el cóctel queda de color azul nuevamente. Las reacciones que tendrían lugar serían las siguientes:



La razón de ese cambio de color hay que buscarla en la inestabilidad del complejo PtOEP en medio básico.

Se preparó entonces un segundo cóctel disolviendo 0,05 g de etilcelulosa en 1mL de suspensión de nanopartículas de PVCD en etanol. El cóctel final se obtuvo añadiendo 160 mL de cóctel primero a 0,5 mL del segundo cóctel, quedando una concentración de azul de timol lipofilizado en dicho cóctel de $7,1 \cdot 10^{-4}$ mol/L y una concentración de base lipofílica de $8,05 \cdot 10^{-3}$ mol /L siendo $r = 11,3$, esto es, el cociente entre la concentración de base y de indicador de pH. Como en los casos anteriores, se depositaron 30 μ L de este cóctel en una lámina de Mylar para la formación de la membrana sensora.

La cantidad usada de base lipofílica para la preparación del cóctel había sido previamente optimizada mediante la siguiente experiencia:

Se prepararon 7 cócteles, C1 a C7, con diferentes cantidades de base lipofílica de 10, 30, 60, 90, 105, 150, y 210 μL . Las concentraciones de indicador, base lipofílica y el radio entre concentraciones se muestra en la Tabla 7.22

Tabla 7.22. Composición de los cócteles para la fabricación de membranas de poliuretano D4 con nanopartículas.

Cóctel	μL	[Base]	[Indicador]	r	I_1/I_0
C1	10	$8,89 \cdot 10^{-4}$	$7,10 \cdot 10^{-4}$	1,25	-
C2	30	$2,67 \cdot 10^{-3}$	$7,10 \cdot 10^{-4}$	3,76	-
C3	60	$5,68 \cdot 10^{-3}$	$7,10 \cdot 10^{-4}$	8,00	1,6
C4	90	$8,05 \cdot 10^{-3}$	$7,10 \cdot 10^{-4}$	11,30	1,34
C5	105	$9,23 \cdot 10^{-3}$	$7,10 \cdot 10^{-4}$	13,00	1,57
C6	150	$1,30 \cdot 10^{-2}$	$7,10 \cdot 10^{-4}$	18,30	0,9
C7	210	$1,86 \cdot 10^{-2}$	$7,10 \cdot 10^{-4}$	26,10	0,97

Se prepararon con estos cócteles 7 las membranas M1 a M7 y se hizo con ellas un calibrado con CO_2 hasta el 1% para cada una de ellas, con 5 réplicas para cada concentración (Figura 7.52)

De las representaciones gráficas se vio que la que mayor sensibilidad, entendida como el cociente entre la intensidad de fluorescencia al 1% y al 0% de dióxido de carbono, correspondía a las membranas fabricadas con cócteles que contienen 60 μL de base lipofílica, correspondiente a la membrana M3. Para el caso de las membranas M1 y M2 no se obtuvo respuesta a CO_2 al no poseer color azul del indicador en forma desprotonada.

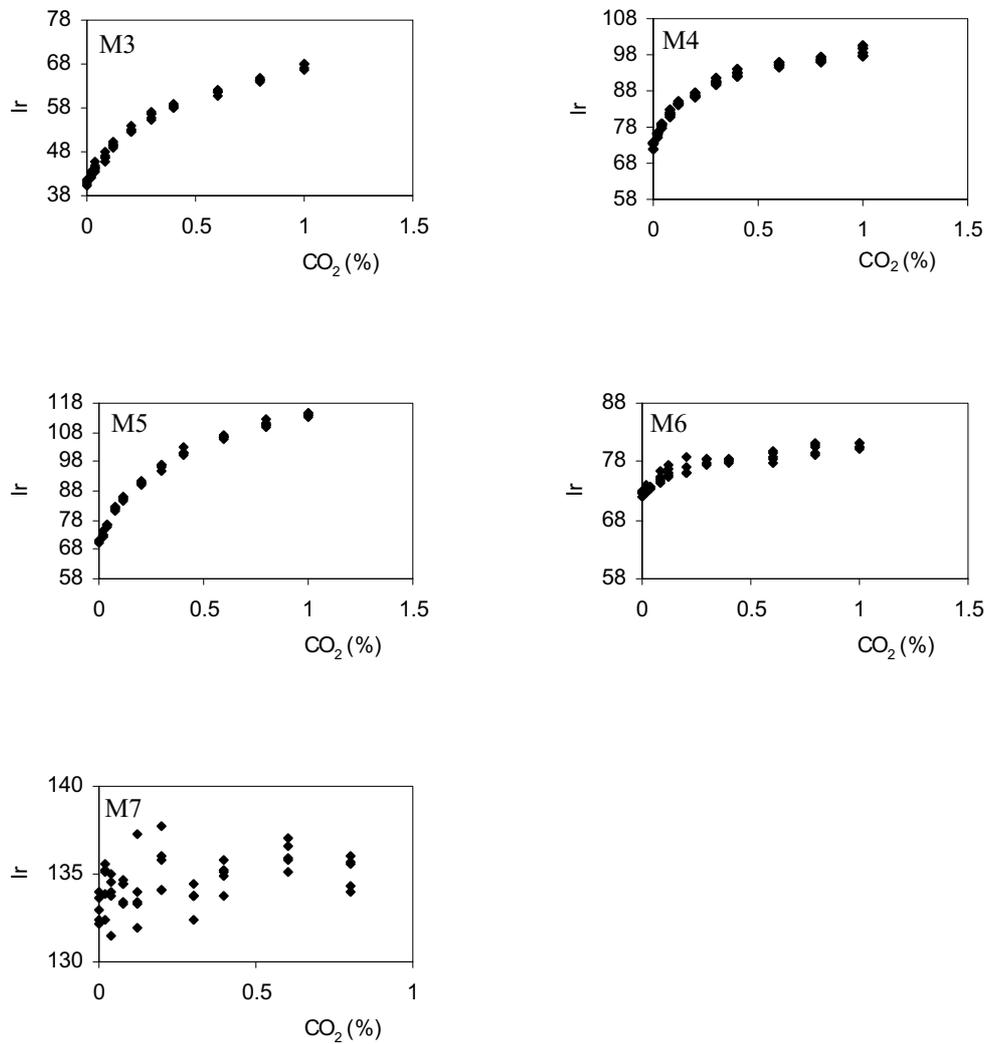


Figura 7.52. Calibrados con CO₂ para las membranas M3-M7.

Se registró el espectro de emisión fosforescente a varias concentraciones de CO₂ con el espectrofluorímetro Cary Eclipse llegando ahora hasta el 5% para una membrana y se hicieron en este caso tres réplicas para cada una de las concentraciones, encontrándose

un aumento de la señal obtenida con el aumento de la concentración de CO₂ como en el caso anterior (Figura 7.53).

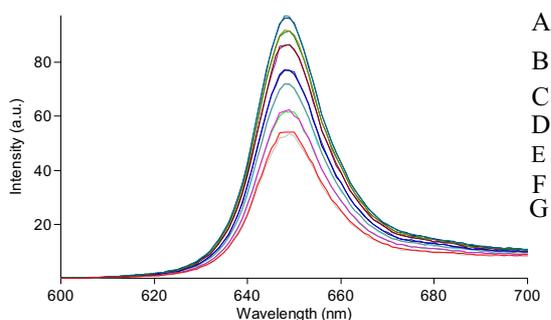


Figura 7.53. Espectro de fosforescencia. Membranas de EC con nanopartículas a: A) 0%; B) 4% C) 3%; D) 1.5% E) 1%; F) 0.4%; y G) 0% de CO₂.

Como en los casos anteriores representamos los valores obtenidos (Tabla 7.23) así como la variación de la intensidad relativa obtenida con la concentración de CO₂ (Figura 7.54).

CO ₂ (%)	I	R	I ₀ -I ₁₀₀ /I ₀ -I
0	53	0	-
0,4	62	0,48	4,78
1	71	1,30	2,39
1,5	77	2,29	1,79
3	86	5,98	1,30
4	91	13,77	1,13
5	96	-	1,00

Tabla 7.23. Variación de intensidad con membranas de EC con nanopartículas. Media de dos réplicas.

