

UNIVERSIDAD DE GRANADA

FACULTAD DE CIENCIAS

Departamento de Química Analítica

*Grupo de Investigación FQM-297 "Control Analítico, Ambiental, Bioquímico
y Alimentario"*



TESIS DOCTORAL

**DESARROLLO DE FASES SENSORAS
ÓPTICAS PARA EL CONTROL DE LA
CALIDAD DE AGUAS Y VINOS**

Francisco Javier Sainz Gonzalo

Granada, Marzo 2012

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Francisco Javier Sainz Gonzalo
D.L.: GR 2895-2012
ISBN: 978-84-9028-169-7



UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA

DESARROLLO DE FASES SENSORAS ÓPTICAS PARA EL CONTROL DE LA CALIDAD DE AGUAS Y VINOS

*Memoria presentada por D. Francisco Javier Sainz Gonzalo
para optar al grado de Doctor en Química.*

Granada, 30 de Marzo de 2012

D. Francisco Javier Sainz Gonzalo

LOS DIRECTORES DE LA TESIS

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

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



Departamento de Química Analítica
"Profesor Fermín Capitán García"
Campus Universitario Fuentenueva
18071 Granada. España

Dr. D. ALBERTO FERNÁNDEZ GUTIÉRREZ, Catedrático del Departamento de Química Analítica "Profesor Fermín Capitán" de la Facultad de Ciencias y Director del Grupo de Investigación FQM-297 "Control Analítico, Ambiental, Bioquímico y Alimentario", de la Universidad de Granada,

CERTIFICA QUE:

El trabajo que se presenta en la memoria de esta tesis doctoral con el título: **"DESARROLLO DE FASES SENSORAS ÓPTICAS PARA EL CONTROL DE LA CALIDAD DE AGUAS Y VINOS"**, ha sido realizado bajo mi dirección y la del doctor D. Jorge Fernando Fernández Sánchez en los laboratorios que el Grupo FQM-297 tiene en el Departamento de Química Analítica y también, parcialmente, en los laboratorios del Grupo de Investigación de la Dra. D^a Cecilia Sáenz Barrio en la Universidad de La Rioja, así como en los laboratorios pertenecientes al Grupo de Investigación del Dr. D. Ignacio Raúl Matías Maestro en la Universidad Pública de Navarra, reuniendo todos los requisitos legales, académicos y científicos para hacer que el doctorando D. Francisco Javier Sainz Gonzalo pueda optar al grado de Doctor en Química.

Y para que así conste, expido y firmo el presente certificado en Granada a 30 de Marzo de 2012:

Dr. D. Alberto Fernández Gutiérrez

Esta Tesis Doctoral ha sido realizada con la ayuda de diversos contratos adscritos a los Proyectos de Excelencia concedidos por la Junta de Andalucía (P05-RMN-666 y P07-FQM-02625) y a la financiación con cargo a fondos del Grupo FQM-297 “Control Analítico, Ambiental, Bioquímico y Alimentario” del Plan Andaluz de Investigación de la Junta de Andalucía procedentes de diferentes contratos, proyectos y subvenciones de la Administración Central y Autonómica, Plan Propio de Investigación de la UGR, así como de empresas interesadas en los resultados de nuestra investigación. Adicionalmente, una parte de este Trabajo se llevó a cabo gracias al Proyecto de Investigación concedido por el Club Rotario de La Rioja a Bodegas David Moreno y la Universidad de La Rioja.

AGRADECIMIENTOS

A día de hoy con la tesis doctoral terminada, quiero expresar mi más sincero agradecimiento a todas aquellas personas que me han ayudado y acompañado en esta extensa andadura, que comenzó en Logroño y finaliza en Granada. Han sido muchos años de aprendizaje, de esfuerzo, de trabajo y lucha, de recompensa, y por tanto, de satisfacción.

En primer lugar quiero expresar mi agradecimiento a los directores de esta Tesis. Al Dr. D. Alberto Fernández Gutiérrez y al Dr. Jorge F. Fernández Sánchez por darme la oportunidad de trabajar en su grupo de investigación, proporcionándome los medios económicos y técnicos para su realización y por dirigir sabiamente el desarrollo de esta Tesis con sus conocimientos científicos, sus “ideas”, su apoyo y su dedicación.

Al Dr. Antonio Segura le agradezco haber visto en mí un candidato adecuado para formar parte del grupo de investigación y brindarme la oportunidad de formar parte del mismo para culminar mi Tesis Doctoral.

Agradezco el apoyo y la ayuda de todos los compañeros del Grupo de Investigación FQM-297, mi “familia” en Granada. Especialmente quiero expresar mi eterno agradecimiento a las dos personas que más aprecio y consideración tengo: Alegría y Santiago.

A Alegría le agradezco ser la persona más entregada a los demás, más entusiasta, inteligente y divertida que he conocido.

Verdaderamente, ella es la máxima responsable de que pueda ver culminada esta tesis, ella lo sabe bien; si no te hubiera tenido a mi lado en estos años de duro trabajo y situación familiar delicada, seguro que hubiera abandonado hace tiempo. Es genial tenerte siempre a total disposición, apoyándome y dándome ánimo en todo momento. Gracias infinitas.

A Santiago le quiero agradecer, en primer lugar, formar parte temporalmente de su excepcional familia, de la que he podido disfrutar tanto a su lado en tan poco tiempo, ha sido mi “segunda casa”. Estoy muy contento de haberte conocido porque eres una persona de una capacidad intelectual y humana inigualable. Gracias por estar siempre ahí, animándome en todo momento, y por el continuo trabajo extra que siempre te he ocasionado. Sabes que te aprecio, así que mucho ánimo con lo que te queda a ti. Infinitas gracias.

A Antonio Luis le doy las gracias por su inestimable y constante ayuda en la investigación realizada en esta tesis.

A Ángel le agradezco su ayuda en un campo tan arduo y complicado como son los polímeros; y por hacer del lugar de trabajo, un sitio agradable y ameno.

A Paulina le agradezco la paciencia y alegría que proporciona a todas las personas que conviven con ella, y los ánimos que me da en esta etapa final.

A David le doy las gracias por su apoyo en las situaciones difíciles y por las valiosas charlas en la puerta del “fumadero”.

A Rocío quiero expresar mi agradecimiento por su capacidad de trabajo en las situaciones adversas y por su personalidad.

A María quiero agradecer su ánimo, apoyo y comprensión en la etapa final de esta andadura.

A Marta y Elena les agradezco su apoyo, y la vitalidad que aportan al laboratorio.

A Pachy, aunque hemos coincidido poco tiempo, le expreso mi agradecimiento por su ayuda en el campo de la informática.

A Mari Carmen quiero agradecer su interés, ayuda y trabajo que me ha brindado como becaria.

También quiero dar las gracias al resto de compañeros del grupo que están y a los que no están: Rosa, Jesús, Patricia, Isabel, Arantxa, Salva, Ishan, Ibrahim, Amani, Hakim, Inma, Ana,...(Perdonad si se me olvida alguno, pero es que sois muchos...); así como a aquéllos que vinieron de estancia de investigación al grupo como Maribel, Fermín, Vito, Filippo,...

Quiero expresar mi agradecimiento al Departamento de Química Analítica por su cercanía, disponibilidad inmediata y soporte técnico. Especialmente quiero agradecer, entre otros, a Alberto su total disponibilidad y apoyo en todo momento; y a Ana su continuo apoyo e interés, por mi situación tanto laboral como familiar.

Quiero dar las gracias a Federico por su inmediata y eficaz ayuda en todo momento, por su interés en mi situación familiar, y por esas charlas para arreglar el país.

También quiero agradecer a las personas cercanas que siempre me han apoyado, entre las que se encuentran: Francisco Jesús, Laura, Luis, Cipri, Isa, Pepe Suárez,...

Expreso mi más sincero agradecimiento a los doctores Félix y Cecilia, por su inestimable ayuda y dedicación constante en los comienzos de la tesis doctoral y, sobre todo, por la confianza que siempre me dieron en todas mis actuaciones. Gracias por abrirme las puertas del mundo tan fascinante de la investigación.

Quiero agradecer al Departamento de Química Orgánica de la Universidad de Almería y especialmente al Dr. Ignacio Fernández de las Nieves su ayuda, trabajo, esfuerzo y dedicación en la preparación y caracterización de ligandos de gran afinidad para lantánidos; y al grupo "UPNA sensors" de la Universidad Pública de Navarra su ayuda, apoyo y dedicación durante la estancia de investigación llevada a cabo en esa tierra tan acogedora y hospitalaria próxima a la mía. Quiero dar las gracias especialmente a los doctores Francisco Javier Arregui, Cesar Elosúa e Ignacio Matías por su constante dirección y cercanía en el trabajo diario. También quiero tener un recuerdo a los compañeros de laboratorio como Carlos, Javier, Miguel, Aitor, Pedro, Abian,... por su ánimo, y apoyo en el campo de la fibra óptica.

No me gustaría dejar sin un agradecimiento especial a todos los amigos y conocidos que, aunque a veces no entendían muy bien el esfuerzo y el trabajo que suponía una tesis doctoral, han estado ayudándome y dándome ánimo en esta etapa.

También quiero agradecer infinitamente a mi familia (abuelos, tíos y primos) su ayuda en todo lo que han podido de forma incondicional, así como su paciencia en los momentos más difíciles.

Y por último, no por ello menos importante, quiero dar las gracias a las dos personas más importantes de mi vida, que han hecho posible que esta tesis sea una realidad, mis padres Víctor y Belén. Esta tesis no hubiera sido posible sin vuestro esfuerzo desinteresado, y vuestro incondicional apoyo económico y humano. Nunca podré agradecerlos suficientemente, pero sabed que una parte muy importante de esta tesis es vuestra. Os quiero.

A todos, muchas gracias por todo.

*A mi familia
le dedico con cariño
todo mi esfuerzo y
trabajo puesto en la
realización de esta tesis:*

Francisco Javier Sainz Gonzalo.

*“Un científico debe tomarse la libertad
de plantear cualquier cuestión,
de dudar de cualquier afirmación,
de corregir errores”.*

JULIUS ROBERT OPPENHEIMER
(1904-1967) Físico estadounidense.

ÍNDICE

| | |
|--|------------|
| I. OBJETO DE LA TESIS..... | 25 |
| II. RESUMEN | 29 |
| III. INTRODUCCIÓN | 35 |
| III.1. SENSORES QUÍMICOS | 37 |
| III.1.1. Definición de sensor | 37 |
| III.1.2. Componentes de un sensor químico | 39 |
| III.1.3. Diseño de un sensor químico | 41 |
| III.1.4. Clasificación de los sensores químicos | 42 |
| III.1.5. Importancia y actualidad de los sensores..... | 45 |
| III.2. SENSORES ÓPTICOS | 51 |
| III.2.1. Generalidades de los sensores ópticos..... | 51 |
| III.2.2. Ventajas e inconvenientes de los sensores ópticos | 53 |
| III.2.3. Parámetros de calidad de los sensores ópticos | 55 |
| III.2.4. Clasificación de los sensores ópticos..... | 58 |
| III.2.5. Sensores tipo célula de flujo: Optosensores | 62 |
| III.2.6. Sensores tipo sonda: Optodos | 70 |
| III.2.7. Sensores de luminiscencia molecular..... | 78 |
| III.2.8. Mecanismos de reconocimiento óptico..... | 81 |
| III.3. INSTRUMENTACIÓN EN SENSORES ÓPTICOS..... | 83 |
| III.3.1. Componentes de la instrumentación | 83 |
| III.3.2. Fuente de radiación óptica | 83 |
| III.3.3. Dispositivos ópticos..... | 86 |
| III.3.4. Detectores | 91 |
| III.4. REACCIONES DE POLIMERIZACIÓN | 93 |
| III.4.1. Aspectos generales | 93 |
| III.4.2. Polimerización orgánica..... | 93 |
| III.4.3. Reacciones de polimerización..... | 102 |
| III.5. DISEÑO Y DESARROLLO DE FASES SENSORAS ÓPTICAS..... | 121 |
| III.5.1. Polímeros de impronta molecular | 121 |

| | |
|---|------------|
| III.5.2. Vidrios sol-gel | 144 |
| III.5.3. Membranas de inclusión polimérica | 151 |
| III.6.BIBLIOGRAFÍA | 163 |
| IV. EXPERIMENTAL..... | 185 |
| IV.BI. DISEÑO Y SÍNTESIS DE UN MIP PARA LA DETECCIÓN DE TEXs Y XILENOS EN AGUA POTABLE..... | 187 |
| IV.BI.1. Generalidades de los TEXs | 189 |
| IV.BI.2. Test de screening. Generalidades y características | 190 |
| IV.BI.3. MIPs y compuestos orgánicos volátiles (TEXs) | 193 |
| IV.BI.4. Bibliografía del bloque I..... | 197 |
| IV.BI.5. Objetivos del bloque I..... | 199 |
| IV.BI.6. Capítulos del bloque I..... | 199 |
| IV.BI.7. Capítulo 1: Synthesis and characterization of a molecularly imprinted polymer optosensor for TEXs-screening in drinking water | 201 |
| IV.BI.8. Capítulo 2: The development of a screening molecularly imprinted polymer optosensor for detecting xylenes in water samples | 233 |
| IV.BI.9. Resumen de resultados del bloque I | 246 |
| IV.BII. DESARROLLO DE UNA FASE SENSORA FLUORESCENTE PARA LA DETERMINACIÓN DE ÁCIDO L-MÁLICO EN VINOS | 249 |
| IV.BII.1. Vino. Acidez y componentes | 251 |
| IV.BII.2. Ácido málico | 252 |
| IV.BII.3. Fermentación maloláctica del vino | 255 |
| IV.BII.4. Bibliografía del bloque II | 259 |
| IV.BII.5. Objetivo del bloque II..... | 261 |
| IV.BII.6. Capítulo del bloque II | 262 |
| IV.BII.7. Capítulo 3: Fluorescent sensing layer for the determination of L-malic acid in wine | 263 |
| IV.BII.8. Resumen de resultados del bloque II..... | 284 |

| | |
|---|------------|
| IV.BIII. DESARROLLO DE FASES SENSORAS BASADAS EN COMPLEJOS LUMINISCENTES PARA LA DETECCIÓN DE EUROPIO(III) EN AGUA | 285 |
| IV.BIII.1. Europio. Introducción y generalidades..... | 287 |
| IV.BIII.2. Luminiscencia sensibilizada de lantánidos | 288 |
| IV.BIII.3. Complejos luminiscentes de europio. Características ópticas | 292 |
| IV.BIII.4. Bibliografía del bloque III | 294 |
| IV.BIII.5. Objetivos del bloque III | 297 |
| IV.BIII.6. Capítulos del bloque III..... | 298 |
| IV.BIII.7. Capítulo 4: Development of polymeric sensing films based on a tridentate bis(phosphinic amide)-phosphine oxide for determining Europium(III) in water | 299 |
| IV.BIII.8. Capítulo 5: A novel tridentate bis(phosphinic acid)-phosphine oxide based Europium(III)-selective Nafion membrane luminescent sensor | 337 |
| IV.BIII.9. Capítulo 6: A novel luminescent optical fibre probe based on immobilized tridentate bis(phosphinic amide)-phosphine oxide for Europium(III) ion aqueous detection in situ..... | 365 |
| IV.BIII.10. Resumen de resultados del bloque III..... | 386 |
| V. CONCLUSIONES GENERALES | 389 |

I. OBJETO DE LA TESIS

I. OBJETO DE LA TESIS

El objeto general de la presente memoria doctoral fue el desarrollo de nuevas fases sensoras ópticas para el control de la calidad de aguas y vinos, apoyándonos por un lado, en el enorme interés surgido en los últimos años en el campo de los sensores químicos que ha favorecido el notable crecimiento tecnológico de algunas ramas de la ciencia, entre ellas la Química Analítica. Y por otro lado, en las numerosas técnicas instrumentales de análisis, especialmente las técnicas luminiscentes que destacan por sus características inherentes de sensibilidad y selectividad, y que han generado un gran número de investigaciones encaminadas a desarrollar nuevas y más sencillas metodologías de trabajo. El diseño y desarrollo de nuevas fases sensoras ópticas con propiedades luminiscentes ha permitido obtener robustos sistemas de reconocimiento molecular y detección de fácil aplicabilidad, y que han dado solución a problemas analíticos complejos.

El trabajo de esta memoria pretende profundizar en la comprensión básica de los procesos y técnicas que permiten obtener fases sensoras ópticas de naturaleza muy diversa, con el fin de poder aplicarlas de forma satisfactoria en la resolución de diferentes problemas analíticos.

El primer objetivo parcial de la investigación fue el diseño y desarrollo de una fase sensora óptica basada en tecnología sol-gel para la inmovilización de NAD⁺ (dinucleótido de nicotinamida y adenina), ya que éste interacciona con el analito de interés, el ácido málico, produciendo un cambio en las propiedades luminiscentes de la fase sensora. Se quiere demostrar su aplicabilidad en la evaluación de ácido málico en diferentes tipos de vinos.

El segundo fue el diseño y desarrollo de fases sensoras ópticas que utilizarán materiales poliméricos nanoestructurados multifuncionales, como son los polímeros

de impronta molecular (MIPs), para la detección conjunta de analitos de una misma familia química (métodos de “screening”) de interés ambiental. Para ello, se planteó diseñar y sintetizar estos polímeros que poseen excelentes propiedades de reconocimiento molecular y, posteriormente, poder implementarlos como fases sensoras en el desarrollo de optosensores convencionales luminiscentes. Se pretende demostrar su aplicabilidad realizando tests de “screening” para TEXs (tolueno, etilbenceno y xilenos) y solo xilenos en agua potable.

El último objetivo parcial era el diseño y desarrollo de fases sensoras ópticas, basadas en la inmovilización de diversos ligandos organofosforados (derivados del óxido de fosfina) mediante la preparación de membranas de inclusión polimérica en diversos soportes (vidrio, plástico y fibra óptica) y su posterior implementación en el desarrollo de sensores ópticos y/u optodos para la detección de iones europio(III) en agua. La idea era demostrar, de una parte, que el uso de estos ligandos organofosforados permitiría la determinación sensible, selectiva y rápida de iones europio(III) en agua y, de otra, que lo conseguido pudiera utilizarse como sensor de alarma para detectar iones europio(III) en agua.

II. RESUMEN

II. RESUMEN

Esta **memoria** presenta los resultados obtenidos durante la realización de la tesis doctoral titulada “Desarrollo de fases sensoras ópticas para el control de la calidad de aguas y vinos”. Se ha estructurado en dos partes. Una parte, denominada **introducción**, que recoge información sobre las diferentes modalidades para el diseño de los sensores químicos y en particular de sensores ópticos, así como de la instrumentación empleada para su desarrollo. Asimismo, está incluida una introducción básica de los tipos de reacciones de polimerización empleados en la memoria, una descripción de las diferentes vías y técnicas para llevar a cabo el diseño y desarrollo de fases sensoras ópticas, así como la bibliografía empleada en la introducción. La segunda parte se denomina **experimental** y muestra la aplicación de ejemplos de las fases sensoras ópticas descritas en la introducción para la resolución de diferentes problemas analíticos. Esta parte a su vez se divide en tres bloques y cada bloque está compuesto por uno o más capítulos (en total seis) donde se recogen los resultados experimentales obtenidos. Posteriormente, se describen las **conclusiones generales** de la parte experimental.

El **primer capítulo** se centra en la síntesis y caracterización de un polímero de impronta molecular (MIP) mediante la técnica de polimerización en disolución, utilizando como “molde” la molécula de tolueno (molécula representativa de los compuestos TEXs; tolueno, etilbenceno y xilenos). El MIP sintetizado fue implementado como fase sensora en un optosensor fluorescente convencional para el “screening” de TEXs en aguas de consumo humano. El test de “screening” reconoció muestras contaminadas rápidamente y a un precio económico con un nivel de corte de $700 \mu\text{g L}^{-1}$ de etilbenceno, que se corresponde con el nivel de contaminante máximo (MCL) establecido por la Agencia de Protección Ambiental Estadounidense (US EPA) en agua potable. El estudio de la fiabilidad del test se llevó a cabo para un

total de 50 muestras y su aplicabilidad se evaluó analizando muestras de diferentes tipos de aguas.

El **segundo capítulo** versa sobre el empleo del MIP sintetizado en el capítulo anterior y su implementación en el desarrollo de un optosensor fluorescente para el “screening” de xilenos en agua. El test de “screening” se realizó sin la necesidad de ninguna etapa de pre-concentración y analizó rápidamente muestras contaminadas con un nivel de corte de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$. La fiabilidad del test se evaluó para un conjunto de 30 muestras. Su aplicabilidad se demostró analizando muestras de agua minerales, de grifo y de río.

El **tercer capítulo** describe el desarrollo de una lámina sensora fluorescente para la determinación de ácido L-málico en vinos a través de la reacción enzimática entre el L-malato y el nicotinamida adenina dinucleótido (NAD^+) en presencia del enzima L-malato deshidrogenasa. La inmovilización de las biomoléculas se llevó a cabo en vidrios sol-gel. La regeneración de la lámina sensora se produjo mediante la inmovilización del enzima diaforasa y el empleo de hexacianoferrato(III) como oxidante. Se evaluaron las características analíticas de la lámina sensora y se determinó el contenido de ácido L-málico en diferentes tipos de vinos. Los resultados obtenidos con la lámina sensora se compararon con un método de referencia basado en EAM UV-VIS (espectrofotometría de absorción molecular ultravioleta-visible). Este capítulo se realizó en los laboratorios del Departamento de Química de la Universidad de La Rioja.

El **cuarto capítulo** trata del desarrollo de una película sensora para la determinación de iones europio(III) en agua mediante la inmovilización de un nuevo ligando organofosforado (bis(amida fosfínica) óxido de fosfina) en una membrana de inclusión polimérica. El ion europio(III) y el ligando organofosforado formaron un complejo luminiscente de estequiometría 1:2. La síntesis del ligando y la

caracterización estructural del complejo se llevó a cabo en los laboratorios del Departamento de Química Orgánica de la Universidad de Almería. El complejo luminiscente se evaluó en disolución, mostrando características espectroscópicas y químicas excelentes para desarrollar películas sensoras poliméricas. La película sensora desarrollada mostró un tiempo de respuesta corto, un pH de operación óptimo de 5.0 y una elevada selectividad hacia otros iones lantánidos trivalentes. Por último, la película sensora se utilizó con éxito para determinar la concentración de iones europio(III) en agua con un límite de detección de $4.8 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$.

En el **quinto capítulo** se desarrolló una membrana sensora luminiscente a partir de un nuevo ligando organofosforado (bis(ácido fosfínico) óxido de fosfina) para determinar Eu(III) en agua. Tanto la síntesis como la caracterización del nuevo ligando se realizaron también en el Departamento de Química Orgánica de la Universidad de Almería. El complejo luminiscente formado entre Eu(III) y el ligando se evaluó en disolución, observando que sus propiedades químicas y espectroscópicas fueron excelentes para el desarrollo de membranas de inclusión polimérica. La membrana sensora mostró un tiempo de respuesta corto y un pH de trabajo óptimo de 5.0. Además, la membrana sensora presentó una buena selectividad hacia Eu(III) respecto a otros iones lantánido, aunque se observó una pequeña interferencia positiva de Tb(III) y proporcionó un límite de detección de $5.8 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$.

El **sexto capítulo** muestra el desarrollo de una sonda sensora luminiscente de fibra óptica para la detección acuosa de iones europio (III). En este caso, el ligando depositado sobre la fibra óptica fue el que se utilizó en el cuarto capítulo (bis(amida fosfínica) óxido de fosfina). Se emplearon dos configuraciones para llevar a cabo medidas luminiscentes *off-line* y *on-line*. La sonda desarrollada detectó iones europio(III) en agua en un amplio intervalo de concentraciones. El experimental de

este capítulo se realizó durante una estancia de investigación en el Departamento de Ingeniería Eléctrica y Electrónica de la Universidad Pública de Navarra.

III. INTRODUCCIÓN

III.1. SENSORES QUÍMICOS

III.1.1. Definición de sensor

El término “**sensor**” define de forma genérica “*a cualquier dispositivo robusto, de uso sencillo y preferiblemente portátil, capaz de transformar (transducir) la magnitud de un fenómeno cuya identificación resulta de interés en una señal física medible, proporcionando de forma directa y continua información de su entorno*”¹. Estos dispositivos se pueden dividir en dos grupos dependiendo del tipo de cambio que detecten: parámetros físicos (temperatura, presión, etc.) o bien parámetros químicos (concentración de oxígeno, pH, etc.). Los sensores físicos son sensores capaces de cuantificar fenómenos físicos y a los diseñados para medir especies (bio)químicas se les conoce como sensores (bio)químicos.

La aportación de una definición exacta y universal de un sensor químico resulta complicada. Roe y col². definen un “sensor químico ideal” como un dispositivo capaz de detectar y/o cuantificar a tiempo real una especie química en un medio complejo (muestra de interés) a través de una interacción química selectiva.

La IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) propone otra definición mediante la cual un sensor químico es un dispositivo que transforma la información química, variando desde la concentración de un componente específico de la muestra hasta el análisis total de su composición, en una señal analítica útil. La información química puede ser originada a través de una reacción química del analito o de una propiedad física del sistema investigado. Además, el sensor puede incluir dispositivos que posean las siguientes funciones: toma de muestra, transporte de muestra y procesamiento de señal y datos³.

Las características ideales más importantes de un sensor químico son el funcionamiento de forma continua y reversible, directamente sobre la matriz de la muestra y la capacidad de proporcionar información sobre la distribución espacial y temporal de una especie molecular o iónica a tiempo real⁴. Otras características ideales que debería cumplir un sensor son las siguientes: portátil, económico, mínimo mantenimiento y fácil manejo.

El principal objetivo que se persigue con un sensor ideal es la integración de dos de los tres pasos generales del proceso analítico (véase Figura 1).

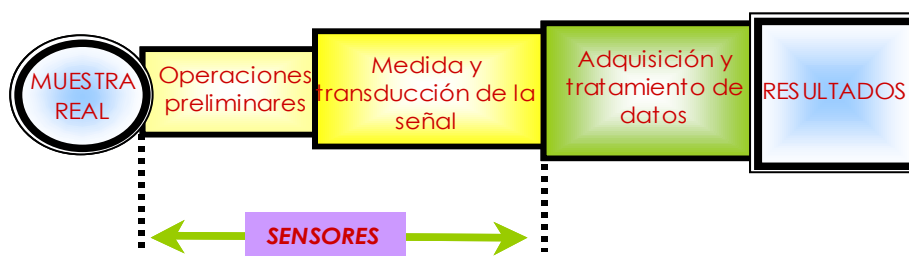


Fig. 1. Importancia de los sensores en el proceso analítico.

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

No obstante, muy pocos sensores cumplen estrictamente todas las especificaciones anteriores. Por ello, numerosos autores denominan también sensores a ciertos diseños que no son capaces de medir de forma continua la concentración de ciertas especies, es decir, que son irreversibles y solamente permiten una determinación. En este caso, se denominan sensores “desechables o de un solo uso”¹.

En determinadas ocasiones puede ocurrir que la selectividad del sensor no sea lo suficientemente elevada; en este caso, la incorporación de alguna técnica simple de pre-tratamiento en línea con la detección, para separar el analito de las especies interferentes presentes en la muestra pudiera ser de gran utilidad⁵.

Finalmente, en un amplio sentido podríamos definir un sensor como cualquier dispositivo de uso sencillo que sea para los instrumentos de medida lo que los sentidos son para los seres vivos⁶, es decir, un sistema que proporcione una determinada respuesta a un estímulo exterior, la cual posteriormente es analizada y procesada.

III.1.2. Componentes de un sensor químico

Un sensor químico capaz de informar sobre una especie química consta básicamente de tres partes^{3,7} (véase Figura 2):

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

El receptor puede basarse en diferentes principios:

- *principio físico:* No se produce reacción química. Ejemplos típicos son aquellos basados en medidas de absorbancia, luminiscencia, índice de refracción, conductividad, temperatura, cambio de masa, etc.
- *principio químico:* Una reacción química donde participa el analito que genera la señal analítica.

- *principio bioquímico*: Un proceso bioquímico es la fuente que genera la señal analítica. Ejemplos típicos son los sensores potenciométricos microbianos o los inmunosensores. Como hemos comentado anteriormente, éstos son considerados como un subgrupo de los sensores químicos y son denominados biosensores.

En determinadas ocasiones no es fácil averiguar inequívocamente si un sensor opera según un principio químico o físico; ya que en algunos casos se da un proceso mixto de reacción química y principio físico medido. Por ejemplo, esto se produce cuando la señal se debe a un proceso de adsorción.

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

Figura I-5. Partes de un

Fig. 2. Partes de un sensor químico.

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

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

III.1.3. *Diseño de un sensor químico*

La determinación de los pasos básicos a seguir en el diseño de un sensor químico es crucial para la resolución de un problema analítico concreto (véase Figura 3).

Las consideraciones prácticas de mayor importancia a tener en consideración en el diseño de un sensor químico son:

- ✿ **Transductor:** Según se midan cambios en alguna propiedad eléctrica, óptica, cambios de masa, etc., como consecuencia del reconocimiento, se puede hablar de transductores electroquímicos, ópticos, piezoeléctricos, etc
- ✿ **Inmovilización del reactivo:** Existen diferentes métodos (adsorción pasiva, entrecruzamiento, enlace covalente, iónico, etc.) con sus ventajas e inconvenientes. Debe tenerse en cuenta que dicha inmovilización puede alterar profundamente las características del analito en disolución.

- ✿ **Mecanismo de reconocimiento:** La fase sensora debe reconocer la especie a determinar (analito) a través de una interacción fácilmente detectable y cuya magnitud sea función de la concentración del analito.

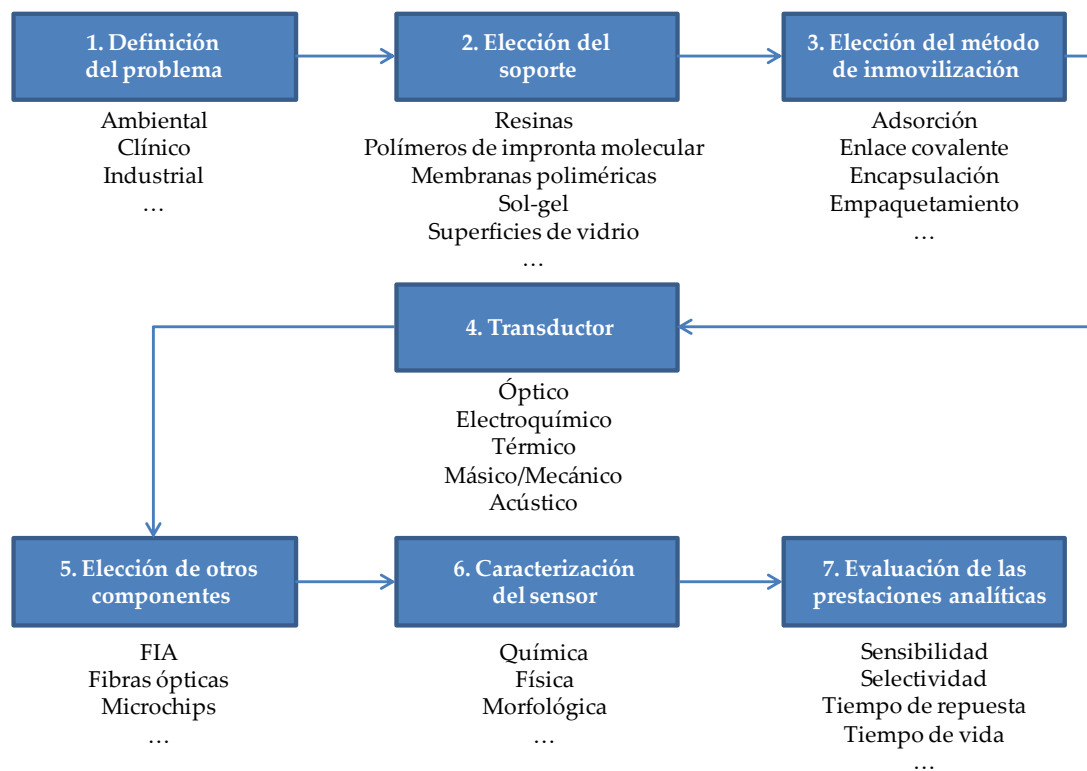


Fig. 3. Pasos a seguir en el diseño de un sensor químico.

III.1.4. Clasificación de los sensores químicos

Se pueden establecer diferentes clasificaciones de los sensores atendiendo a diversos criterios. El gran auge que existe en los últimos años en el mundo de los sensores ha incentivado que éstos evolucionen continuamente y por tanto, irán apareciendo seguramente otras clasificaciones a medida que se desarrollen nuevos tipos de sensores.

Los criterios más utilizados y la clasificación de sensores químicos correspondientes a cada criterio son los siguientes⁸:

- Atendiendo al modo de reconocimiento, los sensores pueden clasificarse en *sensores químicos o bioquímicos*. Cuando la etapa de reconocimiento se produce mediante un elemento sensible biológico (por ejemplo, un anticuerpo, una célula, una enzima, etc.) el dispositivo resultante se conoce como biosensor. Así pues, la diferencia entre un sensor químico y un biosensor está en la reacción (química o biológica) de reconocimiento del analito.
- De acuerdo con la naturaleza de la interacción medible los sensores se pueden clasificar en *reversibles o irreversibles*.
- Según su forma externa en *sensores tipo célula de flujo, tipo sonda o tipo microchip*.
- En función de la relación entre la zona de reconocimiento y el transductor, en *sensores conectados o integrados*.
- Teniendo en cuenta el modo de operación en *sensores de medidas discretas o de medidas de flujo (optosensores)*.
- Considerando el número de especies a determinar en *sensores simples o múltiples*, (monoparamétricos y multiparamétricos, respectivamente).
- Atendiendo a la naturaleza de la señal física que se genera y se mide, es decir, atendiendo al tipo de transductor, los sensores químicos se han ido clasificando en *sensores electroquímicos, ópticos, térmicos, piezoeléctricos, etc.*^{4,9}.

Esta última clasificación, basada en la naturaleza de la señal física generada o medida, es bastante general y comúnmente utilizada para clasificar los sensores químicos.