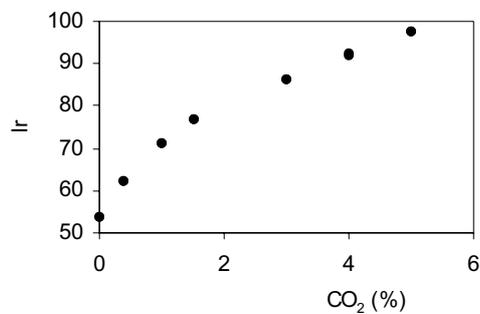


Figura 7.54 Variación de intensidad de fosforescencia con membranas de EC con nanopartículas.

Los resultados obtenidos se ajustaron a los dos modelos propuestos, encontrado que para el modelo RET (Figura 7.55) se obtiene la ecuación $y = 2,019x - 0,373$; $r^2 = 0,979$ que muestra linealidad hasta el 3% de CO_2 . Para el de filtro interno (Figura 7.56) se encuentra la función $y = 1,627x + 0,723$; $r^2 = 0,999$.

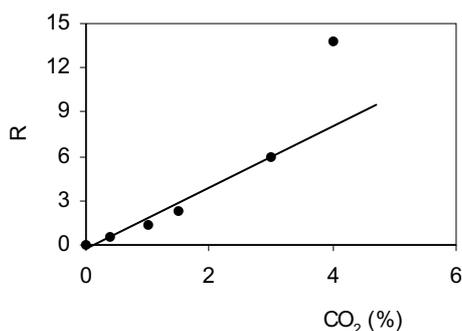


Figura 7.55 Calibrado lineal usando el modelo RET. Membrana de EC con nanopartículas.

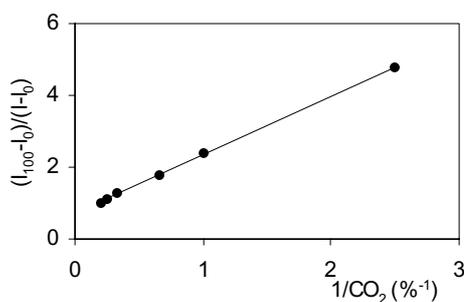


Figura 7.56 Calibrado lineal usando el modelo de filtro interno. Membrana de EC con nanopartículas.

El mecanismo predominante en estas membranas con nanopartículas en EC parece ser el de filtro interno con el que se obtienen un buen ajuste lineal para todo el rango de concentraciones haciendo uso de la instrumentación convencional.

Con objeto de aportar información que permita dilucidar el posible mecanismo de respuesta, se hizo un experimento para ver si había variación en el tiempo de vida de fosforescencia con diferentes concentraciones de CO_2 para estas membranas, llegando a la conclusión de que no varía este tiempo de vida. Los resultados se muestran en la Tabla 7.24. La Figura 7.57 muestra la cinética de emisión para concentraciones del 0 y 5% de CO_2 , obtenido mediante el espectrofluorímetro Cary Eclipse. El tiempo de vida no varía aunque sí lo hace la intensidad relativa de fosforescencia para estas mismas concentraciones como se muestra en la Figura 7.58. Estos datos refuerzan la hipótesis de que el mecanismo que justifica la respuesta a CO_2 es el filtro interno, a pesar de haber

incluido el luminóforo en nanopartículas, pues posiblemente sea necesario que su tamaño de partícula sea menor.

CO ₂	Tiempo vida (ms)
0,0%	0,100
0,1%	0,100
1,0%	0,099
5,0%	0,999

Tabla 7.24. Valores de tiempo de vida para distintas concentraciones de CO₂

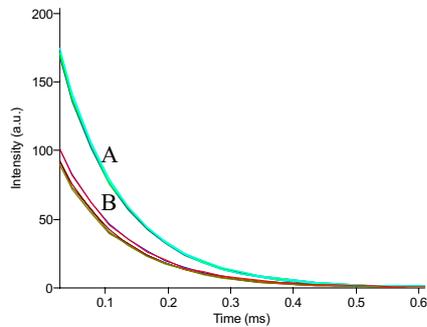


Figura 7.57 Espectro de tiempo de vida para estas membranas bajo concentraciones de A) 5% y B) 0% de CO₂.

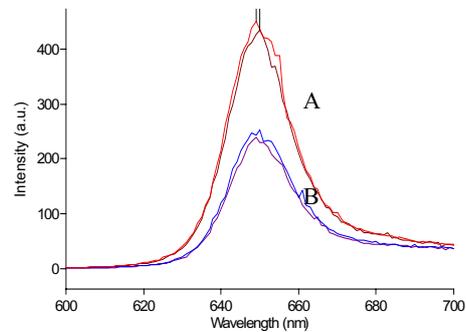


Figura 7.58 Espectro de emisión luminiscente para estas membranas bajo concentraciones de A) 5% y B) 0% de CO₂.

- Con el prototipo P02

Utilizando estas membranas se observa también un aumento de la señal obtenida al aumentar la concentración de CO₂, cuando hacemos uso del prototipo de medida P02. (Figura 7.59). En este caso no se hacen réplicas. Los valores obtenidos se muestran en la Tabla 7.25

CO ₂ (%)	I	R	I ₀ -I ₁₀₀ /I ₀ -I
0	31.526	0,00	-
0,2	34.804	0,36	5,30
0,4	38.628	1,07	2,45
1	41.971	2,34	1,66
1,5	43.921	3,86	1,40
2	44.817	5,05	1,31
3	47.038	12,94	1,12
4	47.887	25,12	1,06
5	48.897	-	1,00

Tabla 7.25. Valores obtenidos con la membrana de EC que con nanopartículas. Prototipo P02.

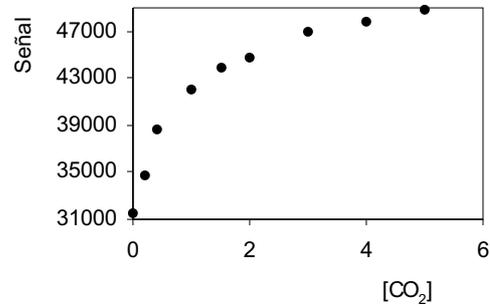


Figura 7.54 Variación de señal con CO₂. Membranas de EC con nanopartículas. P02

Mediante la aplicación a los datos experimentales de los dos modelos de trabajo podemos linealizar esta representación como se hace en los casos anteriores resultando para el modelo RET una ecuación lineal ($y = 2,554x - 0,056$; $r^2 = 0,997$) en el caso de aplicarla solo hasta el 2% de CO₂ (Figura 7.60). Para el caso del modelo de filtro interno la ecuación obtenida es $y = 0,857x + 0,793$ con un $r^2 = 0,979$, válida para todo el rango de concentraciones ensayadas (Figura 7.61).

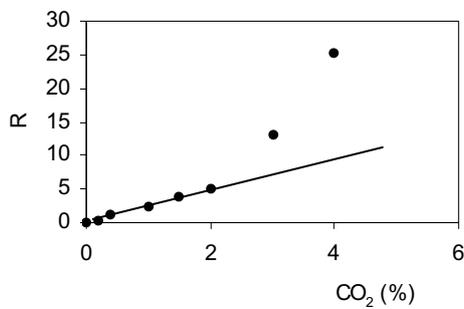


Figura 7.60 Calibrado lineal usando RET. Membrana de EC con nanopartículas.

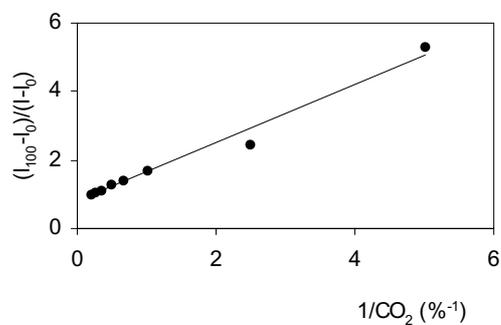


Figura 7.61 Calibrado lineal usando filtro interno. Membrana de EC con nanopartículas. Prototipo P04

Al igual que en el caso del empleo de instrumentación convencional se observa un ajuste lineal para todo el rango de concentraciones ensayadas por el mecanismo de filtro interno. En el caso del ajuste a mecanismo RET se obtienen dependencias lineales hasta el 3% de CO₂ con la instrumentación convencional y hasta el 2% con el prototipo P02, curvándose hacia arriba a continuación.

El mecanismo que da un mejor ajuste para este tipo de membranas es el de filtro interno que es aplicable a todo el rango de concentraciones de CO₂ ensayadas, como antes se ha discutido.

4.2.4.1. Capacidad de respuesta

Se estableció la respuesta de las membranas sensoras con nanopartículas en etilcelulosa a la variación alternante de atmósfera conteniendo un 1% de CO₂ y atmósfera de nitrógeno en el prototipo P02 (Figura 7.62).

En este caso los tiempos de respuesta $t(N_2 \rightarrow 1\%CO_2)$ y de recuperación $t(1\%CO_2 \rightarrow N_2)$ fueron de 67 y 292 s, respectivamente.

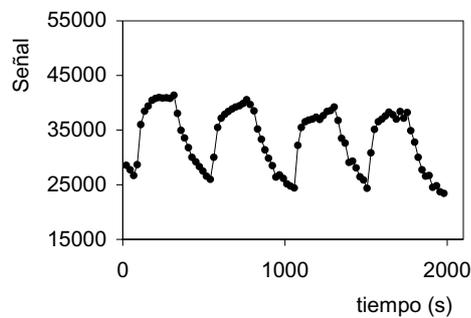


Figura 7.62 Capacidad de respuesta del prototipo P02 con membrana de EC con nanopartículas.

4.3. Fotodiodos recubiertos con nanopartículas en EC

En la instrumentación específica desarrollada para la medida de CO₂, prototipo P02, la zona sensora se encuentra fijada directamente en el fotodiodo como ya se comentó.

Para lograr el recubrimiento homogéneo se depositó sobre el fotodetector un pequeño volumen de cóctel del tipo usado anteriormente para la preparación de las membranas de EC con nanopartículas. La deposición se hizo como indica la figura 7.63.

Se prepararon fotodiodos recubiertos con 20 µL de un cóctel con la ayuda de una micropipeta sobre la superficie sensora del detector. Después de añadir los primeros 5 µL dejamos secar y volvemos a poner otros 5 µL para obtener la cantidad final deseada y se dejaron secar los fotodiodos en un recinto cerrado.

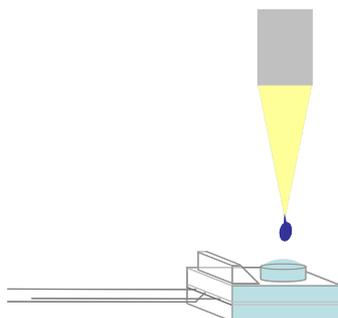


Figura 7.63. Preparación del fotodetector recubierto.

Cuando realizamos medidas con el prototipo P04 utilizando estos fotodiodos recubiertos se observa un aumento de la señal obtenida al aumentar la concentración de CO₂ al igual que en el caso de las membranas sensoras. Los valores recogidos en este experimento aparecen en la Tabla 7.26 y la respuesta a CO₂ en la Figura 7.63. En este caso no se hacen réplicas.

Tabla 7.26. Valores obtenidos para los fotodiodos recubiertos. Prototipo P02.

CO ₂ (%)	Señal	R	I ₀ -I ₁₀₀ /I ₀ -I
0	34.804	0,00	-
0,4	38.171	0,34	5,49
1,5	44.230	1,60	1,96
3	48.122	3,96	1,39
4	49.987	7,07	1,22
5	53.276	-	1,00

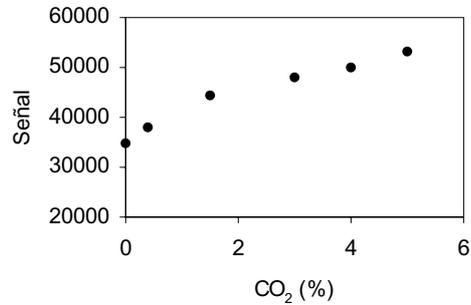


Figura 7.63 Señal obtenida con el P02 frente a la concentración usando fotodiodos recubiertos.

Cuando se ajustan los datos modelo RET se obtiene que $y = 1,079x - 0,038$; $r^2 = 0,997$ en el rango de concentraciones de 0,4 al 1,5% de CO₂ (Figura 7.64). Para el caso del modelo de filtro interno la ecuación obtenida es $y = 1,916x + 0,696$ con un $r^2 = 0,999$ para todo el rango de concentraciones ensayadas (Figura 7.65).

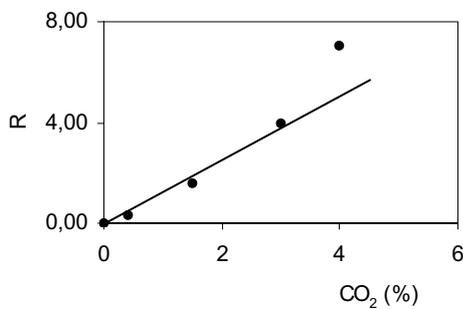


Figura 7.64 Calibrado lineal usando el modelo RET. Fotodiodos recubiertos.

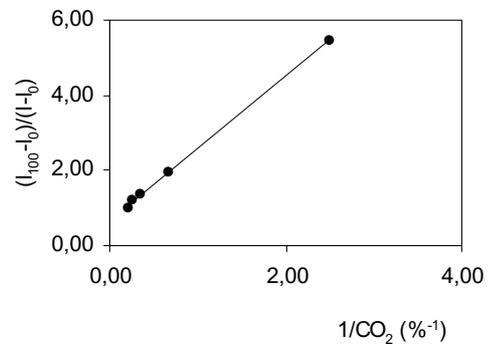


Figura 7.65 Calibrado lineal usando el modelo de filtro interno. Fotodiodos recubiertos.

Los resultados obtenidos con el prototipo P02 usando los fotodiodos recubiertos son similares a los obtenidos con las membranas. También con esta configuración el mecanismo de filtro interno es el que da un mejor ajuste y que es aplicable a todo el rango de concentraciones de CO_2 ensayadas, mientras que el mecanismo RET solamente es lineal hasta un 1,5 % en CO_2 .

4.3.1. Capacidad de respuesta

Se estudió la capacidad de respuesta del prototipo P02 con fotodiodos recubiertos a la variación alternante de atmósfera conteniendo un 5% de CO_2 y atmósfera de nitrógeno puro. (Figura 7.66).

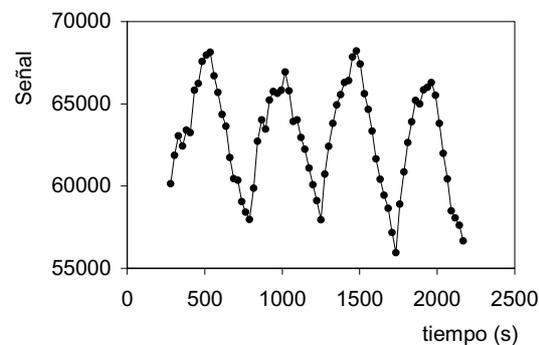


Figura 7.66. Capacidad de respuesta del prototipo P02 usando fotodiodos recubiertos.

Los tiempos de respuesta $t(\text{N}_2 \rightarrow 5\%\text{CO}_2)$ y de recuperación $t(5\%\text{CO}_2 \rightarrow \text{N}_2)$ encontrados fueron de 51 y 230 s, respectivamente.

4.3.2. Estabilidad

Es posible obtener medidas con el prototipo para dióxido de carbono e incluso obtener curvas de calibrado similares a las que se obtienen mediante instrumentación convencional. Sin embargo este sensor fabricado para la determinación de CO_2 tiene el problema de que no es estable en el tiempo. Cuando mantenemos este sistema bajo iluminación continuada la señal decae en un alto porcentaje como muestra la Figura 7.67.

Los datos han sido obtenidos mediante el prototipo P02. El porcentaje de caída de señal es de un 30% para 1,30 horas de iluminación continuada.