- Los sensores *electroquímicos* miden cambios en alguna propiedad eléctrica del sistema y ese cambio producido en las magnitudes eléctricas está relacionado con la concentración de analito. Así, existen sensores amperométricos, conductimétricos, impedimétricos, potenciométricos e ISFETs (transistores de efecto de campo).
- Los sensores *ópticos* son aquellos en los que se producen cambios en alguna propiedad óptica del sistema: transmitancia, transflectancia, optotérmicos, reflexión interna atenuada (ATR), cambio de índice de refracción, reflectancia (UV, NIR, IR), fluorescencia y fosforescencia (intensidad, tiempo de vida, atenuación), transferencia de energía, espectroscopía Raman, refractometría, turbidimetría, elipsometría, polarimetría o espectroscopía fotoacústica.
- Los sensores *térmicos* miden calores de reacción o cambios en la temperatura del sistema.
- Y los *piezoeléctricos* cuantifican cambios de masa, de viscosidad, etc.

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

Finalmente, no existe un principio universal para desarrollar un sensor químico, ya que cada caso requiere una adaptación específica de un principio de medida.

III.1.5. *Importancia y actualidad de los sensores*

El desarrollo de sensores químicos ha experimentado un enorme interés en los últimos años en campos tan diversos como el de las ciencias de la salud, el ambiental, el industrial, el biotecnológico, la domótica, etc.

En el campo de la Química Analítica Clínica¹⁰⁻¹³, la posibilidad de miniaturización de los sensores ha proporcionado resultados muy satisfactorios, llegando a desarrollarse dispositivos muy económicos (desechables o reutilizables), que pueden ser separados del módulo principal. Así mismo, debido a su carácter miniaturizable y a su capacidad de medida continua e “in situ”, cada vez son más las investigaciones encaminadas al desarrollo de sensores ópticos con aplicaciones médicas capaces de ser usados directamente en humanos.

En el campo del control ambiental¹⁴⁻¹⁷, el empleo de sensores constituye una herramienta muy útil en la identificación y cuantificación de contaminantes de forma remota y continua, dando información muy valiosa a la hora de llevar a cabo una estrategia adecuada para remediar los efectos de la contaminación en áreas contaminadas o en ambientes peligrosos.

También la demanda de la automatización de los procesos industriales¹⁸⁻²⁰ ha experimentado un importante crecimiento en los últimos años, ya que las medidas de parámetros químicos son necesarias para el seguimiento y el control de un determinado proceso. Por ello, la disponibilidad de sensores químicos en los procesos industriales, ha impulsado enormemente el empleo de métodos de análisis on line.

Los “paquetes inteligentes” (*Intelligent Packaging*)²¹ surgen como respuesta a las demandas cada vez más exigentes de los consumidores sobre los alimentos, con

un menor número de conservantes, con requerimientos legales más estrictos, en un mercado cada vez más globalizado y preocupado por la seguridad alimentaria y con la reciente amenaza del bioterrorismo en los alimentos²²⁻²⁴. Los paquetes inteligentes se definen como sistemas que controlan las condiciones de los alimentos empaquetados, proporcionando información sobre la calidad de esos alimentos durante el período de transporte y almacenaje²⁵. De forma paralela, el desarrollo de sistemas sensores que determinen la calidad de los alimentos en términos de oxidación, frescura o deterioro microbiano, se ha convertido en un objetivo muy destacado en la industria alimentaria^{26, 27}. Por ello, las aplicaciones de los paquetes inteligentes se han utilizado en los sistemas de trazabilidad y Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control (APPC-HACCP)²⁸.

Las características de los sensores más demandadas por la industria son precio, robustez, estabilidad con el tiempo o con la temperatura y biocompatibilidad en procesos biotecnológicos.

En este campo de aplicación, los sensores ópticos^{29, 30} han despertado un enorme interés debido a que son dispositivos no invasivos o mínimamente invasivos, que no destruyen la muestra y, por lo tanto, su utilización podría renovar los dispositivos que se están empleando en la actualidad. Fundamentalmente, se puede considerar que la principal aplicación de los sensores ópticos en procesos biotecnológicos es la monitorización de oxígeno en cultivos celulares³¹, así como directamente en el interior de las células³², habiendo propuestas incluso para el uso de estos sensores en el diagnóstico temprano contra el cáncer³³.

Finalmente, otro campo de gran aplicabilidad de los sensores químicos es la domótica. Cada vez la sociedad exige más sistemas de control de la calidad de vida en los hogares así como el disponer de dispositivos pequeños y automáticos que mejoren, sin un gran coste adicional, esta calidad de vida. En este sentido, los

sensores ópticos tienen mucho que decir debido a que son fácilmente miniaturizables y a que se pueden destinar al control de la calidad del aire, así como sensores tipo alarma que detecten posibles contaminaciones y/o fugas de gases nocivos para la salud humana³⁴.

La utilización de sensores químicos en estos campos de aplicación puede proporcionar resultados cuantitativos o semicuantitativos rápidos en la propia matriz de la muestra (in situ), reduciendo los costes de transporte y el material de laboratorio, ya que se minimiza el número de muestras requeridas en comparación con las necesarias para su análisis en el laboratorio, empleando los métodos analíticos clásicos para su determinación. Además, la posibilidad de medir parámetros a tiempo real demuestra que su mayor campo de aplicación sea en aquellas situaciones en las que la muestra no se pueda llevar fácilmente al laboratorio y para el análisis de rutina.

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

Se puede considerar que el objetivo final de un sensor químico es su comercialización y venta, y para ello características analíticas como robustez, sensibilidad, selectividad, linealidad, inmunidad e interferencia y ausencia de efectos de matriz deben ser lo suficientemente elevadas para poder competir con los métodos analíticos clásicos empleados en los laboratorios. Simultáneamente, su portabilidad, miniaturización y facilidad de uso son otras características muy importantes para su éxito comercial.

Durante aproximadamente dos décadas de investigación en el desarrollo de sensores, la mayor parte de los trabajos han proporcionado únicamente publicaciones científicas en los institutos de investigación y en las universidades. En la actualidad, una escasa proporción de la tecnología de sensores comparada con los cientos de diseños existentes, ha sido empleada para desarrollar dispositivos comerciales.

Su comercialización presenta varios obstáculos. En primer lugar, las características analíticas de sensibilidad, intervalo lineal, reproducibilidad y estabilidad demostradas para los sensores a nivel de laboratorio no se adaptan precisamente a las necesidades del usuario. Además, aunque se logren valores óptimos, estas características disminuyen drásticamente durante los distintos pasos en el desarrollo y producción de un sensor a escala industrial. Por consiguiente, es importante encauzar la investigación hacia el diseño de nuevas fases sensoras que acerquen las características a las requeridas por la sociedad y que posean características físicas y químicas simples, que permitan el uso de tecnologías ya desarrolladas en la medida que sea posible.

En segundo lugar, la necesidad de desarrollar sistemas integrados y de interfases limita en cierta medida su comercialización. En el concepto de sensor es fundamental dar un paso hacia adelante en el diseño de prototipos, ya que ellos deben ser fácilmente utilizables por personal no cualificado. En este sentido, el desarrollo de dispositivos simples, robustos, de bajo mantenimiento y que aporten la información justa y precisa es necesario para dar respuesta a las necesidades de la sociedad actual.

Finalmente, la competitividad que existe en el campo de los sensores dificulta enormemente su comercialización. Por ello, es fundamental defender las verdaderas ventajas que los sensores poseen sobre sus competidores basados en tecnologías ya desarrolladas y probadas para posible comercialización.

Por todo lo expuesto anteriormente, la continua investigación en este campo y la inversión de tiempo, esfuerzo y dinero resulta imprescindible para poder aproximar las características de los sensores desarrollados en los laboratorios a las necesidades demandadas por la sociedad y/o la industria, demostrando sus principales ventajas frente a los dispositivos actuales así como minimizando o “enmascarando” sus posibles deficiencias.

III.2. SENSORES ÓPTICOS

III.2.1. *Generalidades de los sensores ópticos*

Los sensores ópticos se fundamentan en el empleo de zonas de reconocimiento o fases sensoras químicamente activas y su implementación en dispositivos de medida, de modo que la interacción del analito a analizar con la fase sensora provoca un cambio en sus propiedades ópticas, que es proporcional a la concentración del analito en cuestión.

El aumento de la importancia y el potencial de los sensores ópticos ha crecido progresivamente durante las últimas décadas. Los primeros trabajos descritos en la literatura sobre sensores químicos estaban orientados desde el punto de vista electroquímico. Sin embargo, el gran volumen de conocimiento disponible hoy en día sobre los métodos óptico-espectroscópicos y las diversas posibilidades que los mismos ofrecen, han dado lugar a la búsqueda e investigación en el campo de los sensores con detección óptica-espectroscópica³⁵⁻³⁷.

La espectroscopía de emisión luminiscente ha desarrollado métodos analíticos que se caracterizan por su elevada sensibilidad, selectividad y versatilidad; la industria de las telecomunicaciones ha puesto a la venta fibras ópticas de bajo coste que permiten transmitir luz a largas distancias; se han fabricado nuevas fuentes de radiación como láseres y diodos fotoemisivos (LEDs)³⁸ que permiten la excitación del analito prácticamente en todo el intervalo de longitudes de onda de la región visible del espectro electromagnético; se han desarrollado fotodiodos y CCDs de bajo coste; y finalmente, nuevos métodos quimiométricos junto con microprocesadores de alta capacidad y pequeño tamaño permiten almacenar y procesar datos, incluso en el caso de la existencia de relaciones complejas de señal-concentración.

Por tanto, la conjunción de las excelentes características que ofrecen las fibras ópticas como vías de transmisión de luz a través de largas distancias, el desarrollo instrumental en el campo de la fotónica (láseres, LEDs, CCDs, fotodiodos, etc.), la aparición en el mercado de dispositivos baratos y miniaturizados, los avances en computación (microprocesadores, redes neuronales, etc.), junto con la abundante información química cuantitativa y cualitativa obtenida a través de las diversas técnicas analíticas espectroscópicas han producido, en las últimas décadas, un impresionante avance de los sensores ópticos para el análisis y/o control de parámetros de interés químico^{39, 40}, ambiental^{41, 42}, clínico^{12, 43}, etc.

Los sensores ópticos poseen la ventaja de poder enlazar la zona de reconocimiento con el dispositivo de medida mediante el uso de fibra óptica. Por ello podemos decir que el uso de fibras ópticas permite “aproximar el espectrómetro a la muestra”, mientras que el empleo de fases sensoras inmovilizadas permite realizar medidas *in situ* (en la propia muestra)^{44, 45}.

Sin embargo, en los últimos años la aparición de sensores ópticos basados en el empleo de microchips ha hecho innecesario el uso de fibras ópticas⁴⁶⁻⁴⁹. En esta configuración, la fase sensora está inmovilizada directamente sobre el transductor o sobre un soporte inerte que se encuentra unido al mismo y que está integrado en el microchip, donde están insertados tanto la fuente de excitación como el sistema de detección. De este modo, dichos sensores responden de forma similar que los sensores de fibra óptica pero con un diseño más simplificado y un menor tamaño.

Finalmente, los campos de aplicación más empleados por los sensores ópticos son el control de productos industriales^{50, 51}, biotecnología^{52, 53}, medicina^{43, 54}, medioambiente^{41, 55} y, en general, todos aquellos en los que se requiere un seguimiento de determinados parámetros para garantizar la calidad del proceso o de un producto^{56, 57}.

III.2.2. *Ventajas e inconvenientes de los sensores ópticos*

De forma genérica, los sensores ópticos se han aplicado más recientemente y presentan numerosas ventajas frente a otros tipos de sensores, particularmente los electroquímicos, que aconsejan el uso de los sensores ópticos sin que esto quiera significar que se menosprecien las importantes aplicaciones de los electroquímicos. Las ventajas se detallan a continuación:

- La señal óptica no está expuesta a interferencias eléctricas.
- No se requiere un sistema de referencia.
- No hay un consumo significativo de analito a través de la fase sensora, quedando inalterada la muestra después de la medida.
- La fase activa no requiere estar en contacto con el sistema óptico. Esto facilita enormemente el desarrollo de sensores con fases activas sustituidas o reemplazadas, resultando imprescindible para la preparación de fases basadas en reactivos con vida limitada o de sensores de un solo uso (desechables).
- En determinadas ocasiones, la utilización de un discriminador adecuado posibilita el acoplamiento de diferentes fases ópticamente activas a un solo sistema de transducción, proporcionando una considerable reducción del coste y una ventaja claramente económica, ya que facilita realizar análisis rápidos de diversos analitos en un mismo equipo.
- También son aptos para la miniaturización, lo que permite desarrollar sensores de fibra óptica o microchips con tamaños muy pequeños y flexibles.

- Presentan la posibilidad de ofrecer resoluciones a diversas longitudes de onda e información temporal, incluso su aplicación a técnicas de tiempo resuelto^{58, 59}.
- Posibilidad de desarrollo de sensores ópticos para analitos que no pueden ser analizados por métodos electroquímicos.
- En determinados campos como la biomedicina, los sensores ópticos presentan mayor seguridad para la realización de medidas in vivo, ya que evita el riesgo de un shock eléctrico.
- Los intervalos de temperatura extremos a los que pueden llegar a trabajar determinados sensores ópticos, posibilita su esterilización a temperaturas elevadas.
- Ciertos sensores ópticos pueden ser esterilizados mediante rayos gamma, lo que favorece su utilización en biotecnología.
- La transmisión de señales ópticas a grandes distancias se consigue mediante el empleo de sistemas de fibra óptica, lo que permite la realización de análisis en ambientes peligrosos (ambientes radiactivos, atmósferas contaminadas, ambientes con elevadas presiones o temperaturas, etc.) sin la necesidad de recurrir previamente a la toma de muestra.

No obstante, los sensores ópticos también presentan algunos inconvenientes, entre los que se citan a continuación:

- ✗ La luz ambiental puede producir interferencias en las medidas.
- ✗ La fotodescomposición de los reactivos empleados en el sensor puede llegar a reducir su estabilidad temporal.

- ✘ Los tiempos de respuesta pueden ser elevados, sobre todo en los casos en los que se produzcan fenómenos de transferencia de masa.
- ✘ De forma genérica, los sensores ópticos presentan intervalos lineales más pequeños que los electroquímicos.
- ✘ Y en muchas ocasiones, la existencia de reactivos selectivos y que interaccionen reversiblemente con el analito es muy limitada. Además, se produce generalmente una pérdida de sensibilidad después de su inmovilización.

Estos inconvenientes explican, en cierta medida, la escasez del éxito comercial de los sensores ópticos hasta el momento y animan a un esfuerzo investigador continuado de equipos de personas multidisciplinares^{60, 61}.

III.2.3. *Parámetros de calidad de los sensores ópticos*

Los principales parámetros que definen la calidad de un sensor óptico son sensibilidad, selectividad, reversibilidad, tiempo de respuesta, reproducibilidad y tiempo de vida⁶². A continuación, se realiza una breve descripción de cada uno de ellos:

- ✿ **Sensibilidad:** Viene determinada por la propiedad óptica medida (absorbancia, fluorescencia, fosforescencia, reflectancia, etc.), por las características del reactivo empleado, por el método de inmovilización y por el diseño específico del sensor óptico. De forma genérica, los sensores basados en medidas de luminiscencia son más sensibles que los espectrofotométricos. Adicionalmente, la rigidez que supone la inmovilización del reactivo sobre un

soporte sólido incrementa la emisión luminiscente y favorece la concentración del analito sobre el mismo, siendo ambos factores que mejoran la sensibilidad.

- ✿ **Selectividad:** Depende de las propiedades del reactivo utilizado (aumentando de forma considerable con reactivos de origen biológico), de la propiedad óptica medida (la luminiscencia es más selectiva que la espectrofotometría) y finalmente, del soporte y/o membrana utilizados (permiten el paso selectivo de determinados analitos).
- ✿ **Reversibilidad:** Idealmente, todos los sensores ópticos deberían ser completamente reversibles, lo que permitiría el uso indefinido del sensor y la monitorización en continuo del analito. Sin embargo, la reversibilidad del sensor óptico viene determinada por el tipo de interacción entre el analito y la fase reactiva. Un ejemplo típico de sensores ópticos reversibles son los sensores de pH y aquellos sensores, que se basan en procesos de desactivación dinámica de la luminiscencia.
- ✿ **Tiempo de respuesta:** Se cuantifica midiendo el tiempo que transcurre para conseguir el 66% o el 90% (según criterio empleado) de la máxima señal obtenida. El factor más importante en el tiempo de respuesta de un sensor óptico, es la transferencia de materia desde la disolución hacia la fase sólida. En determinados sensores, este parámetro depende principalmente de la concentración del analito. Por ejemplo, el tiempo de respuesta en sensores de pH es generalmente más elevado a pHs próximos a 7 que a pHs ácidos o básicos.
- ✿ **Reproducibilidad:** Puede evaluarse atendiendo a dos criterios ampliamente utilizados. Por un lado, la medición de lecturas de un único sensor a diferentes tiempos (repetibilidad). Por otro lado, la medición de la variación de lecturas

entre diferentes sensores (reproducibilidad). La irreproducibilidad entre diferentes sensores es un importante inconveniente a tener en consideración. Suele proceder de variaciones en el proceso de inmovilización aunque ambas se produzcan en las mismas condiciones experimentales. Este problema se asocia, sobre todo, a pequeñas diferencias estructurales de los soportes producidas durante su fabricación y empeora con el empleo de resinas intercambiadoras iónicas procedentes de diferentes lotes.