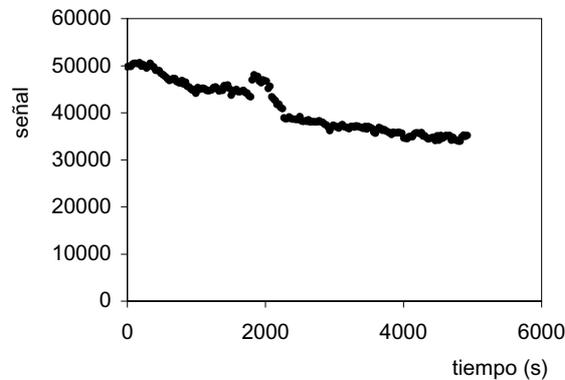


Figura 7.67. Estabilidad de las medidas realizadas con el prototipo P02 bajo iluminación continua.

5. Conclusiones

Se han usado diferentes estrategias para la determinación óptica de CO_2 utilizando un luminóforo interno de referencia como son: 1) el uso de una membrana de etilcelulosa donde se encuentran presentes tanto el luminóforo como el indicador de pH; 2) utilización de una membrana bicapa formada por una película de poliestireno y otra de D4 situadas a ambos lados del soporte de Mylar; 3) utilización de un sistema de membrana bicapa de poliestireno y poliuretano, que tiene el inconveniente de la interferencia por oxígeno, 4) uso de una membrana de doble capa, una impermeable a oxígeno de PVCD y otra de poliuretano; 5) empleo de una sola membrana utilizando nanopartículas de PVCD en las que se encapsula el material luminiscente, tanto en poliuretano como en EC y 6) utilización de fotodiodos recubiertos con esas nanopartículas en etilcelulosa.

En la Tabla 7.27 se recogen los resultados obtenidos relativos a rango de aplicación, acotado por el límite inferior del rango y el límite superior del rango para el calibrado RET y para el calibrado por filtro interno, así como el mecanismo predominante; los valores de pendientes para las rectas de calibrado obtenidas tanto en

RET como en filtro interno junto con el valor de r^2 ; el valor del cociente entre la señal máxima y la mínima, la señal máxima corresponde al 5% de CO_2 o el 1% cuando sólo ha sido ensayado hasta este porcentaje; y por último la desviación estándar relativa de las réplicas realizadas para la concentración en la que ésta sea mayor. Estos valores se obtuvieron para cada uno de los sistemas sensores a CO_2 mediante la instrumentación convencional y se dan para cada uno de los sistemas desarrollados.

Tabla 7.27. Resultados obtenidos para las distintas membranas fabricadas con la instrumentación convencional.

	En una sola membrana	Doble membrana		Nanopartículas	
matriz	EC	PS+D4	PVCD+D4	D4	EC
Modelo	RET	RET/FI	RET/FI	FI	FI
$b_{\text{(RET)}}$	24,3 $r^2=0,994$	11,018 $r^2=0,985$	3,245 $r^2=0,986$	2,222 $r^2=0,941$	2,019 $r^2=0,979$
$Li_{\text{(RET)}}$	0,02	0,04	0,1	0,4	0,4
$Ls_{\text{(RET)}}$	0,4%	0,4	2,5	1,5	3
$b_{\text{(FI)}}$	0,117 $r^2=0,982$	0,374 $r^2=0,988$	0,444 $r^2=0,989$	5,408 $r^2=0,977$	1,627 $r^2=0,999$
$Li_{\text{(FI)}}$	0,04	0,08	0,4	1	0,4
$Ls_{\text{(FI)}}$	1	1	5	5	5
I_0/I_5	2,09	2,82	1,27	5,21	1,81
(DER)	2,66%	4,45%	1,24%	2,03%	1,12%

En la Tabla 7.28 mostramos los resultados obtenidos para estos sistemas con la instrumentación portátil desarrollada. En este caso además de los parámetros anteriores se recogen también los tiempos de respuesta ($t(\text{N}_2 \rightarrow 1\% \text{CO}_2)$) y tiempos de recuperación ($t(1\% \text{CO}_2 \rightarrow \text{N}_2)$).

Tabla 7.28 Resultados obtenidos para las distintas membranas fabricadas con el prototipo P02.

matriz	Doble membrana		Nanopartículas	Fotodiodos
	PS+D4	PVCD+D4	EC	EC
Modelo	RET/FI	RET/FI	FI	FI
b_(RET)	6,948 $r^2=0,978$	4,592 $r^2=0,991$	2,554 $r^2=0,997$	1,079 $r^2=0,997$
Li_(RET)	0,04	0,2	0,2	0,4
Ls_(RET)	0,24	1,6	2	1,5
b_(FI)	0,191 $r^2=0,995$	1,313 $r^2=0,992$	0,857 $r^2=0,979$	1,916 $r^2=0,999$
Li_(FI)	0,08	0,2	0,2	0,4
Ls_(FI)	1	5	5	5
I₀/I₅	1,21	2,21	1,55	1,53
(DER)	2,53%	-	-	-
t(N₂→1%CO₂)	95	57	67	51
t(1%CO₂→N₂)	237	115	292	230

Por tanto se ha conseguido la preparación de sensores ópticos para la medida de dióxido de carbono basados en medidas luminiscentes. Estas medidas se han llevado a cabo con instrumentación convencional y también con la instrumentación portátil aquí desarrollada dando en ambos casos resultados similares.

En una primera aproximación se desarrollaron membranas colorimétricas capaces de responder a variaciones en la concentración de CO₂ midiendo absorción de radiación. Teniendo estos resultados se preparó un sistema en el que tanto el indicador de pH como el luminóforo se encontraban dentro de una misma membrana sensora con lo que se consiguió la medida de CO₂ con la instrumentación convencional midiendo fluorescencia.

El inconveniente de este sistema es que nuestra instrumentación portátil no es capaz de medir fluorescencia.

Por este motivo se desarrollaron membranas bicapa superponiendo una membrana colorimétrica sensible a CO_2 sobre la membrana fabricada para la determinación de oxígeno. De esta manera se puede medir CO_2 con nuestra instrumentación portátil. El oxígeno es un interferente para este sistema y se trató de eliminar empleado polímeros que actúan como barrera a oxígeno. De esta forma se preparó un sistema bicapa de PVCD y D4 pudiéndose de este modo determinar el CO_2 también con nuestra instrumentación portátil y evitando la influencia de oxígeno.

Por último se desarrolló un sistema en el que el luminóforo está atrapado en nanopartículas del material impermeable a oxígeno con el fin de poder preparar fotodetectores recubiertos que se acoplen directamente al prototipo.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en los estudios realizados en esta Tesis Doctoral nos han llevado a las siguientes conclusiones:

1. Se han preparado y caracterizado mediante instrumentación de sobremesa, membranas sensoras para oxígeno basadas en atenuación de luminiscencia utilizando diferentes polímeros y formas de preparación. En la Tabla 1 se muestran los resultados obtenidos en términos de sensibilidad, pendiente de Stern-Volmer y rango lineal para cada tipo de membrana:

Tabla 1. Caracterización de membranas para O₂ mediante instrumentación de sobremesa.

Membrana	I_0/I_{100}	$K_{SV}, \%^{-1}$	Rango lineal
PVC	1,52	0,012	1% al 100%
Silicona	4,53	0,058	1% al 55%
PS	11,91	0,789	1% al 14%
Poli (IBM-TFEM)	1,63	0,108	1% al 5%
PS (DABCO)	5,85	0,297	1% al 10%

2. Las propiedades sensoras que exhiben dichas membranas se han establecido de manera que sean compatibles con los requerimientos de la instrumentación portátil que se ha desarrollado en el contexto de esta Tesis Doctoral, en cuanto a compatibilidad con fuente de excitación (LED) y detector ópticos dentro del espectro visible, alta intensidad y tiempo de vida y buena estabilidad.
3. El principio de medida de los prototipos desarrollados se basa en un aspecto novedoso ya que parte del uso de un elemento fotodetector con salida binaria cuyo valor de salida digital depende de que la intensidad luminosa recibida, esté por encima o por debajo de un umbral determinado. De manera, que al comenzar la emisión fosforescente, la intensidad luminosa se mantiene por encima de dicho umbral, produciendo una salida en estado alto del dispositivo fotodetector. Cuando decae la misma y rebasa el umbral fijado, se produ-

ce la transición de la salida del mencionado fotodetector a estado bajo con un retardo de pocos microsegundos. El comienzo de la mencionada señal en estado alto se fija cuando cesa la alimentación al diodo emisor de luz mediante los circuitos lógicos adecuados y las señales de control de la unidad central de proceso. Por tanto, no se trata de una medida de la intensidad o del tiempo de vida de la emisión, ni de la integración de la corriente producida por los fotodetectores convencionales al ser excitados con una señal luminosa, sino de un parámetro temporal en el que intervienen ambas características de la emisión luminosa.

4. Se ha logrado la inclusión de las membranas sensoras desarrolladas para oxígeno en los prototipos instrumentales puestos a punto, tanto mediante la ubicación de una zona sensora entre la fuente de radiación y el fotodetector, como mediante el recubrimiento de los fotodetectores. Este último procedimiento ha resultado especialmente interesante en cuanto a la integración del sensor y detector, haciendo posible una gran alineación de componentes en la zona sensora, un robustecimiento del sistema y posibilitando la sustitución rápida de la zona sensora.
5. Se han caracterizado los diferentes prototipos instrumentales desarrollados para oxígeno, encontrando las características que se resumen en la Tabla 2.

Tabla 2. Características de membranas para O₂ mediante la instrumentación portátil.

Membrana	Prototipo	I ₀ /I ₁₀₀	K _{SV} (% ⁻¹)	Rango (%)	t(O ₂ → N ₂) (s)	t(N ₂ → O ₂) (s)
PVC	P01	1,55	0,009	1 al 100	63	31
PS	P01	3,40	0,47*	1 al 30	60	25
Poli (IBM-TFEM)	P02	1,64	0,110	1 al 20	90	20
PS (DABCO)	P02	8,36	4,00*	1 al 30	49	18
Fotodetectores recubiertos	P04	10,13	3,12*	1 al 30	48	17

* Pendiente de la representación de Stern-Volmer modificada

6. Se han estudiado una serie de gases potencialmente interferentes en la determinación de oxígeno, encontrando que el único que es un notable interferente es el dióxido de azufre que también es atenuador de luminiscencia y, por tanto, su interferencia es reversible. La Tabla 3 muestra el porcentaje de gas que provoca una interferencia $\leq 2\%$ en señal midiendo en condiciones del 20% de O_2 .

Tabla 3. Porcentaje de gas que provoca una interferencia $\leq 2\%$ en señal.

Compuesto	Concentración (%)
Metano	43,1
Protóxido de nitrógeno	80,0*
Dióxido de carbono	1,0*
Dióxido de azufre	3,2
Sulfuro de hidrógeno	5,0*

* Concentración máxima ensayada

7. Se ha estudiado la calibración de esta instrumentación con corrección térmica, justificando la influencia de la temperatura. De los modelos desarrollados para justificarla, el modelo finalmente empleado es el que se muestra a continuación:

$$[O_2] = a_{00} + a_{01}T + A_1 \cdot I^{-1/2} + A_2 \cdot T \cdot I^{-1/2} + A_3 \cdot T^2 \cdot I^{-1/2}$$

Se han establecido sus parámetros por medio de una experiencia con 11 fotodetectores recubiertos y el conocimiento de la interconexión de estos parámetros, ha permitido la calibración en un punto en el último prototipo desarrollado (P04), lo que posibilita además la corrección térmica entre -10 y 50°C .

8. El prototipo portátil de medida de oxígeno final desarrollado, P04, tiene las siguientes características técnicas dadas en la Tabla 4.

Tabla 4. Especificaciones técnicas del P04 para O₂.

Alimentación	batería PP3 9 V/ transformador AC/DC 12 V
Rango de temperatura	-10 °C - 50°C
Rango de concentración de O₂	1 - 30 %
Consumo promedio	8,75 mW
Resolución	0,5% en concentración
Exactitud	1% en concentración
tiempo de respuesta:	< 30 s (10%-90% rango total)
Deriva	<0,02% concentración/día
Dimensiones (HxLxW)	28mm x 110mm x 66mm
Peso	95 g (sin batería)

9. Se han establecido diferentes estrategias para el desarrollo de membranas sensoras de tipo óptico para la determinación de dióxido de carbono, de manera que puedan ser medidas con la misma instrumentación usada para el caso del oxígeno. La relación entre luminiscencia y concentración de dióxido de carbono se ha realizado a través de un indicador ácido base mediante mecanismos de transferencia de energía de resonancia (RET) y de filtro interno (FI). Se han caracterizado estas membranas mediante la instrumentación de sobremesa puesta a punto y los resultados se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5. Parámetros característicos de la membranas para CO₂ obtenidos mediante instrumentación de sobremesa.

	Membrana homogénea		Doble membrana		Membrana con nanopartículas	
Matriz	EC	PS+D4	PVCD+D4	D4	EC	
Modelo	RET	RET/FI	RET/FI	FI	FI	
b_(RET)	24,3	11,018	3,245	2,222	2,019	
b_(FI)	0,117	0,374	0,444	5,408	1,627	
I₀/I₅	2,09	2,82	1,27	5,21	1,81	

10. Se han preparado y utilizado nanopartículas conteniendo el material luminóforo encapsulado en su interior, para fabricar membranas heterogéneas que responden a dióxido de carbono y evitan la interferencia de oxígeno, pudiendo realizar las medidas de dióxido de carbono en presencia de este gas.
11. Se ha logrado la inclusión de membranas sensoras para dióxido de carbono en la misma instrumentación portátil desarrollada para oxígeno, así como el recubrimiento, también en este caso, de los fotodetectores. Las características diferenciales de esta instrumentación portátil se encuentran en la Tabla 6.

Tabla 6. Parámetros característicos de la membranas para CO₂ obtenidos mediante la instrumentación portátil desarrollada.

	Doble membrana		Membrana con nanopartículas	Fotodiodos recubiertos
Matriz	PS+D4	PVCD+D4	EC	EC
Modelo	RET/FI	RET/FI	FI	FI
b_(RET)	6,948	4,592	2,554	1,079
b_(FI)	0,191	1,313	0,857	1,916
I₀/I₅	1,21	2,21	1,55	1,53
t(N₂→1%CO₂)	95	57	67	51
t(1%CO₂→N₂)	237	115	292	230

12. En la Tabla 7 se muestran las características técnicas diferenciales del prototipo para dióxido de carbono.

Tabla 4. Especificaciones técnicas del prototipo para CO₂.

Rango de concentración de CO₂	0,02 - 5 %
Resolución	0,25% en concentración
Exactitud	0,25% en concentración
Tiempo de respuesta	< 55 s (10%-90% rango total)
Tiempo de recuperación	< 235 s (10%-90% rango total)