✿ **Tiempo de vida:** Está relacionado con la estabilidad de la fase reactiva. De este modo, depende fundamentalmente de las características del reactivo indicador y del método de inmovilización seleccionado. Un tiempo de vida elevado es una característica imprescindible para la comercialización del sensor. En algunos casos, los reactivos inmovilizados pueden experimentar degradaciones fotoquímicas, térmicas o las disoluciones empleadas para su regeneración. Un problema que afecta drásticamente a la estabilidad de los sensores luminiscentes es la fotodegradación del luminóforo. En el caso de sensores enzimáticos o irreversibles, el tiempo de vida dependerá de la velocidad de desactivación de la enzima o de consumición del reactivo. Para su determinación es necesario estudiar las condiciones de conservación más drásticas para el sensor, aunque ésta finalmente se realice en las condiciones más adecuadas.

Una vez estimados todos estos parámetros, un prototipo del dispositivo sensor debe ser testado en el laboratorio, aplicándolo a muestras reales o por lo menos a muestras sintéticas con matrices similares a las reales. Demostrada su validez mediante un número importante de análisis independientes, el sensor óptico, debe ser testado donde se va a llevar a cabo el análisis (*in situ*). Para chequear que el

sensor óptico no ha perdido sus características analíticas durante su almacenamiento, debe recalibrarse antes del inicio de las mediciones.

III.2.4. *Clasificación de los sensores ópticos*

La complejidad de los sensores ópticos varía considerablemente en función de las características requeridas, debido a la existencia de una amplia variedad de sensores ópticos en el mercado. Esta pluralidad dificulta una única clasificación de los mismos. A continuación se exponen las más utilizadas, atendiendo a diversos criterios⁸:

- **Según la naturaleza de la interacción con el analito**, se puede hablar de sensores ópticos reversibles, cuando la interacción química del analito con la zona de reconocimiento es reversible; o sensores ópticos irreversibles, cuando la interacción que se produce entre el analito y la zona de reconocimiento es irreversible. Los sensores ópticos irreversibles se distribuyen, a su vez, en regenerables o reutilizables, siempre que puedan volver a ser utilizados después de un determinado tratamiento; y en no regenerables o desechables, cuando no se puedan recuperar después de la realización de la medida y por lo tanto, son de un solo uso.
- **Según su morfología**, los sensores ópticos pueden dividirse en tres amplias clases:
 - Sensores tipo célula de flujo (**optosensores**). En este caso, el sólido ópticamente activo está empaquetado en una celda de flujo, que puede estar localizada en el compartimento de muestra del equipo o en el exterior del

mismo. (para esta configuración de sensor será necesario el uso de fibras ópticas que conduzcan la luz hasta la zona de medida).

En función de la localización de la zona de reconocimiento, los sensores de flujo se pueden agrupar en dos tipos básicos⁸ (véase Figura 4):

- **Optosensor convencional.** La zona de reconocimiento está incorporada dentro de una célula de flujo especial, que se encuentra situada en el compartimento de muestra del instrumento.
- **Optosensor no convencional.** La zona de reconocimiento se encuentra incorporada dentro de una célula de flujo, que está localizada fuera del instrumento. En este caso, es imprescindible el uso de fibra óptica para poder transportar la luz excitatriz desde el instrumento a la fase sensora y recolectar la emisión luminiscente; o el uso de un microchip que pueda alojar tanto la fuente de excitación como el sistema de detección.

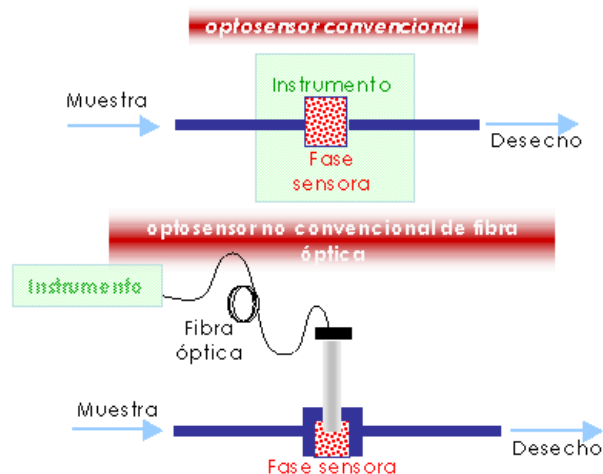


Fig. 4. Tipos básicos de sensores de flujo.

- Sensores tipo sonda (**optodos**). Este tipo de sensores está formado por una fase ópticamente activa situada en una guía de ondas, cuya morfología puede adquirir diversos formatos: cilíndrico (fibra óptica), plano, etc.
- Sensores tipo **microchip**. En ellos, la fase sensora se encuentra inmovilizada directamente sobre el transductor o sobre un soporte inerte instalado en un microchip, que posee todos componentes necesarios para realizar la medida.

Ambos tipos de sensores (optodos y sensores tipo microchip) permiten su empleo tanto en discontinuo como en flujo; sin embargo, los optosensores solamente pueden ser utilizados en sistemas de flujo. La importancia de los optosensores y optodos en el campo de los sensores ópticos así como el desarrollo de fases sensoras para su implementación en optosensores y optodos llevadas a cabo en esta tesis, han propiciado que se realice una descripción más detallada de los mismos, por lo que se discutirán en los apartados III.2.5 y III.2.6 de la presente memoria.

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

Para los sensores de absorbancia, la relación que existe entre la intensidad de la luz incidente y la luz reflejada es directamente proporcional a la concentración del analito a determinar. Las principales características de estos sensores son sencillez, robustez y escasa selectividad.

Respecto a los diferentes mecanismos de transducción, los procesos fotoluminiscentes resultan especialmente atractivos para el desarrollo de sensores ópticos, debido a que la radiación detectada puede distinguirse de la radiación

incidente sobre la fase activa por su longitud de onda. Asimismo, proporcionan sensores altamente sensibles que posibilitan la determinación de niveles de concentración de analito muy bajos. Por ello, las técnicas fotoluminiscentes son especialmente idóneas para ser empleadas como técnicas de detección en el desarrollo de sensores ópticos.

Las dos técnicas analíticas procedentes del fenómeno fotoluminiscente son: fluorimetría y fosforimetría. Entre ellas, la fluorimetría se ha convertido en la técnica habitualmente utilizada en el desarrollo de sensores ópticos luminiscentes. Sin embargo, el número de sensores fosforescentes a temperatura ambiente es mucho menor que el número de sensores fluorescentes existentes. Esto se debe al limitado número de moléculas disponibles, que sean capaces de desarrollar fosforescencia. No obstante, en la actualidad la fosforescencia está adquiriendo un mayor interés como método de detección frente a la fluorescencia, debido a las numerosas ventajas que presenta para el desarrollo de sensores ópticos⁸:

- La posibilidad de desarrollar instrumentación sencilla, empleando componentes electrónicos de bajo coste que permitan la medida de tiempos de vida de fosforescencia, debido a los tiempos de vida elevados del estado triplete.
- El uso de fuentes pulsadas (con un tiempo de demora adecuado tras la excitación) proporciona elevadas relaciones señal/ruido, evitándose de esta manera las posibles interferencias de emisiones fluorescentes residuales o luz dispersa.
- La enorme diferencia existente entre las longitudes de onda de excitación y emisión fosforescente, facilita que la discriminación entre ellas sea más sencilla mediante el empleo de sistemas de selección espectral de bajo coste.

- El desarrollo de sistemas más selectivos proporcionados por la fosforescencia, que es un fenómeno menos habitual que la fluorescencia.

Sin embargo, existen algunas desventajas importantes como:

- ✗ El uso limitado del sistema de detección fosforescente porque existen pocas moléculas que presenten emisión fosforescente.
- ✗ La necesidad de la desoxigenación de la muestra para la medición de la emisión fosforescente del analito, ya que el oxígeno es un “quencher” o desactivador muy eficaz de la fosforescencia⁶³.

III.2.5. *Sensores tipo célula de flujo: Optosensores*

Un sistema analítico convencional de flujo continuo consta de tres etapas: la transferencia de analito entre dos fases, las reacciones (bio)químicas y la detección continua en una celda de flujo convencional⁴.

El dispositivo que lleve a cabo de forma simultánea la detección junto con la reacción y además, la separación en la celda de flujo puede denominarse como optosensor, ya que reúne las características principales de un sensor (respuesta directa, reversible, continua y rápida a las variaciones en la concentración del analito de interés). El término optosensor fue introducido por Ruzicka y Hansen⁶⁴ para definir un nuevo principio de detección mediante análisis por inyección en flujo, basado en el cambio de las propiedades ópticas de una superficie activa localizada en el paso de un flujo.

La realización simultánea de la retención del analito y del proceso de detección óptica en un sistema de análisis por inyección en flujo (FIA) abre un nuevo horizonte de posibilidades para superar ciertos inconvenientes asociados a los sensores ópticos^{65,66}.

La metodología proporcionada por las técnicas FIA ofrece numerosas ventajas analíticas como: fundamento sencillo, equipamiento de bajo coste, bajo consumo de muestra y reactivos, elevada frecuencia de muestreo y fácil automatización. Los métodos cinéticos comprenden las técnicas FIA, y por consiguiente, éstas presentan generalmente una mayor selectividad que las correspondientes técnicas manuales. La exactitud y la precisión de las técnicas FIA son realmente extraordinarias, teniendo en cuenta que se fundamentan en la realización de medidas de sistemas en estado transitorio.

La técnica FIA se basa fundamentalmente en una inyección o inserción directa de la muestra líquida en un flujo continuo y no segmentado. De esta forma, la muestra es transportada por el flujo del sistema, teniendo lugar uno o varios procesos adicionales entre ésta y el fluido portador. El analito atraviesa un sistema de detección apto para la realización de mediciones en continuo, proporcionando una señal transitoria que está relacionada con la concentración de la especie de interés (analito). El seguimiento de diversos factores tales como la velocidad de flujo, el diseño geométrico del sistema y la longitud y diámetro de los tubos proporciona un grado de dispersión de la muestra considerablemente reproducible.

Las condiciones experimentales que se llevan a cabo habitualmente en los sistemas FIA ocasionan una mezcla incompleta del bolo de muestra inyectado en el flujo portador. Por ello, se entiende que la reproducibilidad del tiempo de operación sea una característica fundamental de esta metodología, debido a que las medidas se

realizan en condiciones de no equilibrio. La bibliografía recoge de forma detallada el amplio tratamiento de esta temática^{4, 67}.

También es importante resaltar la enorme potencialidad del sistema FIA debido a que su carácter modular resulta fácil de adaptar a cualquier necesidad analítica concreta. En las últimas décadas, el enorme avance experimentado por esta técnica se corresponde con su excepcional versatilidad. Este tipo de sistema en flujo puede ser aplicado con éxito para el análisis de rutina de un laboratorio. Un sistema FIA ordinario está formado como mínimo por cuatro partes esenciales (véase Figura 5):

- ◆ Unidad de propulsión: dispositivo impulsor de un gas inerte o un portador a lo largo del sistema. Generalmente se utiliza una bomba peristáltica.
- ◆ Sistema de inyección: dispositivo a través del cual se introduce la muestra. Generalmente se emplea una válvula de cuatro o seis vías.
- ◆ Zona de reacción: zona donde se puede dar o no alguna reacción adicional.
- ◆ Sistema de detección: zona donde está localizada la celda de flujo.

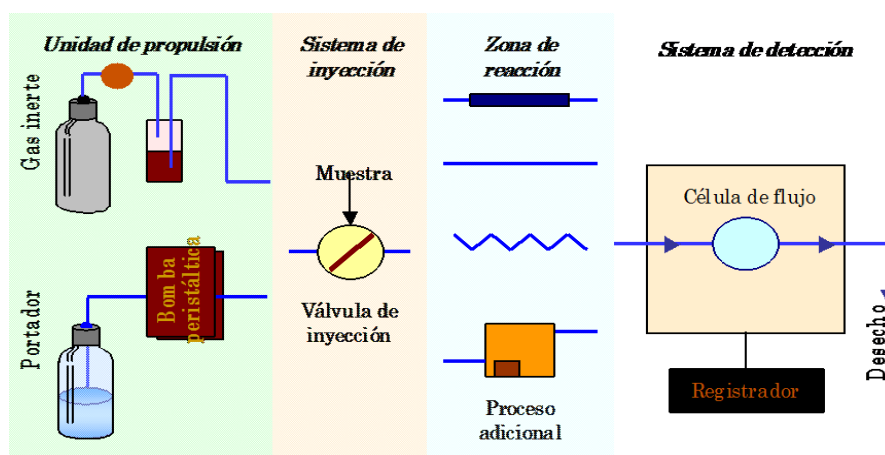


Fig. 5. Esquema general de un sistema FIA.

El sistema FIA empleado en esta tesis tiene un conjunto de particularidades, y está compuesto por una bomba peristáltica que impulsa tanto el portador A como el portador B, una válvula de inyección de muestra (válvula 1), una válvula de regeneración (válvula 2), una válvula de selección de flujo (válvula 3) y un sistema de detección, que consiste en una cubeta de flujo localizada en el compartimento de muestra del espectrómetro de luminiscencia en el caso de los optosensores convencionales (véase Figura 6).

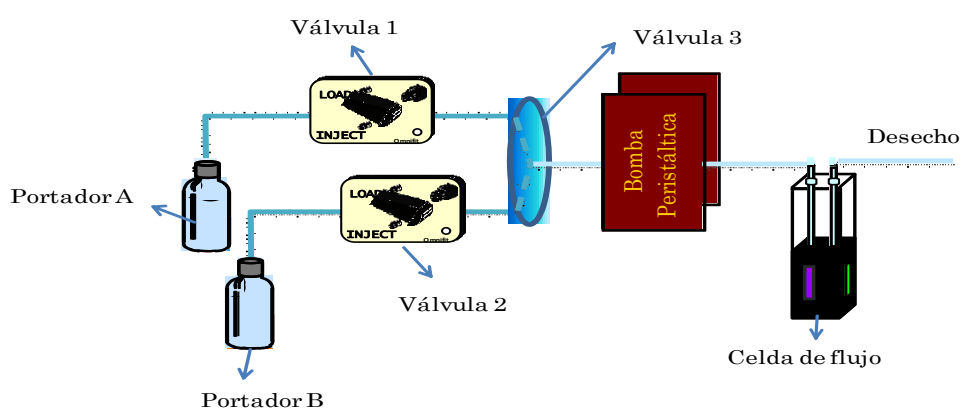


Fig. 6. Esquema del sistema FIA empleado en esta tesis.

Una de las propiedades más importantes de los sensores tipo célula de flujo es su total compatibilidad con los sistemas FIA. La conjunción de las características intrínsecas de los sistemas de inyección en flujo (automatización, flexibilidad, acondicionamiento y calibrados de muestra sencillos, desarrollo previo de reacciones químicas, etc.) junto con las características de la utilización de fases sensoras (selectividad, preconcentración del analito, etc.) posibilitan su aplicación a toda clase de muestras reales⁴.

El acoplamiento de los sensores tipo célula de flujo con los sistemas FIA puede ofrecer soluciones a algunos de los problemas presentados por los sensores ópticos, como son largos tiempos de respuesta marcados por lentos procesos de difusión del analito desde la muestra a la fase activa, los cuales reducen la utilidad práctica de éstos. En este sentido, los tiempos de respuesta pueden ser reducidos mediante la incorporación de un pequeño bolo de muestra en el flujo portador, que va a interaccionar con la fase sensora de forma transitoria. De igual modo, una discriminación cinética entre el analito y otras sustancias interferentes se puede llevar a cabo con el tiempo de exposición, cuando éstas posean una velocidad de difusión diferente. Otra característica fundamental de los sistemas FIA es su facilidad para acoplar un sistema de regeneración de la fase sensora en el caso de irreversibilidad de la reacción de reconocimiento, de un modo simple y automático⁴.

El empleo de fases sólidas para la detección en un sistema FIA presenta, en principio, dos ventajas inherentes (propias del equilibrio heterogéneo sólido-líquido) comparándolo con el uso más frecuente de fases líquidas que contengan el reactivo⁶⁸:

1. La transferencia de masa radial en un reactor empaquetado es mucho más elevada que en un reactor hueco, debido a que la contribución de la difusión radial en el equilibrio sólido-líquido en el interior del reactor es más eficaz.
2. El equilibrio sólido-líquido se produce también en aquellos elementos de la muestra donde no existe dispersión, ya que el equilibrio proviene únicamente de la interfase sólido-líquido.

Desde el punto de vista experimental, las principales ventajas que se pueden obtener con el empleo de fases sólidas en sistemas de análisis en flujo, se citan a continuación⁴:

- ◆ **Aumento de la sensibilidad** empleando fases sólidas, debido a que la sensibilidad de los sistemas de análisis en flujo puede aumentarse por:
 - *Preconcentración en línea o in situ*: es uno de los métodos más efectivos para incrementar la sensibilidad. Desde el punto vista físico, la preconcentración puede obtenerse acoplado una unidad apropiada de separación (por ejemplo una microcolumna con un relleno adecuado) en el sistema en flujo. Si la fase sólida se encuentra localizada en la célula de flujo de un detector óptico no destructivo, se obtiene un sistema particular de preconcentración in situ, que combina ambos procesos de retención y detección⁶⁵. Este sistema de preconcentración tiene lugar en los optosensores.
 - *Disminución de la dilución*: los primeros reactores sólidos utilizados en el desarrollo de sistemas FIA fueron de naturaleza redox⁷⁰, ya que de este modo, se evita la correspondiente dilución empleando un reductor adicional.
 - *Aumento de la estabilidad de los reactivos*: los reactivos (por ejemplo, enzimas) inmovilizados sobre soportes apropiados tienen una mayor estabilidad que en disolución, y se han empleado ampliamente en sistemas FIA tanto para determinar sustratos^{71, 72}, como actividades enzimáticas⁷³.
- ◆ **Aumento de la selectividad** utilizando fases sólidas. Los métodos FIA son más selectivos que sus homólogos manuales. Esto es debido a que las medidas se realizan sin alcanzar las condiciones de equilibrio, por lo que se eliminan las interferencias de especies que reaccionen más lentamente que el analito⁷⁴.

Los optosensores deben poseer un conjunto de determinadas características para su correcto funcionamiento:

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

A continuación, se enuncian las ventajas que presentan los optosensores como son:

- Mayor sensibilidad con la disminución de la dispersión de la muestra inyectada.
- Mejora indirecta de la selectividad eliminando especies interferentes y señales parásitas a través de medidas cinéticas.
- Regeneración sencilla de la fase sensora, de forma simple y automática, en el caso de irreversibilidad del mecanismo de reconocimiento.
- Mejora de las características intrínsecas de los sensores derivada del empleo de la técnica FIA: acondicionamiento y desarrollo de métodos sencillos, automatización, desarrollo previo de reacciones químicas, flexibilidad, etc.

Por el contrario, las principales desventajas de los optosensores son:

- ✘ La necesidad de un sistema para impulsar la muestra.
- ✘ La dificultad del análisis remoto a largas distancias y en micromuestras, limita en gran parte el uso de optosensores de fibra óptica.

- ✘ La necesidad de compatibilidad entre la zona sensible y el detector.
- ✘ La posibilidad de dificultades y/o problemas si las cinéticas originadas por los procesos de separación y reacción son demasiado lentas.

Además, la fase sólida empleada en los optosensores debería cumplir los siguientes requisitos⁶⁶:

- ✿ Tamaño de partícula elevado: para evitar sobrepresiones en el sistema.
- ✿ Resistente mecánicamente: al flujo del sistema.
- ✿ Químicamente inerte: a la composición de las disoluciones constituyentes del flujo.
- ✿ Compatible con el sistema de detección empleado.
- ✿ Procesos de retención/elución rápidos.

Diversos factores como son la longitud del camino óptico de la célula de flujo, las dimensiones físicas del sistema FIA (longitud y diámetro de tubería, número de conexiones, etc.), la velocidad de flujo y el volumen de inyección han demostrado poseer una enorme influencia en la respuesta del optosensor⁶⁶.

Por último, es importante resaltar que las aplicaciones donde los optosensores han experimentado una mayor demanda en los últimos años han sido los análisis clínicos y farmacéuticos⁷⁵⁻⁷⁷, la detección de pesticidas⁷⁸⁻⁸⁰, el análisis de contaminantes orgánicos en agua⁸¹⁻⁸³, etc.

III.2.6. Sensores tipo sonda: Optodos

El continuo avance de la fotónica así como el bajo coste de los componentes ópticos, han fomentado un enorme interés por la investigación y el diseño de sensores que empleen fibra óptica⁸⁴.

Los sensores que emplean fibra óptica se han denominado *optodos*⁸⁵, cuya terminología proviene del griego “οπτιχος”: óptico y “οδος”: camino; u *optrodos*, cuyo término proviene de “optical electrode”⁶². El término optodo es más correcto desde el punto de vista lingüístico, por lo que será utilizado a lo largo de esta memoria. Evidentemente, el principio de operación de los optodos es muy diferente respecto al de los electrodos, ya que la señal generada es óptica y no eléctrica como en el caso de los electrodos.

Un optodo es un dispositivo constituido básicamente por una fase sensora o membrana ópticamente activa soportada sobre una guía de onda. La guía de onda más comúnmente utilizada para dispositivos sensores posee una morfología cilíndrica (fibra óptica). Por ello, el término optodo hace referencia en la mayoría de los casos a los sensores de fibra óptica^{37, 86-88}.

Sin embargo, existen optodos que utilizan guías de onda planas, dando lugar a los denominados sensores planos o sensores tipo chip⁸⁹⁻⁹².

Las principales ventajas que presentan los optodos frente a otro tipo de sensores son las siguientes^{93, 94}:

- ▶ A diferencia de los sensores potenciométricos, donde se miden diferencias absolutas entre dos potenciales, los optodos no necesitan una señal de referencia.

- ▶ Son dispositivos pasivos constituidos por materiales dieléctricos, químicamente inertes en su mayoría, lo que les proporciona pasividad eléctrica y química. Se pueden utilizar por tanto en ambientes peligrosos, corrosivos, radiactivos, con riesgo de explosión, etc.
- ▶ Al ser la fibra óptica^{N. del A.} un medio dieléctrico, los optodos no se ven influenciados por interferencias electromagnéticas, pudiendo emplearse en medios altamente contaminados desde el punto de vista electromagnético, en contraposición a los sensores eléctricos convencionales, que son muy sensibles a las mismas. En aplicaciones clínicas no representan un peligro para el paciente, ya que no es necesaria una conexión eléctrica directa con el cuerpo, por lo que son fundamentalmente adecuados en radioterapia debido a su inmunidad a los campos electromagnéticos.
- ▶ La biocompatibilidad de la fibra óptica y la sencillez en la realización de interfases entre el sensor y la zona de medida posibilita su uso para la detección, medida e incluso, actuación de/sobre variables biomédicas.
- ▶ Los pequeños diámetros de las fibras ópticas (con valores típicos comprendidos entre 50 y 200 μm) y la disponibilidad de componentes de pequeño tamaño y bajo coste permiten la miniaturización de estos dispositivos.
- ▶ Las fibras ópticas de bajas pérdidas permiten la transmisión de señales a largas distancias, típicamente desde 10 a 1000 metros e incluso kilómetros si se emplean amplificadores. Ello posibilita la realización de análisis in situ en ambientes peligrosos como zonas radiactivas, lugares con temperaturas

^{N. del A.} Se hablará de fibra óptica por ser universalmente el término más empleado, pero entiéndase que de forma genérica se habla de guía de onda (tanto de morfología cilíndrica como plana).

extremas y salas limpias, entre otros. Asimismo, su utilización favorece una mayor flexibilidad espacial a la hora de usar otros instrumentos.

- ▶ La realización de análisis en tiempo real, ya que no se requiere la primera etapa del proceso analítico (muestreo).
- ▶ La capacidad de multiplexación, que permite compartir la misma fuente y el mismo detector por diversos sensores, disminuyendo de este modo el coste y posibilitando el desarrollo de grandes redes de sensores.
- ▶ La posibilidad de realización de análisis no destructivos (puesto que en la mayor parte de los casos no se produce consumo del analito), resultando crítica si se poseen pequeñas cantidades de muestra.
- ▶ La posibilidad de desarrollar optodos que respondan a determinados analitos, para los cuales no existen electrodos disponibles.
- ▶ Las fibras ópticas son capaces de transmitir mayor densidad de información que los cables eléctricos porque poseen un ancho de banda más grande. Esto se debe a que las señales ópticas pueden diferir en cuanto a longitud de onda, fase, modulación de intensidad o polarización. Como resultado, una única fibra óptica puede, en principio, transmitir simultáneamente varias señales, permitiendo de este modo el análisis de varios analitos al mismo tiempo.
- ▶ La dependencia de las fibras ópticas con respecto a la temperatura es mucho menor que la de los electrodos. En algunos casos esta dependencia es casi inapreciable; si se utilizan fibras ópticas de elevado punto de fusión, ya que con ellas se puede aumentar el intervalo de temperaturas de trabajo, sin modificar prácticamente las prestaciones del sensor.

No obstante, los optodos también presentan una serie de limitaciones o inconvenientes como son:

- ✘ La estabilidad limitada de los reactivos inmovilizados a largo plazo. Este problema se puede compensar, en cierto modo, llevando a cabo la detección a diferentes longitudes de onda, empleando sensores basados en tiempos de vida, o simplemente sustituyendo la fase reactiva.
- ✘ Los elevados tiempos de respuesta que se obtienen en algunos casos, debido a la localización del indicador y del analito en diferentes fases, por lo que se requiere una etapa de transferencia de masa antes de alcanzar el equilibrio y, por lo tanto, hasta que se obtiene una respuesta constante. Este problema se disminuye considerablemente mediante el uso de pequeñas fases reactivas. Por otro lado, la transferencia de masa puede resultar en ciertos casos, en un incremento de la sensibilidad y la selectividad.
- ✘ La necesidad de indicadores más selectivos y procesos de inmovilización más reproducibles que permitan aumentar la selectividad y estabilidad a largo plazo de los optodos.
- ✘ Las fibras ópticas disponibles en la actualidad contienen impurezas de naturaleza espectral que pueden provocar absorción, fluorescencia o dispersión Raman de fondo. El material que constituye la fibra óptica determina el intervalo útil de longitudes de onda. Por ejemplo, las fibras ópticas de plástico se emplean en la región comprendida entre 420 y 800 nm, mientras que las fibras ópticas de cuarzo transmiten la radiación UV y las de vidrio se usan en la región visible del espectro electromagnético.

- ✘ La creciente necesidad de accesorios ópticos comerciales es otro inconveniente. Se precisan fuentes luminosas estables y de largo tiempo de vida útil, mejores conectores y fibras ópticas, y láseres baratos. Aunque en la actualidad ya existan LEDs (light emitting diodes), OLEDs (organic light emitting diodes) y LDs (laser diodes) para la región visible a precios asequibles, los costes de los mismos aumentan considerablemente si nos desplazamos hacia el UV. Sin embargo, se están logrando avances en el desarrollo de LEDs en este campo⁹⁵.

Desde el punto de vista económico, se puede afirmar que la fibra óptica está considerada como el sistema más rentable por su elevada relación calidad-precio.

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

Por ello, la transmisión de las fibras ópticas en la región visible o incluso ultravioleta todavía no está muy perfeccionada, aunque ya se presentan algunas fibras solarizadas para tales fines.

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

Los sensores de fibra óptica se pueden clasificar en intrínsecos y extrínsecos, dependiendo del lugar donde se lleve a cabo el reconocimiento del analito, produciéndose dicha interacción en la fibra óptica o fuera de ella^{94, 96, 97}:

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

Este tipo de sensores se pueden subdividir en tres grupos:

- **De 1ª generación, optodos pasivos o directos:** En ellos, la fibra solamente se utiliza como guía de luz. Estos sensores se han empleado para realizar análisis espectrofotométricos a grandes distancias o para aplicaciones en las que no es posible el contacto físico con la muestra (por ejemplo, análisis de muestras a elevada presión). Su durabilidad, estabilidad, resistencia, simplicidad y que requieren calibración son sus principales ventajas. Sin embargo, son poco selectivos y solamente pueden ser empleados para un número limitado de analitos.
- **De 2ª generación:** En ellos, la información analítica se genera a través de una reacción indicadora, puesto que el analito no posee un método directo de detección sensible. Dentro de este tipo de sensores se clasifican los denominados “sensores con depósito”, en los que el reactivo se coloca en un depósito y se alimenta de forma continua para su reacción con el analito en el terminal sensible.

- **De 3ª generación:** Están constituidos por una biomolécula acoplada a un sensor de segunda generación (por ejemplo, un sensor de oxígeno o de pH). Después de reaccionar con la biomolécula, el analito se transforma/correlaciona con la especie monitorizada mediante el sensor de segunda generación.

Los sensores de 2ª y 3ª generación también se denominan optodos activos o indirectos. Ellos presentan mayor selectividad que los pasivos y no se ven influenciados por el índice de refracción del medio. Sus desventajas son la posible lixiviación o fotodescomposición del indicador en contacto con la muestra, los tiempos de respuesta más elevados y la mayor complejidad de construcción.

- ▶ **Sensores intrínsecos:** Son aquellos en los que la propia fibra óptica actúa como sensor cuando se modifica alguna de sus propiedades por el analito a cuantificar. En este caso, a diferencia de los sensores extrínsecos, no se mide una propiedad óptica del analito o de la fase reactiva, sino el cambio en las propiedades ópticas de la fibra producido por la reacción química con el analito, que tiene lugar en el núcleo o en la superficie de la propia fibra óptica.

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

Dentro de este grupo, los efectos que han proporcionado un mayor número de aplicaciones han sido los siguientes:

- **Sensores refractométricos:** En ellos, se produce la interacción de la onda evanescente, transmitida hacia el exterior del núcleo de fibra, con el medio a analizar (generalmente un líquido), provocándose una modificación de las constantes de propagación de la fibra en función del índice de refracción del medio exterior.
- **Sensores de onda evanescente:** En ellos, se produce la absorción de luz por parte de las moléculas situadas en el campo evanescente de la fibra óptica, superponiéndose las características espectrales del analito con las correspondientes de la propia fibra óptica.
- **Sensores basados en modificaciones del recubrimiento y de la interfase núcleo-revestimiento:** Las propiedades del recubrimiento de la fibra óptica se modifican con la presencia o la concentración del analito modificándose su interacción con la onda evanescente.
- **Sensores basados en una modificación del núcleo de la fibra óptica:** En ellos, el analito origina una variación de las características ópticas del propio núcleo. En comparación con las técnicas de onda evanescente, los niveles de señal son más elevados, ya que coincide con la zona donde se produce una mayor densidad de energía luminosa. Sin embargo, el factor limitante es una mayor lentitud en la respuesta de este tipo de sensores, que está sujeta a la “entrada” del analito al núcleo.

Otro tipo de clasificación de los sensores de fibra óptica se refiere a la forma de la modulación de la señal empleada por el sistema transductor:

- ✿ **Sensores de amplitud o modulados en intensidad:** La interacción con el analito modifica la amplitud (intensidad) de la radiación transmitida por la

fibra óptica. Son los más utilizados porque emplean fuentes de luz incoherentes y elementos ópticos más sencillos. Presentan unas prestaciones comparables a los sensores tradicionales.

- ✿ **Sensores de fase o interferométricos:** La interacción con el analito produce un cambio en la fase de la señal óptica. Requieren fuentes de luz coherentes, fibras ópticas monomodo y dispositivos complejos para el control de la polarización. Por este motivo, estos sensores son muy sensibles pero tienen un mayor coste de fabricación.
- ✿ **Sensores de tiempo de vida:** El tiempo de vida de emisión de la señal se modifica en función de la propiedad medida del analito.
- ✿ **Sensores de modulación modal:** El transductor modula los rayos que viajan a diferentes ángulos en la fibra óptica.
- ✿ **Sensores polarimétricos:** El transductor modula la polarización de la luz.

Por último, cabe destacar que las áreas donde se han encontrado mayores aplicaciones de los sensores de fibra óptica son, entre otras: el diagnóstico clínico, la biomedicina y biotecnología⁹⁸⁻¹⁰⁰; el medioambiente^{16, 17}, el control de procesos industriales^{101, 102}, el análisis agrícola y veterinario^{103, 104}, la seguridad y defensa^{105, 106}, y la robótica¹⁰⁷.

III.2.7. Sensores de luminiscencia molecular

Los sensores de luminiscencia se basan en la información obtenida a partir de los espectros de emisión de moléculas que han sido previamente excitadas. A la hora

de desarrollar sensores ópticos, se ha recurrido con mayor frecuencia a la fluorescencia que a la fosforescencia, dado el mayor número de reacciones indicadoras fluorescentes conocidas, que pueden ser utilizadas para la determinación continua y reversible de moléculas de interés. Por otra parte, si se compara con la fotometría convencional, las técnicas luminiscentes son más sensibles y selectivas, ofrecen mayor versatilidad y las medidas pueden ser realizadas utilizando una única fibra óptica, ya que la excitación y la emisión se producen a diferentes longitudes de onda. Por todo ello, el número de sensores ópticos basados en medidas de luminiscencia se ha incrementado considerablemente en los últimos años^{83, 108, 109}.

A la hora de desarrollar un sensor luminiscente se pueden distinguir habitualmente tres tipologías:

- ▶ El analito es un luminóforo.
- ▶ El reactivo indicador presenta propiedades luminiscentes que varían como resultado de la interacción de éste (en el estado fundamental) con el analito.
- ▶ La emisión luminiscente del reactivo disminuye debido a la interacción de éste (en el estado excitado) con el analito (desactivación dinámica de la emisión, aumento de la misma o un efecto de transferencia de energía entre dos indicadores que pueden ser ambos luminiscentes o bien uno solo).

Los sensores de fibra óptica utilizan a menudo los métodos luminiscentes, debido a la gran sensibilidad y selectividad que éstos presentan con respecto a los fotométricos. Sin embargo, no siempre se pueden aplicar estas técnicas, ya que existe un número muy limitado de especies químicas capaces de emitir luminiscencia. Por este motivo, se recurre a los sensores semiactivos, en los que el luminóforo no es el analito objetivo, sino un indicador situado en el extremo de la fibra óptica, cuya

luminiscencia es sensible a la concentración de analito presente en la muestra. Los sensores de fibra óptica basados en medidas de luminiscencia pueden detectar variaciones en la intensidad de emisión^{110, 111}, en el tiempo de vida de emisión del estado excitado^{112, 113}, o bien en la polarización de la radiación.

Las ventajas de la utilización de medidas de intensidad de emisión luminiscente en sensores de fibra óptica son:

- Sensibilidad elevada.
- Selectividad.
- Versatilidad.
- Flexibilidad espacial.