BIBLIOGRAFÍA

CAPÍTULO 1

- (1) J. Janata , M. Jasowicz P. Vanysev y D.M. De Vaney, Anal. Chem, 70, 179R (1998).
- (2) B.R. Eggins, Chemical Sensors and Biosensors, John Wiley & Son, 2002.
- (3) Pérez Conde, Sensores Ópticos, 1 ed., Servicio de Publicaciones Universidad de Valencia (1996).
- (4) P.T. Moseley, Meas. Sci. Technol., 8, 223 (1997).
- (5) H.D. Wiemhofer y W. Gopel, Sens. Actuators B, 4, 365 (1991).
- (6) D.E. Williams, Sens. Actuators B, 57, 1 (1999).
- (7) C.K. Ho, M. Kelley, I. Tamura y R.C. Hughes, SAND2001-0643 (2001).
- (8) M. Koji, S. Hiroyuki y S. Yasuo, Bunseki Kagaku, 54, 83 (2005).
- (9) C. Kolle, W. Gruber, W. Trettnak, K. Biebrnik, C. Dolezal, F. Reininguer, P. O. Leary, Sens. Actuators B, 38, 141 (1997).
- (10) T. M. A. Razek, M. J. Miller, S. S. M. Hassan y M. A. Arnold, Talanta 50, 491 (1999).
- (11) D.Y. Sasaki, S. Singh, J.D. Cox y P.I. Pohl., Sens. Actuators B, 72, 51 (2001).
- (12) C. Huber, T. Werner, O.S. Wolfbeis, D.E. Bell y S. Young, Optical-chemical Sensor, U.S. Patent 20020034826 (2003).
- (13) S. Kar y M.A. Arnold, Talanta, 42, 663 (1995).
- (14) A.E. Colvin, T.E. Phillips, J.A. Miragliotta, R.B. Givens, C.B. Bargeron., John Hopkins Apl. Technical Digest, 17, N4 (1996).
- (15) R. Ramamoorthy, P.K. Dutta y S.A. Akbar, J. Mat. Sci. 38, 4271 (2003).
- (16) A. D. Brailsford y E. M. Logothetis, Sens. Actuators B, 52, 195 (1998).
- (17) M. Li y Y. Chen, Sens. Actuators B, 32, 83 (1996).
- (18) M. Carano, K.B. Holt y A.J. Bard, Anal. Chem. 75, 5071 (2003).
- (19) C.L. Clark, Trans. Am. Soc., 2, 41 (1956).
- (20) W. Göpel y K.D. Schierbaum, Sens. Actuators B, 26, 1 (1995).
- (21) H. Yan y J. Lu, Field Anal.Chem.Tech., 1, 175 (1997).
- (22) Analyticon Instrument Corporation, www.analyticon.com (2005).
- (23) E. Singer, G.L. Duveneck, M. Ehrat y H.M. Widmer, Sens. Actuators A, 41, 542 (1994).
- (24) P. Hartmann, M.P.J. Leiner y M.E. Lippitsch, Anal. Chem., 67, 88 (1995).
- (25) W. Xu, R. Schmidt, M. Whaley, J.N. Demas, B.A. DeGraff, E.K. Karikari y B.L. Farmer, Anal. Chem., 67, 3172 (1995).

- (26) J.R. Bacon y J.N. Demas, *Anal.Chem.*, 59, 2780 (1987).
- (27) E.R. Carraway, J.N. Demas, B.A., DeGraff y J.R. Bacon, *Anal. Chem.*, 63, 332 (1991).
- (28) J.M. Vanderkooi, G. Maniara, T.J. Green y D.F. Wilson, *J. Biol. Chem.*, 262, 5476 (1987).
- (29) I. Troyanovsky, N. Sadovskii, M. Kuzmin, V. Mosharov, A. Orlov, V. Radchenko y S. Phonov, *Sens. Actuators B*, 11, 201 (1993).
- (30) M.J. Morris, J.F. Donovan, J.T. Kegelman, S.D. Schwab, R.L. Levy y R.C. Crites, *AIAAJ*, 31, 419 (1993).
- (31) B.G. McLachlan y J.H. Bell, *Exp. Therm. Fluid. Sci.*, 10, 470 (1995).
- (32) K.A. Kneas, W. Xu, J.N. Demas y B.A. DeGraff, *App.Spec.*, 51, 1346 (1997).
- (33) R.E. Slovacsek y K.J. Sullivan, US Patent 6,074,607 (2000).
- (34) A. Sanz-Medel, R. Pereiro-García, M.E. Diaz-Garcia y Y.M. Liu, EP 065355 (1994).
- (35) T.B. Hirschfeld, US Patent 4,577,109 (1986).
- (36) J. Kane, US Patent 4,785,814 (1988).
- (37) W. Trettnak, W. Gruber, F. Reiningger y I. Klimant, *Sens. Actuators B*, 29, 219 (1995).
- (38) D. Xiao, Y. Mo y M.M.F. Choi, *Meas. Sci. Technol.*, 14, 862 (2003).
- (39) D.B. Papkovsky, G.V. Ponomarev, V. Ogurtsov y A. Dvornikov, *Biochem. Med. Sens.*, 54, 2085 (1993).
- (40) C.C. Stanley y J.L. Kropp, US Patent 3,725,658 (1971).
- (41) D.W. Lubbers y N. Opitz, US Patent 4,003,707 (1977).
- (42) J.R. Bacon y J.N. Demas, US Patent 5,030,420 (1991).
- (43) J.N. Demas y B.A. DeGraff, *Sens. Actuators B*, 11, 35 (1993).
- (44) A. Mills, *Sens. Actuators B*, 51, 60 (1998).
- (45) B. Stevens, US Patent 3,612,866 (1971).
- (46) J.I. Peterson y R.V. Fitzgerald, US Patent 4,476,870 (1984).
- (47) G.E. Khalil, M.P. Gouterman y E. Green, US Patent 4,810,655 (1989).
- (48) P.K. Dasgupta, I.Y. Eom, K.J. Morris y J. Li, *Anal. Chim. Acta*, 500, 337 (2003).
- (49) Z.Z. Chen, J. Zhao, Z.X. Qin, X.D. Hu, T.J. Yu, Y.Z. Tong, Z.J. Yang, X.Y. Zhou, G.Q. Yao, B. Zhang y G.Y. Zhang, *Phys. Stat. Sol. B*, 241, 2664 (2004).
- (50) A.N. Watkins, B.R. Wenner, J.D. Jordan, W. Xu, J.N. Demas y F.V. Bright, *Appl. Spec.*, 52, 750 (1998).
- (51) Ocean Optics, <http://www.oceanoptics.com/products/foxytheory.asp#how> (2001).
- (52) Fluorometrix, <http://www.fluorometrics.com/Default.asp> (2004).
- (53) M.E. Lippitsch, J. Pusterhofer, M.J.P. Leiner y O.S. Wolfbeis, *Anal. Chim. Acta*, 205, 1 (1988).

-
- (54) G. Holst, T. Köster, E. Voges y D.W. Lübbers, *Sens. Actuators B*, 29, 231 (1995).
- (55) W. Trettnak, C. Kolle, F. Reninger, C. Dolezal y P. O'Leary, *Sens. Actuators B*, 35-36, 506 (1996).
- (56) C. McDonagh, C. Kolle, A.K. McEvoy, D.L. Dowling, A.A. Cafolla, S.J. Cullen y B.D. MacCraith, *Sens. Actuators B*, 74, 124 (2001).
- (57) A.E. Colvin, T.E. Phillips, J.A. Miragliotta, R.B. Givens y C.B. Barger, *John Hopkins APL Tech. Digest* 17, 377 (1996).
- (58) A.E. Colvin, US Patent 5,910,661 (1999).
- (59) J.N. Dukes, W.F. jr Carlsen y R.J. Pittaro, US Patent 4,716,363 (1987).
- (60) J.D.S. Danielson, US Patent 6,157,037 (2000).
- (61) PhotoSense LLC, Optical Oxygen Sensor, <http://www.photosense.com/products.html>. (2004).
- (62) D. Andrzejewski, I. Klimant y H. Podbielska, *Sens. Actuators B*, 84, 160 (2002).
- (63) R.J. Alcalá, EP 442276 (1991).
- (64) J.G. Bentsen, US Patent 5,518,694 (1996).
- (65) G. Allen, H.K. Hui y A. Gottlieb, US Patent 5,094,959 (2004).
- (66) S.M. Klainer, K. Goswami, US Patent 5,094,958 (1992).
- (67) E.D. Lee, T.C. Werner y W.R. Seitz, *Anal.Chem.*, 59, 279 (1987).
- (68) Y. Kostov y G. Rao, *Sens. Actuators B*, 90, 139 (2003).
- (69) J. Kane, R. Martin y A. Perkovich, US Patent 5,728,422 (1998).
- (70) B.L. Hauenstein, R. Picerno, H.G. Brittain y J.R. Nestor, US Patent 4,861,727 (1989).
- (71) J.R. Nestor, J.D. Schiff y B.H. Priest, US Patent 4,900,933 (1990).
- (72) H. Xu, J.W. Aylott, R. Kopelman, T.J. Miller y M.A. Philbert, *Anal.Chem.*, 73, 4124 (2001).
- (73) C.C. Nagel, J.G. Bentsen, M. Yafuso, A.R. Katritzky, J.L. Dektar y C.A. Kipke, US Patent 5,498,549 (1996).
- (74) R.S. Atkinson, D.R.G. Brimage, R.S. Davidson y E. Gray, *J.C.S. Perkin Trans.*, 960 (1973).
- (75) P. Hartmann y M.J.P. Leiner, US Patent 6,254,829 (2001).
- (76) K.P. Lo, US Patent 6,207,961 (2001).
- (77) W. Trettnak, *Optical Sensors Based on Fluorescence Quenching*, in O.S. Wolfbeis, ed., *Fluorescence Spectroscopy - New Methods and Applications*, Springer, Berlin, 1993, p. 79.
- (78) J.N. Demas, y B.A. DeGraff, *Proc. SPIE*, 1796, 71 (1993)
- (79) I. Klimant y G. Holst, US Patent 6,303,386 (2001).
- (80) FOXY Fiber Optic Oxygen Sensor System Manual, Ocean Optics (2002).
- (81) M.M.F. Choi y D. Xiao, *Analyst*, 124, 695 (1999).