Sin embargo, pueden aparecer interferencias en las medidas provocadas por:

- ✗ La presencia de desactivadores distintos al analito.
- ✗ El efecto de filtro interno: Se produce cuando la concentración de luminóforo presente en la muestra es elevada ($2.3 \cdot C \cdot \epsilon \cdot l > 0.05$), y tiene como resultado una disminución de la luminiscencia, debida a fenómenos de autoatenuación (desactivación por choques entre las moléculas) y autoabsorción (por solapamiento de los espectros de absorción y emisión).
- ✗ La fotodegradación del indicador empleado, tras ser expuesto durante un tiempo prolongado a la intensa radiación de la fuente de excitación.

- ✘ La presencia de un gran número de moléculas absorbentes en la muestra, que hace que solo las más cercanas a la fuente sean excitadas, impidiendo que el haz de radiación llegue al resto.
- ✘ La medida de la intensidad absoluta de emisión también se puede ver afectada por las fluctuaciones de intensidad de la fuente y la respuesta del detector, así como por las características de transmisión de la fibra óptica.

III.2.8. *Mecanismos de reconocimiento óptico*

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

1. **Mecanismo de interacción directa analito-soporte:** La fase sensora, que no incluye ningún aditivo ópticamente activo, interacciona con el analito que se retiene por interacciones físicas y/o químicas, preconcentrándose y produciendo una variación en las propiedades ópticas de la fase sensora, que es proporcional a la concentración de analito.
2. **Mecanismo catalítico/enzimático:** La fase sensora contiene, al menos, un catalizador o un enzima inmovilizado que en presencia del analito de interés cataliza una reacción donde se genera una nueva sustancia que produce un cambio en las propiedades ópticas de la misma. Este cambio puede ser un aumento o una disminución de la propiedad óptica medida, por ejemplo, la aparición de luminiscencia, siendo ésta proporcional a la concentración de analito.

3. **Mecanismo de interacción directa analito-cromoionóforo:** La fase sensora posee un cromoionóforo, que tras interactuar con el analito de interés (interacción física o química), cambia alguna de sus propiedades ópticas. Esta variación puede ser un aumento o una disminución de dicha propiedad, por ejemplo, la aparición de luminiscencia, que es proporcional a la concentración de analito.

4. **Mecanismo de coextracción o cambio iónico:** La fase sensora contiene un ionóforo (que interactúa con el analito), un cromoionóforo (cuyas propiedades ópticas serán sensibles al cambio de una propiedad química de la membrana, por ejemplo, el pH) y, en caso de cambio de carga en la membrana debido a la entrada o salida de especies cargadas, un aditivo aniónico lipofílico encargado de mantener la electroneutralidad dentro de la membrana. La interacción del analito de interés con el ionóforo provoca un cambio en una propiedad química de la membrana, por ejemplo, la entrada de iones H^+ (coextracción) que modifica el pH de la membrana o la cesión de H^+ del ionóforo al cromoionóforo (cambio iónico), que al igual que en el caso anterior, produce un cambio de pH de la membrana. Esta variación de una propiedad química de la membrana, siguiendo con el ejemplo de cambio de pH, induce un cambio en las propiedades ópticas del cromoionóforo, que se relaciona con la concentración del analito de interés. Por tanto, es un mecanismo de reconocimiento indirecto.

III.3. INSTRUMENTACIÓN EN SENSORES ÓPTICOS

III.3.1. Componentes de la instrumentación

La **instrumentación** utilizada en el desarrollo de sensores ópticos puede ser simple o compleja dependiendo de la aplicación concreta y del principio de medida empleado. Los dispositivos construidos pueden emplear o no fibra óptica. En general, los componentes básicos para el desarrollo de sensores ópticos son los siguientes:

1. **Fuente de radiación óptica.**
2. **Dispositivos ópticos.**
3. **Detector.**
4. **Sistema de registro y de procesamiento de datos.**

Un esquema simplificado de los **componentes básicos** de un sensor óptico se muestra en la Figura 7. A continuación, se va a comentar de forma genérica y resumida los distintos componentes mencionados anteriormente⁹⁷. No obstante, una descripción más detallada de los mismos puede ser encontrada en publicaciones especializadas^{114, 115}.

III.3.2. Fuente de radiación óptica

La fuente debe ser capaz de proporcionar una **radiación** lo suficientemente intensa para excitar adecuadamente la fase sensora, de modo que la señal procedente de la fase sensora se detecte con facilidad. Una de las características más importantes

de una fuente de radiación, empleada en la construcción de sensores ópticos, es su estabilidad. El problema de la estabilidad de la fuente de radiación es solucionado en algunos dispositivos de medida mediante el diseño de sistemas de doble haz, que permiten recoger simultáneamente la señal procedente de la fuente de radiación (en ausencia de muestra), anulando así el efecto de las posibles fluctuaciones de la radiación electromagnética. Otra alternativa es el uso de sensores ópticos basados en la medida del tiempo de vida medio de luminiscencia, los cuales son inmunes a este tipo de fluctuaciones.

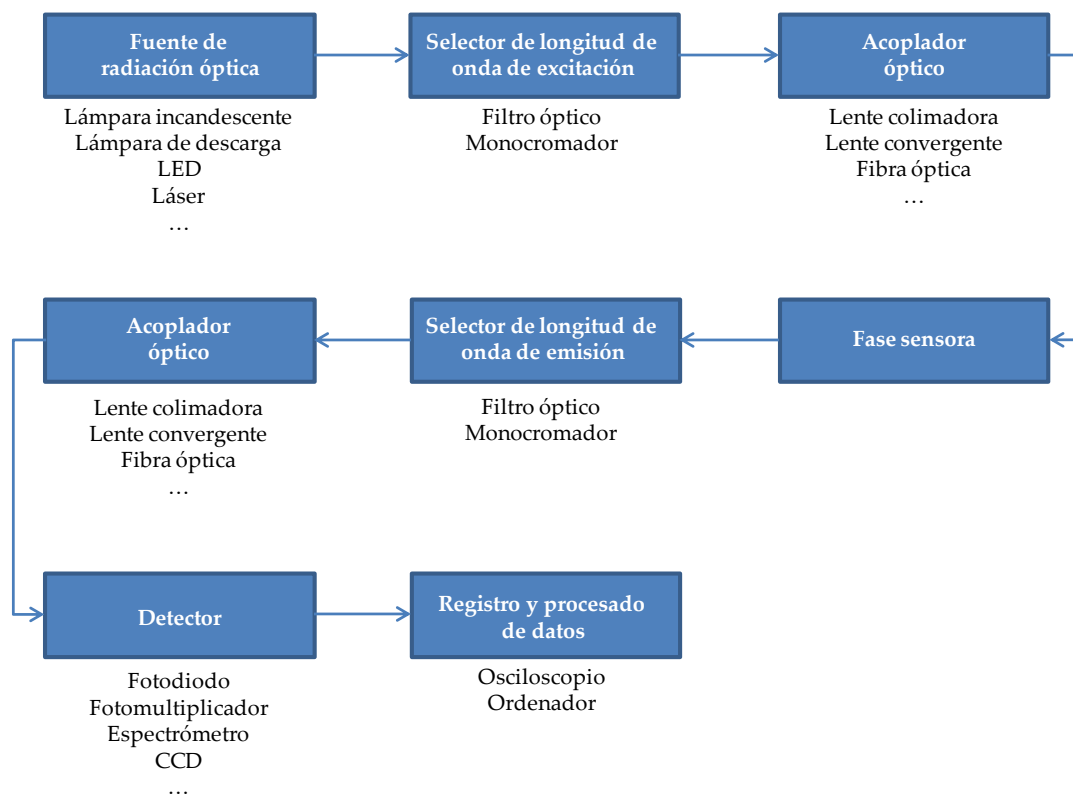


Fig. 7. Esquema simplificado de los componentes básicos de un sensor óptico.

La elección de la **fuente de radiación** depende en gran medida de las características espectroscópicas de la fase sensora, del tipo de aplicación en concreto, del coste y del tamaño del dispositivo final. En la actualidad se dispone de una

amplia variedad de fuentes de radiación entre las que podemos citar: lámparas incandescentes, lámparas de descarga, diodos electroluminiscentes y láseres (en sus diferentes versiones).

Las **lámparas incandescentes** (wolframio o wolframio-halógeno) proporcionan radiación en el intervalo comprendido entre 350 y 2500 nm, siendo útiles para medidas en el visible o en el infrarrojo cercano (NIR). Estas lámparas se emplean generalmente para medidas de absorbancia y reflectancia, debido a su baja intensidad de radiación

Las **lámparas de descarga** (deuterio, mercurio o xenón) proporcionan intensidades de radiación más elevadas que las lámparas incandescentes. Este tipo de lámparas es apto para la realización de medidas de luminiscencia. Por un lado, las lámparas de xenón tanto continuas como pulsadas se han empleado para medidas de fotoluminiscencia, puesto que generan un espectro continuo en el intervalo de longitudes de onda comprendido entre 250 y 600 nm. Por otro lado, las lámparas de deuterio se han utilizado principalmente para la región ultravioleta porque producen un espectro continuo desde 160 a 375 nm sin líneas de emisión. No obstante, las lámparas de mercurio con sus características líneas espectrales también se han usado para tales fines por su elevada intensidad de radiación.

El empleo de los **diodos electroluminiscentes** (LEDs) en la construcción de sensores ópticos ha aumentado notablemente durante los últimos años debido a su bajo coste, facilidad de manejo y emisión relativamente monocromática. El intervalo genérico de longitudes de onda proporcionado por estos dispositivos va desde 480 nm (LEDs azules) hasta 4 μm (diodos emisores de radiación IR). Sin embargo, proporcionan una intensidad de radiación relativamente baja y un uso limitado en la región ultravioleta.

Los **láseres** proporcionan una radiación monocromática muy intensa. Su utilización está especialmente indicada para la realización de medidas “remotas” o en el caso de sensores contruidos con una única fibra óptica, donde la cantidad de luz que alcanza la fase sensora es limitada. Sin embargo, estas fuentes presentan ciertas desventajas como son su elevado coste o la posibilidad de dañar la fibra óptica y/o la fase sensora como consecuencia de su elevada intensidad, lo que hace que su uso no se encuentre muy extendido.

III.3.3. Dispositivos ópticos

Un elemento esencial en el diseño y la construcción de sensores de fibra óptica es el acoplamiento de la fuente, la fase sensora y el detector para lograr reducir al máximo las posibles pérdidas de radiación electromagnética. Esto se consigue mediante el empleo de **acopladores ópticos** (generalmente lentes de vidrio, lentes de cuarzo y/o fibras ópticas) que enfocan el haz luminoso procedente de la fuente de la radiación hacia la fase sensora, así como la radiación procedente de la fase sensora hacia el detector.

En el caso de los láseres, esta operación de enfoque se puede llevar a cabo de forma eficaz, ya que la sección transversal del haz de luz suministrado por el láser es prácticamente igual a la sección transversal de la fibra óptica. En contraposición a éstos, los LEDs y las lámparas generan haces luminosos divergentes, lo que hace imprescindible el uso de estos sistemas para llevar a cabo dicho enfoque.

Las fibras ópticas, o mejor dicho las guías de ondas, pueden ser **cilíndricas** o **planas**; en este último caso, su utilización puede ser ventajosa, ya que son más fáciles de depositar con una fase sensora. Por otra parte, se controla mejor el ángulo de

incidencia de la radiación al construir el terminal sensible, resultando de este modo sensores de mayor reproducibilidad de fabricación y calidad.

Una fibra óptica está compuesta básicamente por un núcleo (región central encargada de la transmisión de la radiación) rodeado por un recubrimiento (capa intermedia que rodea al núcleo). Finalmente, el revestimiento puede ir forrado de una envoltura protectora plástica o metálica, que junto con la fibra en sí constituye el denominado “**cable óptico**”. Están constituidas por finas hebras de vidrio, sílice fundida o plástico, que son capaces de transmitir luz a grandes distancias, con una mínima atenuación y dispersión de la señal óptica, lo que evita la utilización de repetidores o amplificadores intermedios. Su pequeño tamaño, flexibilidad, inmunidad frente a interferencias electromagnéticas externas y la capacidad de multiplexación, son ventajas adicionales que han fomentado el uso de la fibra óptica en el campo de los sensores ópticos¹¹⁶.

Algunos parámetros característicos de las fibras ópticas se describen a continuación:

- ✿ **Apertura numérica:** Define el intervalo de ángulos de incidencia de luz en los que la fibra óptica transmite dicha luz. Su valor está normalmente comprendido entre 0.16 y 0.66, cuando el medio exterior de la fibra óptica es aire.
- ✿ **Atenuación:** Define la pérdida de potencia óptica de un haz de luz al viajar por la fibra. Se define como la relación entre la intensidad luminosa obtenida a la salida y la suministrada a la entrada, y se expresa en dB Km⁻¹. Los materiales usados en la fabricación de la fibra óptica se seleccionan con la finalidad de obtener el menor índice de atenuación posible.

- ✿ **Ancho de banda:** Define la cantidad de información que puede transmitir una determinada fibra óptica. Un rayo de luz se ensancha al viajar por la fibra y esta dispersión limita la capacidad de información que se puede transmitir.

Existen tres tipos básicos de fibra óptica que se muestran en la Figura 8:

- **Fibra multimodo de salto de índice (A):** Consta de un núcleo homogéneo con índice de refracción n_1 , rodeado de un recubrimiento con índice de refracción ligeramente menor n_2 . Tienen una gran distorsión modal y un ancho de banda muy limitado. Hoy en día, su principal campo de aplicación son las redes de datos y las aplicaciones industriales de ancho de banda pequeño y longitud corta.
- **Fibra multimodo de índice gradual (B):** Con esta fibra se logra una reducción de la distorsión modal, disminuyendo radialmente el índice de refracción del núcleo hacia el exterior. Para reducir la distorsión modal al mínimo, el perfil del índice debe ser casi parabólico. Se aplica, sobre todo, en las comunicaciones de banda ancha a gran distancia.
- **Fibra monomodo (C):** Con esta fibra se evita la distorsión modal, seleccionando un diámetro de núcleo tan pequeño ($\sim 10 \mu\text{m}$), que únicamente pueda propagar un solo modo. Se aplica especialmente en las redes troncales de gran ancho de banda y longitudes largas.

La mayoría de los núcleos de las fibras ópticas están constituidos por sílice fundida, vidrio, poli(metacrilato de metilo), poliestireno o un líquido adecuado. Las fibras ópticas de cuarzo transmiten en el intervalo de 190-1300 nm pero son cuatro veces más caras que las **fibras ópticas de vidrio**, que transmiten en el intervalo de 380-1300 nm. Las **fibras ópticas de plástico** son las más baratas, sin embargo

presentan grandes pérdidas, una pobre estabilidad frente a la radiación prolongada y un intervalo útil limitado (450-700 nm).

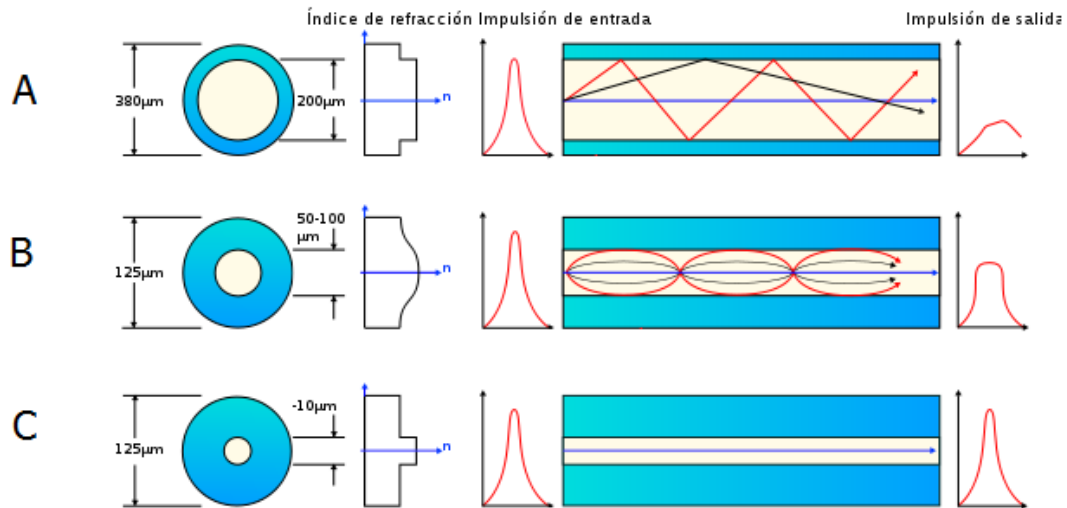


Fig. 8. Tipos de fibras ópticas: Perfiles de índice, secciones transversales y trayectorias típicas de propagación de rayos.

Por otra parte, las **fibras ópticas de cuarzo** son resistentes a los medios fuertemente ácidos o moderadamente básicos, puesto que sufren el ataque del ácido fluorhídrico y de las bases fuertes ($\text{pH} > 13$). Además pueden ser empleadas en la región ultravioleta, donde el número de aplicaciones está muy restringido por las propiedades intrínsecas de la radiación a estas longitudes de onda. La máxima temperatura a la que se puede trabajar con la mayoría de las fibras ópticas está limitada por la resistencia del material que constituye la “envoltura protectora” y suele ser de unos 125 °C. Para trabajar en el IR, exceptuando el NIR, se utilizan fibras de sílice fundida especial (de fluoruro de zirconio o vidrios de calcogenuro).

Las **fibras líquidas** funcionan de forma similar a las fibras ópticas sólidas, pero están formadas por tubos rellenos con un fluido transparente, en cuyos

extremos se localizan sendas placas pulidas de gel de sílice. En general, estas fibras transmiten en el intervalo de 270-720 nm.

Otros componentes incluidos en el sistema óptico son los **selectores de longitud de onda**. Ellos se encargan de aislar una banda de excitación perteneciente a una fuente de radiación que posea un intervalo de emisión muy extenso y de discriminar la señal con interés analítico generada en los sensores ópticos de la luz interferente que normalmente acompaña (principalmente emisión Raman y dispersión Rayleigh).

La necesidad del empleo de selectores de longitud de onda depende del tipo de medida en la que se fundamente el sensor óptico. Así, se puede requerir dos sistemas de selección de longitud de onda (uno para excitación y otro para emisión) para medidas de luminiscencia, uno para medidas de absorbancia y reflectancia (situado generalmente antes del detector) o ninguno para medidas de quimioluminiscencia. Los aspectos más importantes para la elección del selector de longitud de onda más adecuado son el coste, la resolución espectral y el propósito del análisis.

Los selectores de longitud de onda más utilizados son los **filtros ópticos** y los **monocromadores**. Los filtros ópticos son la elección más idónea para la construcción de un sistema sencillo y barato. Ellos dejan pasar un intervalo más o menos ancho de longitudes de onda y son relativamente económicos. Pueden ser de tres tipos: banda ancha, de corte o interferenciales. Sin embargo, el empleo de monocromadores es la única solución cuando se requiere una selección muy precisa de la longitud de onda para determinadas aplicaciones. Los monocromadores están especialmente diseñados para realizar barridos espectrales en aquellos sistemas, en los que sea imprescindible poder seleccionar de forma continua y en un amplio rango, la

longitud de onda exacta de la radiación electromagnética (procedente de la fuente de radiación o de la fase sensora).

III.3.4. Detectores

La **selección del detector** apropiado será siempre un compromiso entre la sensibilidad requerida y los factores económicos. Los tres tipos básicos de detectores empleados en la actualidad son:

- ▶ **Detectores fotoemisivos:** En este tipo de detectores se incluyen los **tubos fotomultiplicadores** (PMTs) y los **fototubos**. El tipo concreto se selecciona en función del intervalo de longitudes de onda de interés. Se basan en la emisión de electrones desde un fotocátodo y permiten unas ganancias de señal del orden de 10^6 (en la gran mayoría de los casos).

El tamaño, precio y alto voltaje requerido por los tubos fotomultiplicadores pueden ser factores limitantes para su aplicación en cierto tipo de instrumentación, donde los **fotodiodos** son preferidos por su menor tamaño y coste. Sin embargo, los PMTs son muy populares en instrumentos tales como fluorímetros o espectrofotómetros y para medidas de emisión con resolución temporal, dada su mayor sensibilidad y rapidez de respuesta (~1.5 ns).

- ▶ **Detectores fotovoltaicos:** Basados en la generación de una corriente en la unión de materiales semiconductores de tipo p y tipo n. Un representante típico de este tipo de detectores es el **fotodiodo de silicio**. Éstos poseen un bajo precio, pequeño tamaño y gran estabilidad, aunque son mucho menos sensibles que los fotomultiplicadores. La respuesta espectral de los mismos

(sensibilidad) aumenta a partir de los 400 nm hasta alcanzar un máximo en torno a los 900 nm.

Actualmente, existe una gran tendencia a utilizar **CCDs** (del inglés “coupled charged device”). Estos detectores están formados por un fotodiodo de silicio, divisible en un número determinado de elementos que permiten el procesamiento rápido de imágenes con una alta sensibilidad, poco ruido y un amplio rango dinámico. Por otra parte, consumen poca energía y permiten hacer calibrados en tiempo real, adquiriendo espectros completos, lo que permite establecer una referencia interna.

- ▶ **Detectores fotoconductivos:** Un semiconductor varía su resistencia al exponerlo a la luz de ciertas longitudes de onda mediante la generación de transportadores de carga. Pueden ser de distintos tipos: **de unión fotoconductora** (fototransistores y fotodiodos “positivo-intrínseco-negativo”) y **células fotoconductoras** (CdS y CdSe).

III.4. REACCIONES DE POLIMERIZACIÓN

III.4.1. Aspectos generales

Este apartado introduce algunos conceptos básicos y describe de forma introductoria los tipos de reacciones de polimerización, que se emplean en esta memoria, para la preparación de materiales poliméricos para el desarrollo de nuevas fases sensoras ópticas.

Las **reacciones de polimerización**^{117, 118}, que se van a describir a continuación, pueden ser utilizadas tanto para la síntesis de polímeros y copolímeros lineales como de polímeros y copolímeros con diferentes grados de entrecruzamiento.

III.4.2. Polimerización orgánica

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

Aunque ha sido el siglo XX el espacio temporal en el que estos materiales han llegado a su apogeo, no en vano se conoce a esta época como la “era del plástico”, lo cual no significa que la humanidad no los haya utilizado con anterioridad. El hombre desde sus orígenes siempre ha utilizado estos productos en distintos hábitos cotidianos, además de que la mayor parte de las biomoléculas presentes en todo organismo vivo se puedan definir como biopolímeros. De este modo, las proteínas y

los hidratos de carbono han formado parte de su alimentación. El mismo papel está formado por fibras celulósicas que es un material macromolecular. Las pieles de distintas especies animales y la lana han sido utilizadas desde siempre por el hombre para protegerse del frío. Sin embargo, estos productos naturales quedaron fuera del estudio de los laboratorios de química hasta el siglo XVIII. La razón se encuentra en las distintas propiedades que presentan estos materiales frente a las de las sustancias orgánicas e inorgánicas habituales. Así, muchos métodos implantados en los laboratorios de química desde los albores de ésta (como los procesos de purificación de sustancias, los procesos de cristalización, la destilación, etc.), eran infructuosos e inadecuados cuando se aplicaban a los materiales macromoleculares que no hierven, son difícilmente solubles, no cristalizan en la forma habitual, etc.

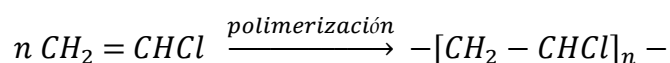
El comienzo de la química macromolecular como ciencia puede situarse en la década de los años veinte cuando, en la reunión anual de físicos y naturalistas alemanes celebrada en Düseldorf en 1926, el premio Nobel Herman Staudinger presentó sus descubrimientos sobre algunos de estos materiales. Tomando como base determinados productos que obtuvo por hidrogenación del caucho natural, el cual fue extraído de ciertas plantas tropicales, dedujo que las altas viscosidades que presentaban en disoluciones diluidas no podían ser sino el reflejo de un peso molecular muy elevado de dichas sustancias. Su hipótesis fue que ese elevado peso molecular podría explicarse si esas sustancias estuvieran constituidas por largas cadenas de átomos unidos por enlaces covalentes, consecuencia de la repetición a lo largo de cada cadena de unidades más pequeñas. A estas unidades Staudinger las llamó **monómeros** y a la estructura resultante la denominó **polímero**^{119, 120}.

El concepto de macromolécula salió reforzado de esta reunión de Düseldorf y, como consecuencia, los científicos comenzaron a considerar la idea de obtener polímeros partiendo de sustancias orgánicas normales (monómeros), mediante

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

III.4.2.1. Monómeros y polímeros

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



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

que se repiten en la cadena, es decir, por su **grado de polimerización**. Teóricamente, el peso molecular de un polímero es simplemente el peso molecular de la unidad repetitiva por su grado de polimerización.

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

III.4.2.2. Moléculas ramificadas, entrecruzadas y reticuladas. Termoplásticos y termoestables

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

termoplásticos hizo que se vulgarizara el término *plástico* como vocablo genérico para describir a la mayoría de los polímeros.

En otras polimerizaciones pueden ocurrir reacciones que produzcan cadenas más o menos cortas en forma de ramas a lo largo de una cadena que podemos considerar como principal. En la Figura 9 se puede visualizar un ejemplo de dos posibles estructuras no lineales que puede adoptar una macromolécula.

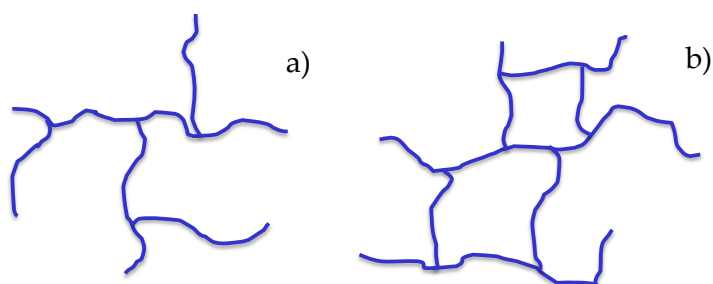


Fig. 9. Dos topologías no lineales que puede adoptar una macromolécula: a) cadenas ramificadas y b) cadenas reticuladas.

El ejemplo a) de la Figura 9 puede producirse cuando se lleva a cabo la polimerización de butadieno, $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}_2$. Un posible proceso, con el catalizador adecuado, implica la ruptura y el crecimiento de la cadena principal a través del doble enlace 1-2. Pero al quedar intacto el enlace 3-4, éste tiene la posibilidad de generar cadenas laterales a partir de cualquier punto que lo contenga. Otro ejemplo son las reacciones de condensación, en las que uno de los monómeros sea trifuncional. Al reaccionar con otro bifuncional de estructura adecuada puede generar igualmente estructuras ramificadas.

Cuando las ramas laterales unen las diferentes cadenas principales del polímero, se comienza a generar una estructura en la que esas cadenas están enlazadas entre sí, produciéndose de este modo polímeros reticulados o entrecruzados. Cuando el entrecruzamiento alcanza gran extensión, Figura 9 b), en el sentido que una gran parte de las moléculas del sistema, hablamos de cadenas reticuladas, pudiéndose alcanzar en el límite un gran retículo tridimensional que englobe a todas ellas.

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

III.4.2.3. Copolímeros

Como ya se mencionó anteriormente, cuando en una polimerización se hacen reaccionar dos monómeros distintos, la macromolécula resultante se llama **copolímero**. Sus unidades estructurales **A** y **B**, procedentes de los monómeros

utilizados, se pueden colocar en orden distinto a lo largo de la cadena polimérica, obteniéndose así distintos tipos de copolímeros (véase Figura 10):

- a) **Copolímero al azar:** Cuando la introducción de los dos tipos de monómeros dentro de la cadena sucede totalmente al azar.
- b) **Copolímero alternante:** En este caso, la distribución de los monómeros a lo largo de la cadena es totalmente alternante.
- c) **Copolímero de bloque:** En este caso, las unidades de monómero forman bloques, ya sean predominantemente de tipo **A** o de tipo **B**.
- d) **Copolímero de injerto:** Esto ocurre cuando el polímero de bloque está ramificado, siendo la unidad estructural de la cadena principal de tipo **A** y la ramificación de tipo **B**.

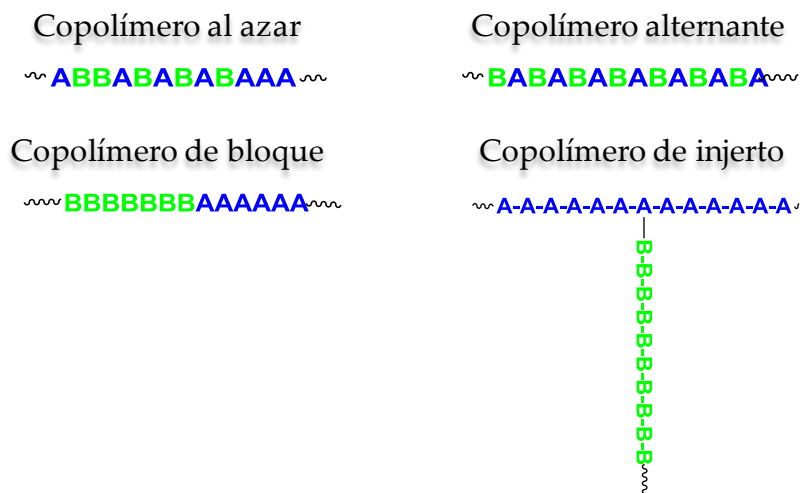


Fig. 10. Diferentes tipos de copolímeros.

III.4.2.4. *Peso molecular de un polímero*

El peso molecular es un parámetro característico muy importante en la ciencia de los materiales. En los polímeros este parámetro no adquiere un valor único como en los compuestos químicos convencionales, sino que viene dado por una distribución estadística alrededor de un valor, que se considera el más probable para la concentración de monómeros, la funcionalidad y las condiciones de reacción establecidas^{121, 122}. Puesto que no existe un único valor de peso molecular, será necesario definir un valor medio (o más propiamente dicho, el valor más probable) y la distribución de valores alrededor del mismo. En la mayoría de los casos, la distribución del peso molecular presenta una forma de campana gaussiana (véase Figura 11).

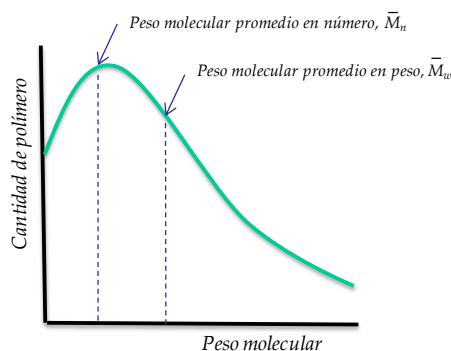


Fig. 11. Distribución de pesos moleculares en una muestra polimérica genérica.

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

$$\bar{M}_n = \frac{w_t}{\sum_i n_i} \quad (1)$$

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

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

$$w_t = \sum_i n_i M_i \quad (2)$$

el peso molecular promedio en número sería:

$$\bar{M}_n = \frac{\sum_i n_i M_i}{\sum_i n_i} \quad (3)$$

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

$$X_i = \frac{M_i}{M_T} \quad (4)$$

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

$$\bar{M}_w = \sum_i n_i \frac{M_i}{M_T} M_i \quad (5)$$

$$\bar{M}_w = \frac{\sum_i n_i M_i^2}{\sum_i n_i M_i} \quad (6)$$

$$\bar{M}_w = \sum_i X_i M_i \quad (7)$$

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

$$\bar{M}_w/\bar{M}_n = p \text{ (dispersión)} \geq 1 \quad (8)$$

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

III.4.3. Reacciones de polimerización

III.4.3.1. Clasificación

La clasificación más reciente de las reacciones de polimerización, basada en el comportamiento cinético de las mismas, las divide en dos grandes grupos¹²³.

El primer gran grupo incluye las reacciones en las que todos los monómeros pueden participar estadísticamente en la formación de las futuras cadenas desde el principio. El tamaño de las cadenas va creciendo lentamente con el tiempo y la concentración de los monómeros de partida, como tales, cae prácticamente a cero a los pocos instantes de la reacción. Estas reacciones se clasifican bajo el nombre de **polimerizaciones por etapas**. En este grupo, pueden incluirse muchas

policondensaciones y algunas reacciones que implican el concurso de compuestos cíclicos.

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

III.4.3.2. Polimerización por etapas

Como ya se ha comentado, las reacciones más representativas correspondientes a las polimerizaciones por etapas, son aquellas en las que tienen lugar, de forma repetida, los clásicos **procesos de condensación** entre los monómeros, para dar lugar a otro nuevo, con la sucesiva eliminación de moléculas pequeñas como el agua. La condición fundamental para producir polímeros es que los reactivos (monómeros) deben contener una funcionalidad superior a uno.

Entre los procesos de policondensación más habituales, destacan las reacciones de los tetraalcoxisilanos en medio acuoso para producir **vidrios sol-gel**. El vidrio sol-gel ha sido empleado en esta memoria, por lo que pasaré a describir brevemente la reacción de polimerización que tiene lugar para su formación.

El sol-gel es un vidrio que se fabrica artificialmente a baja temperatura. Para ello se parte de un precursor, que a través de una serie de procesos químicos, polimeriza hasta llegar a formar una red tridimensional de grupos SiO₂.

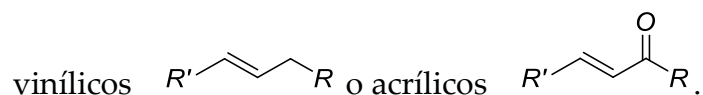
La formación de un vidrio sol-gel es una polimerización¹²⁴, en la que se utiliza como precursor un tetraalcoxisilano de bajo peso molecular, ya que el monómero Si(OH)₄ no es un compuesto lo suficientemente estable. Para el comienzo de la reacción de polimerización, es necesario realizar una hidrólisis previa del precursor en un medio acuoso ácido o alcalino. Paralelamente a la hidrólisis del precursor, se produce la sucesiva condensación entre los grupos silanol con la consiguiente liberación de moléculas de agua. Las reacciones implicadas (en medio acuoso) son:



Durante estos procesos se van produciendo dímeros, trímeros, cadenas lineales y redes tridimensionales, que posteriormente se interconectan entre sí para formar un gel.