- (82) A. Severinghaus y B. Freeman, *J. Appl. Physiol.*, 13, 515 (1958).
- (83) O.S. Wolfbeis, *Fiber Optical Sensors and Biosensors*, CRC Press, Ann Arbor, 1991.
- (84) H. Saari, R. Mannila, J. Antila, M. Blomberg, O. Rusanen, J. Tenhunen, L. Wolf y B. Harnisch, *Preparing for the Future* 10, 4 (2000).
- (85) J.L. Gehrich, D.W. Lubbers, N. Opitz, D.R. Hansmann, W.W. Miller, J.K. Tusa y M. Yafuso, *IEEE Trans. Bio-Med. Eng.*, 33, 117 (1986).
- (86) D.W. Lubbers y N. Opitz, *Zeitsch. Natur. C*, 30c, 532 (1975).
- (87) W.W. Miller, M. Yafuso, C.F. Yan, H.K. Hui y S. Arick, *Clin. Chem.*, 33, 1538 (1987).
- (88) D.W. Lubbers y N. Opitz, *Adv. Exp. Med. Biol.*, 75, 65 (1976).
- (89) G.G. Vurek, P.J. Feustel y J.W. Severinghaus, *Ann. Biomed. Eng.*, 11, 499 (1983).
- (90) C.G. Cooney y B.C. Towe, *Biosensors Bioelectron.*, 12, 11 (1997).
- (91) D.W. Lubbers y N. Opitz, *Anal. Chem. Symp. Ser.*, 17, 609 (1983).
- (92) M. Uttamlal y D.R. Walt, *Bio. Technology*, 13, 597 (1995).
- (93) O.S. Wolfbeis, L.J. Weis, M.J.P. Leiner y W.E. Ziegler, *Anal. Chem.*, 60, 2028 (1988).
- (94) Z. Zhujun y R. Seitz, *Anal. Chim. Acta*, 160, 305 (1984).
- (95) J.A. Ferguson, B.G. Healey, K.S. Bronk, S.M. Barnard y D.R. Walt, *Anal. Chim. Acta*, 340, 123 (1997).
- (96) C. Munkholm, D.R. Walt y F.P. Milanovich, *Talanta* 35, 109 (1988).
- (97) T. Hirschfeld, F. Miller, S. Thomas, H. Miller, F. Milanovich y R. Gaver, *J. Lightwave Tech.*, 5, 1027 (1987).
- (98) H.J. Marsoner, H. Kroneis y O.S. Wolfbeis, Austrian Patent 386.078 (1986).
- (99) M.J.P. Leiner, *Anal. Chim. Acta*, 255, 209 (1991).
- (100) S. Hahn, A. Nelson, M. Bennett y H.K. Hui, EP 0601816 (1994).
- (101) J.B. Yim, T.W. Hubbard, L.D. Melkerson, M.A. Sexton y B.M. Fieggen, US Patent 5,047,627 (1991).
- (102) J.W. Parker, O. Laksin, C. Yu, M.L. Lau, S. Klima, R. Fisher, I. Scott y B.W. Atwater, *Anal. Chem.*, 65, 2329 (1993).
- (103) Y. Kawabata, T. Kamichika, T. Imasaka y N. Ishibashi, *Anal. Chim. Acta*, 219, 223 (1989).
- (104) I D.B. Raemer, D.R. Walt y C. Munkholm, US Patent 5,005,572 (1991).
- (105) A. Mills, Q. Chang, N. McMurray, *Anal. Chem.*, 64, 1383 (1992).

- (106) A. Mills y N. McMurray, US Patent 5,472,668 (1995).
- (107) A. Mills y L. Monaf, *Analyst*, 121, 535 (1996).
- (108) B.H. Weigl y O.S. Wolfbeis, *Sens. Actuators B*, 28, 151 (1995).
- (109) F. Baldini, A. Falai, A.R. De Gaudio, D. Landi, A. Lueger, A. Mencaglia, D. Scherr y W. Trettnak, *Sens. Actuators B* 90, 132 (2003).
- (110) B.H. Weigl y O.S. Wolfbeis, *Anal. Chim. Acta*, 302, 249 (1995).
- (111) A. Mills y Q. Chang, *Analyst*, 118, 839 (1993).
- (112) B. Müller y P.C. Hauser, *Analyst*, 121, 339 (1996).
- (113) G. Neurauder, O. Klimant y O.S. Wolfbeis, *Fresenius J. Anal. Chem.*, 366, 481 (2000).
- (114) O.S. Wolfbeis, B. Kovacs, K. Goswami y S.M. Klainer, *Mikrochim. Acta*, 129, 181 (1998).
- (115) C. Malins y B.D. MacCraith, *Analyst*, 123, 2373 (1998).
- (116) H. Segawa, E. Ohnishi, Y. Arai y K. Yoshida, *Sens. Actuators B*, 94, 276 (2003).
- (117) X. Ge, Y. Kostov y G. Rao, *Biosen. Bioelectron.*, 18, 857 (2003).
- (118) Y. Amao y N. Nakamura, *Sens. Actuators B*, 100, 351 (2004).
- (119) N. Nakamura y Y. Amao, *Anal. Bioanal. Chem.*, 376, 642 (2003).
- (120) A. Mills y K. Eaton, *Quim. Anal.*, 19, 75 (2000).
- (121) K. Ertekin, I. Klimant, G. Neurauder y O.S. Wolfbeis, *Talanta*, 59, 261 (2003).
- (122) C.V. Bültzingslöwen, A.K. McEvoy, C. McDonagh, B.D. MacCraith, I. Klimant, K. Christian y O.S. Wolfbeis, *Analyst*, 127, 1478 (2002).
- (123) J.R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Kluwer Academic, Plenum Publishers, New York, 1999.
- (124) C.V. Bültzingslöwen, A.K. McEvoy, C. McDonagh y B.D. MacCraith, *Anal. Chim. Acta*, 480, 275 (2003).
- (125) G. Neurauder, I. Klimant y O.S. Wolfbeis, *Anal. Chim. Acta*, 382, 67 (1999).
- (126) P. Herman, Z. Murtaza y J.R. Lakowicz, *Anal. Biochem.*, 272, 87 (1999).
- (127) G. Orellana, M.C. Moreno-Bondi, E. Segovia y M.D. Marazuela, *Anal. Chem.*, 64, 2210 (1992).
- (128) M.D. Marazuela, M.C. Moreno Bondi y G. Orellana, *Sens. Actuators B*, 29, 126 (1995).
- (129) W. Rabitsch, A. Nikolic, P. Schellongowski, J. Kofler, P. Kraft, C.G. Krenn, T. Staudinger, G.J. Locker, P. Knobl, R. Hofbauer y M. Frass, *Am J. Emerg. Med.*, 22, 4 (2004).

CAPÍTULO 2

- (1) K. Seiler y W. Simon, *Anal. Chim. Acta*, 266, 73 (1992).
- (2) Y. Amao, T. Miyashita y I. Okura, *Anal. Chim. Acta*, 421, 167 (2000).
- (3) T. Werner, I. Klimant y O.S. Wolfbeis, *Analyst*, 120, 1627 (1995).

CAPÍTULO 4

- (1) J.N. Demas, E.W. Harris y R.P. McBride, *J. Am. Chem. Soc.*, 99, 3547 (1977).
- (2) Q.C. Mulazzani, H. Sun, M.Z. Hoffman, W.E. Ford y M.A.J. Rodgers, *J. Phys. Chem.*, 98, 1145 (1994).
- (3) O.S. Wolfbeis, *Fiber Optic Chemical Sensors and Biosensors*, CRC Press, vol. 2, p. 19 (1991).
- (4) S.K. Lee y I. Okura, *Spectrochim. Acta A*, 54, 91 (1998).
- (5) J.N. Demas, B.A. DeGraff, *Sens. Actuators B*, 11, 35 (1993).
- (6) W.R. Vieth y M.A. Amini, *Permeability of Plastic Films and Coating to Gases, Vapours and Liquids*, Plenum Press, New York, 1974, p 49.
- (7) X.M. Li y K.Y. Wong, *Anal. Chim. Acta*, 262, 27 (1992).
- (8) H. Chuang y M.A. Arnold, *Anal.Chim.Acta*, 368, 83 (1998).
- (9) M. Gouterman, *The Porphyrins*, Academic Press, New York, vol 3, cap. 1, 1979.
- (10) Y. Amao, K. Asai y I. Okura., *J. Porphyrins Phthalocyanines*, 4, 292 (2000)
- (11) J.Brandrup, E.H. Immergut y E.A. Grulke, *Polymer Handbook*, VI-543, John Wiley & Sons, New York, 1999.
- (12) A. Mills y M. Thomas, *Analyst*, 122, 63 (1997).
- (13) A. Apostolidis, I. Klimant, D. Andrzejewski y O.S. Wolfbeis, *J. Comb. Chem*, 6, 325 (2004).
- (14) J.R. Bacon y J.N. Demas, *Anal. Chem.*, 59, 2780 (1987).

CAPÍTULO 5

- (1) D.B. Papkovsky, G.V. Ponomarev y W. Trettnak, *Anal. Chem.*, 67, 4112 (1995).
- (2) S.K. Lee y I. Okura, *Anal. Commun.*, 34, 185 (1997).
- (3) G. E. Khalil, M. P. Gouterman y E. Green, US Patent 5,043,286 (1991).
- (4) Y. Amao, T. Miyashita y I. Okura, *Analyst*, 125, 871 (2000).
- (5) A.G. Pittman, Wiley Interscience, *Fluoropolymers*, New York, p446 (1972).
- (6) A. Yutaka, M. Tokuji y O. Ichiro, *Reac. Func. Polymers*, 47, 49 (2001).
- (7) R.N. Gillanders, M.C.Tedford, P.J. Crilly y R.T. Baey, *J. Photochem. Photobiol. A*, 163, 193 (2004).
- (8) P.P.Levin y S.M. Costa, *Chem. Physics*, 263, 423 (2001).
- (9) ¹ R. L. Clough, N. C. Billingham y K. T. Gillen; *Polymer durability*, *Advances in Chemistry Series 249*, ACS, Washington, (1996).
- (10) R.A. Ackerman, J.Rosenthal y J.N. Pitts, *J. Chem. Phys.*, 54, 4960 (1971).
- (11) K. Furukawa y E.A. Ogryzlo, *Chem. Phys. Letters*, 12, 370, (1971).
- (12) C.S. Foote, T.T. Fujimoto y Y.C. Chang, *Tetrah. Letters*, 45 (1972).
- (13) P. Hartmann, M.J.P. Leiner y P.Kohlbacher, *Sens. Actuators B*, 51, 196 (1998).
- (14) S.K. Lee y I. Okura, *Spectrochim. Acta A*, 54, 91 (1998).
- (15) W. Trettnak y O.S. Wolfbeis, *Fluorescence Spectroscopy, New Methods and Applications*. Ed Springer-Verlag, Berlin, p. 79 (1993).
- (16) D.B. Papkovsky, N. Papkovskaia, A. Smyth, J. Kerry y V.I. Ogurtsov., *Anal. Letters*, 33, 1755 (2000).
- (17) J.R.Bacon y J.N.Demas, *Anal. Chem.*, 59, 2780 (1987).
- (18) D.B. Papkovsky, M.A. Uskova, G.V. Ponomarev, T. Korpela, S. Kulmala y G.G. Guilbault, *Anal. Chim. Acta* 374, 1 (1998).
- (19) T.M.A. Razek, M.J. Miller, S.S.M. Asan y M.A. Arnold, *Talanta* 50, 491 (1999).

CAPÍTULO 6

- (1) O.S. Wolfbeis, *Fluorescence Spectroscopy: New Methods and Applications*, Springer, Berlin, (1993).
- (2) Ocean Optics, Theory of Operation, <http://www.oceanoptics.com/Products/foxytheory.asp>, (2005)

CAPÍTULO 7

- (1) Y. Amao y N. Nakamura, *Sens. Actuators B*, 100, 347 (2004).
- (2) A. Mills, Q. Chang y N. McMurray, *Anal. Chem.* 64, 1383 (1992).
- (3) G. Neurauter, I. Klimant y O.S. Wolfbeis, *Anal. Chim. Acta.*, 382, 67 (1999).
- (4) J.R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Plenum Publisher, New York, p.382 (1999).
- (5) X. Ge, Y. Kostov y G. Rao, *Biosen. Bioelectronics*, 18, 857 (2003).
- (6) A. Mills, A. Lepre y L. Wild, *Sens. Actuators B*, 39, 419 (1997).
- (7) B.H. Weigl y O.S. Wolfbeis, *Anal. Chim. Acta*, 302, 249 (1995).
- (8) A. Mills y Q. Chang, *Analyst*, 117, 1461 (1992).
- (9) A. Mills y M. Lela, *Analyst*, 121, 535 (1996).
- (10) B. Müller y P.C. Hauser, *Analyst*, 121, 339 (1996).
- (11) F. Baldini, A. Falai, A.R. Gaudio, D. Landi, A. Lueger, A. Mencaglia, D. Scherr y W. Trettnak, *Sens. Actuators B*, 6887, 1 (2003).
- (12) O.S. Wolfbeis, I. Klimant y G. Neurauter, *Anal. Chim. Acta*, 382, 67 (1999).
- (13) C. Bültzingslöwen, A.K. McEvoy, C. MacDonagh y B.D. MacCraith, *Anal. Chim. Acta.* 480, 275 (2003).
- (14) H. Soonkap, N. Alan, B. Monte y H. Henry, *Patente EP0601816* (1994).
- (15) C. Malins y M.D. MacCraith, *Analyst*, 123, 2373 (1998).
- (16) C. Bültzingslöwen, A.K. McEvoy, C. McDonagh, B.D. MacCraith, I. Klimant, C. Krause y O.S. Wolfbeis, *Analyst*, 127, 1478 (2002).
- (17) N. Nakamura y Y. Amao, *Anal. Bioanal. Chem.*, 376, 642 (2003).
- (18) R.B. Armstrong, *EVAl Company of America*, (2002)
- (19) S. Peper y E. Bakker, *Sensors Update*, 13 (2004).
- (20) Molecular Probes Inc, www.probes.com, (2005).

- (21) K. Landfester y M. Antonietti, *Macromol. Rapid Commun.*, 21, 820 (2000).
- (22) D.R. Walt, T.K. Mandal y M.S. Fleming, US Patent 6,720,007 (2004).
- (23) A. Celesa, Y. Quin, S. Peper y E. Bakker, *Anal. Chem.*, 75, 133 (2003).
- (24) N.R. Foster, F. Dehghani, K.M. Charoenchaitrakool y B. Warwick, *AAPS PharmSci.* 5, (2) (2003).
- (25) I. Tsagkatakis, S. Peper y E. Bakker, *Anal. Chem.*, 73, 315, (2001).
- (26) J.M. Kürner, I. Klimant, C. Krause, H. Preu, W. Kunz y O.S. Wolfbeis, *Bioconjugate Chem.*, 12, 883 (2001).