III.4.3.3. Polimerización en cadena

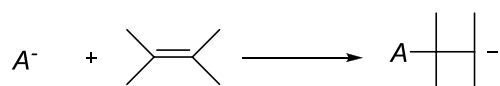
La polimerización en cadena es, generalmente, el resultado de la apertura del doble enlace existente en muchos compuestos monoméricos, como son los derivados



La ruptura, además de por la propia estructura del monómero, está condicionada por las condiciones de la reacción y sobre todo, por la acción de

un iniciador que activa la densidad electrónica del monómero, de modo que rompa el doble enlace, bien en una rotura heterolítica u homolítica. En el primer caso, dependiendo del carácter electrófilo o nucleófilo del iniciador, se genera una especie catiónica o aniónica que condiciona el desarrollo posterior de la cadena en crecimiento.

- a) **Polimerización iónica:** Las polimerizaciones iónicas se basan en una ruptura heterolítica de los dobles enlaces de los monómeros olefínicos debido al papel de un iniciador, que ataca de forma adecuada la densidad electrónica del monómero. Y de este modo, en una típica **polimerización aniónica**, un anión fuertemente básico A^- puede atacar a una olefina:



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

Sin embargo, la consecución de polímeros de alto peso molecular en polimerizaciones iónicas (tanto aniónicas como catiónicas) necesita que esas especies iónicas presentes en el medio tengan una adecuada estabilidad o, en

otros términos, un adecuado tiempo de vida medio que les permita continuar el proceso de propagación.

Existen varias estrategias para producir cadenas en crecimiento con extremos aniónicos. Para ello, se han empleado una gran variedad de iniciadores de corte básico como son amiduros, alcóxidos, hidróxidos metálicos, fosfinas o compuestos organometálicos como el butil litio.

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

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

La **polimerización catiónica** es, en una consideración superficial, bastante parecida a la polimerización aniónica. Un catión iniciador se une a una olefina, a un ciclo o a otro monómero, compensando la carga con un contraión colocado en sus proximidades. El catión resultante adiciona más monómero hasta que la reacción se termina. Sin embargo, el mecanismo de terminación en la polimerización catiónica tiene lugar mediante una reacción entre el contraión y la cadena en crecimiento que, de esta forma termina su vida activa. El proceso genera el iniciador que puede iniciar una nueva

cadena. Por lo tanto, el conjunto de secuencias es similar a lo que en las reacciones radicales se denomina una transferencia de cadena. Tal proceso de terminación es el factor dominante de una polimerización catiónica. Debe ser cuidadosamente controlado para impedir que agua u otras impurezas generen procesos no deseados. Además, las reacciones sólo transcurren bien a temperaturas bajas (-70 °C). El iniciador catiónico más común es un protón, que aunque no puede existir libremente en un medio condensado, puede estar unido a compuestos con pares de electrones libres. Si la unión es débil, el complejo es un ácido; y cuanto menos fuerte sea la unión, más fuerte es el ácido. Los ácidos más fuertes son complejos de compuestos (coiniciadores) con hidrógenos ácidos (agua, alcoholes, ácido clorhídrico), con ácidos de Lewis o con iniciadores. Un complejo habitual es el formado por un ácido de Lewis (como el tricloruro de aluminio a través de un orbital sp^3 disponible) con un alcohol.

- b) **Polimerización radical:** Las polimerizaciones radicales se conocen desde hace más de sesenta años y prácticamente para los años cincuenta se tenían bien establecidos los principios, que han permitido extender esta técnica a la producción más variada de diferentes polímeros y copolímeros. Esto fue posible gracias a la comprensión del mecanismo del proceso.

De todos los procesos de polimerización, la polimerización radical es la más importante y la más utilizada. Más del 50% de los polímeros sintetizados en el mundo se producen por vía radical¹²⁵, ya que muchos de los monómeros de tipo vinílico o acrílico polimerizan por esta vía. Las razones fundamentales de este éxito residen en la posibilidad de realizar las **polimerizaciones a temperaturas bajas** (entre temperatura ambiente y 100 °C) y emplear la menor pureza necesaria, tanto en lo referente a monómeros como a iniciadores, para

que la reacción se desarrolle eficientemente. También es importante resaltar que la polimerización radical es el método más versátil para preparar copolímeros, al añadir más de un monómero a polimerizar en el mismo medio.

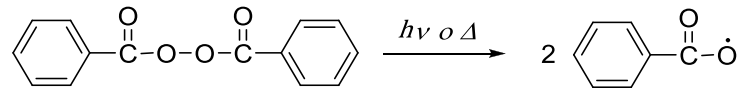
Casi todos los compuestos conteniendo un doble enlace pueden ser polimerizados por vía radical. Las únicas condiciones que deben cumplir son la capacidad termodinámica de polimerizar y la posibilidad cinética de realizarlo con unos parámetros que hagan rentable el proceso. La primera condición suele cumplirse en la mayoría de los casos, al ser la apertura del doble enlace y la posterior concatenación de unidades, un proceso espontáneo. Sin embargo, la condición cinética es algo más restrictiva y elimina ciertos monómeros de la comercialización para ser utilizados en la polimerización radical.

III.4.3.4. Cinética de la polimerización radical

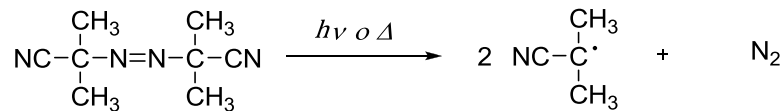
La polimerización radical procede de un clásico proceso de reacción en cadena, siguiendo una serie de etapas cinéticas que se irán explicando detalladamente.

- **Iniciación:** En la etapa inicial o iniciación se necesita la disposición de alguna molécula capaz de generar radicales. Muchos iniciadores de la polimerización radical son compuestos que poseen algún enlace fácil de romper homolíticamente por la acción de la luz o el calor. Compuestos típicos para estos fines son los peróxidos, hidroperóxidos, azocompuestos, sistemas redox, etc. Se utilizan en concentraciones inferiores al 1% (m/m). Un ejemplo típico

de iniciador radical puede ser el peróxido de benzoilo, que se descompone a la suficiente velocidad en dos radicales a temperaturas próximas a 70 °C o mediante luz ultravioleta:

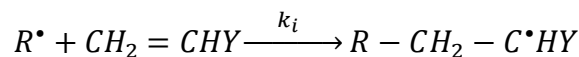
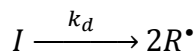


Otro iniciador radical de diferente estructura química pero también muy utilizado por su intervalo de temperatura y relativa facilidad de manejo, es el azo-bis-isobutironitrilo (AIBN):



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

El esquema cinético básico de esta etapa es el siguiente:

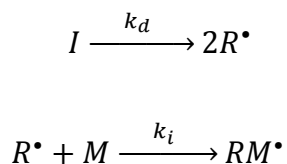


Como se acaba de detallar, la iniciación consta de dos procesos. En el primero se generan una serie de radicales ($R\cdot$), a partir de un iniciador (I), mediante diversos métodos físicos o químicos con una constante cinética de disociación k_d ; radicales que en una segunda etapa pueden transferir su actividad al monómero mediante una adición al doble enlace, generando los radicales propagantes con una constante cinética de iniciación k_i . Se han desarrollado una gran variedad de métodos para la producción de radicales

primarios. Entre los más utilizados, están la acción del calor (descomposición térmica) y la acción de la radiación UV-visible.

➤ **Iniciación térmica:** Las sustancias susceptibles de descomponerse térmicamente a velocidades razonables son aquéllas que poseen enlaces con bajas energías de disociación. Estas descomposiciones presentan una gran dependencia con la temperatura, de forma que su rango de aplicación se limita a un pequeño intervalo de temperatura. De forma genérica, un criterio aceptado es la variación de la constante de velocidad para el proceso de descomposición en el intervalo comprendido entre 10^{-4} y 10^{-6} s⁻¹. Entre los diversos iniciadores destacan la familia de los peróxidos y la familia de los azocompuestos, entre los que destaca el AIBN, que se emplea habitualmente debido a la ausencia de reacciones secundarias típicas de muchos peróxidos.

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



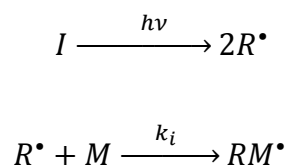
viene dada por:

$$V_i = 2fk_d[I] \quad (9)$$

donde el factor 2 se debe a la formación de dos radicales, f es el factor de eficiencia de la primera etapa de iniciación, k_d es la constante de velocidad de descomposición del iniciador y $[I]$ es la concentración del iniciador. Para la obtención de polímeros, las velocidades de iniciación suelen ser del orden

de 10^{-7} - 10^{-9} mol L⁻¹s⁻¹, siendo $[I] \approx 10^{-2}$ - 10^{-4} mol L⁻¹, $k_d \approx 10^2$ - 10^4 s⁻¹ y los valores del factor f varían entre 0.5 y 1 para los iniciadores más eficientes.

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

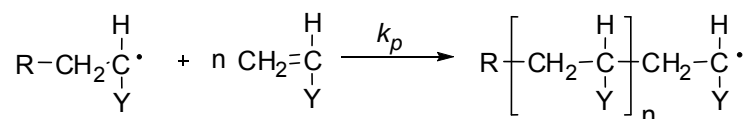


viene dada por:

$$V_i = 2\phi f' I_a \quad (10)$$

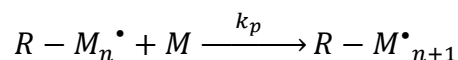
donde el factor 2 tiene el mismo significado que en la iniciación térmica, ϕ es el rendimiento cuántico en la formación de radicales por fotón absorbido, f' es la fracción de radicales que entra en la segunda reacción e I_a es la intensidad de luz absorbida por el fotoiniciador, la cual viene dada por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

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



Desde el punto de vista cinético, la primera cuestión a tratar es si la reactividad de las especies propagantes depende de la longitud de la cadena. Desde el comienzo de la polimerización existe una distribución de tamaños de especies propagantes que, debido a ese tamaño diferente, no tienen la misma capacidad de moverse en el medio, sobre todo a medida que éste se va

haciendo más viscoso, como suele ocurrir a altas conversiones. Se podría pensar que a altas conversiones, y por tanto a altas viscosidades, la propagación podría ser un fenómeno gobernado por la difusión y depender por tanto del tamaño de cadena. Se ha demostrado que para sistemas con presencia de disolvente, donde se controla la viscosidad, este efecto no es importante en la propagación, ya que los diversos macrorradicales pueden verse afectados por la difusión. El otro componente de la propagación, es el monómero, siendo éste una molécula pequeña y por tanto, de gran movilidad. Esta simplificación permite introducir una única constante de velocidad para la reacción de propagación k_p , lo que facilita el desarrollo cinético del proceso. Así de forma genérica, la reacción de propagación puede expresarse mediante el siguiente esquema:



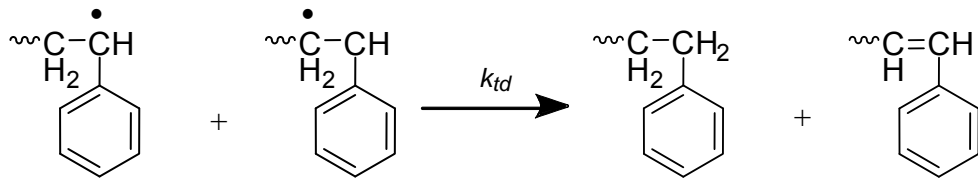
- **Terminación:** Los radicales pueden terminar con su actividad en las llamadas reacciones de terminación natural y en las de transferencia de cadena.
- **Terminación natural:** Dos radicales en crecimiento se encuentran en la masa reaccionante dando lugar a una o dos cadenas que no presentan radicales en sus extremos.

En la etapa de terminación natural se pueden distinguir dos casos:

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



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

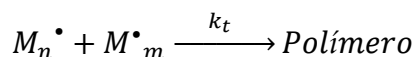


En general se admite que la mayoría de los monómeros vinílicos terminan predominantemente por combinación, sin que ello excluya un mínimo porcentaje por desproporción^{121, 123}. Estas terminaciones están muy condicionadas por las posibilidades de difusión de las cadenas en crecimiento en el medio de alta viscosidad en el que se va convirtiendo la masa reaccionante. La reacción química entre los macrorradicales es un proceso rápido mientras que la difusión de las cadenas de diverso tamaño es relativamente lento. Para la situación en la que la difusión empieza a ser un factor limitante, la constante de velocidad para la terminación k_t puede expresarse como:

$$\frac{1}{k_t} = \frac{1}{k_t^{quim}} + \frac{1}{k_t^{dif}} \quad (11)$$

siendo k_t^{quim} la constante de velocidad para la reacción química entre radicales y k_t^{dif} la constante de velocidad para el proceso gobernado por la

difusión de los radicales en el medio. Debido a la complejidad de los fenómenos de difusión y su evolución con la conversión, hoy en día no existe un modelo único que sea capaz de explicar la dependencia de la constante de terminación con los mecanismos de difusión. Sin embargo, los resultados experimentales de muchos sistemas polimerizables han permitido constatar que aunque el proceso de terminación natural está gobernado por la difusión, su comportamiento microscópico o experimental permite suponer que la constante de velocidad de la terminación natural se comporta como si de una reacción química se tratara¹²¹⁻¹²³, y por tanto tenemos:

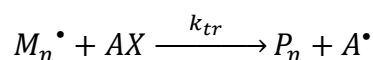


Si se considera la terminación natural independiente de la longitud de la cadena, la expresión para su velocidad viene dada por:

$$-\frac{d[M^\bullet]}{dt} = 2k_t[M^\bullet]^2 \quad (12)$$

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

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



Los agentes de transferencia (AX) acaban con la actividad radical de una cadena en crecimiento al transferirle un átomo o grupo. Estos agentes tienen un origen diverso (monómero, iniciador, polímero, disolvente, impurezas u otros agentes) y el átomo habitualmente transferido es el átomo de hidrógeno, lo que se consigue desde moléculas que tengan grupos S-H, P-H, Sn-H, etc. Dos efectos importantes se desprenden de estos procesos¹²³. El primer efecto afecta al peso molecular o a la distribución del peso molecular debido a la formación de una nueva molécula de polímero. El segundo efecto tiene que ver con el hecho de que el nuevo radical puede iniciar una nueva cadena influenciando de este modo la velocidad de reacción.

III.4.3.5. Inhibición y retardo en la polimerización radical

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

Los inhibidores son sustancias que tienen muchas aplicaciones, pudiéndose utilizar como estabilizadores en los monómeros comerciales para evitar que

polimericen durante su almacenamiento. Este uso implica la eliminación de estos estabilizantes por diferentes procedimientos antes de la polimerización. También los inhibidores se utilizan como método de detención de la reacción, mediante la adición de un exceso de los mismos al sistema. Los inhibidores más utilizados son las quinonas, hidroquinonas y sus derivados.

Un inhibidor importante es el O_2 disuelto en el medio de reacción. El O_2 presenta una elevada constante de propagación en su reacción con los radicales, que puede situarse en unas 10^4 veces superior a la constante de propagación media de los monómeros. Por ello, la presencia de O_2 llega a inhibir completamente la polimerización o a retardarla en función de la concentración de O_2 que haya en el medio. En algunos sistemas se ha detectado incluso la formación de copolímeros de bajo peso molecular de monómero y O_2 ¹²³. Esto da una idea de la importancia que tiene la eliminación del O_2 en el medio de reacción.

Entre los inhibidores más utilizados, existen algunos que tienen la particularidad de ser radicales estables, a las temperaturas normalmente utilizadas en polimerización, como el radical 2,2,6,6, tetrametil-1-piperidiniloxi (TEMPO) que presenta la siguiente estructura (véase Figura 12):

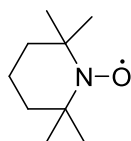


Fig. 12. Estructura molecular del inhibidor 2,2,6,6, tetrametil-1-piperidiniloxi (TEMPO).

Estos radicales se han utilizado, bajo determinadas condiciones, para estudiar el proceso de iniciación. Si se considera que, debido a su naturaleza radical, éstos

reaccionan con los radicales provenientes de la iniciación para formar aductos incapaces de llevar a cabo reacciones posteriores y que lo hacen mediante una estequiometría 1:1, la desaparición de estos inhibidores puede relacionarse con la velocidad de iniciación V_i según:

$$-\frac{d[Inh]}{dt} = V_i = 2fk_d[I] \quad (13)$$

donde $[Inh]$ es la concentración de inhibidor, el factor 2 se debe a la formación de dos radicales, f es el factor de eficiencia de la primera etapa de iniciación, k_d es la constante de velocidad de descomposición del iniciador y $[I]$ es la concentración del iniciador. La velocidad de desaparición del iniciador puede seguirse mediante radiación ultravioleta. Con estos experimentos si se conoce k_d , se puede conocer el factor f .

III.4.3.6. Copolimerización radical

La copolimerización de mezclas apropiadas de monómeros permite la obtención de una gran variedad de polímeros con diferentes topologías, funcionalidades; y materiales híbridos con propiedades muy diversas^{122, 126}. Pueden obtenerse copolímeros estadísticos, alternantes en bloque, en injerto; y otras topologías que se muestran en la Figura 13.

Mediante la polimerización radical convencional las topologías poliméricas que se pueden obtener con éxito son exclusivamente polímeros estadísticos y alternantes, y algunos materiales híbridos que no requieren un control preciso de la composición y funcionalidad polimérica, debido a que las reacciones de terminación o transferencia de cadena^{122, 123} compiten con el propio crecimiento de la cadena. Sin

embargo en los últimos años, se han descubierto una serie de procesos por vía radical (denominados bajo el término **polimerización radical controlada (PRC)**) que permiten la obtención de las demás topologías.

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

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

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

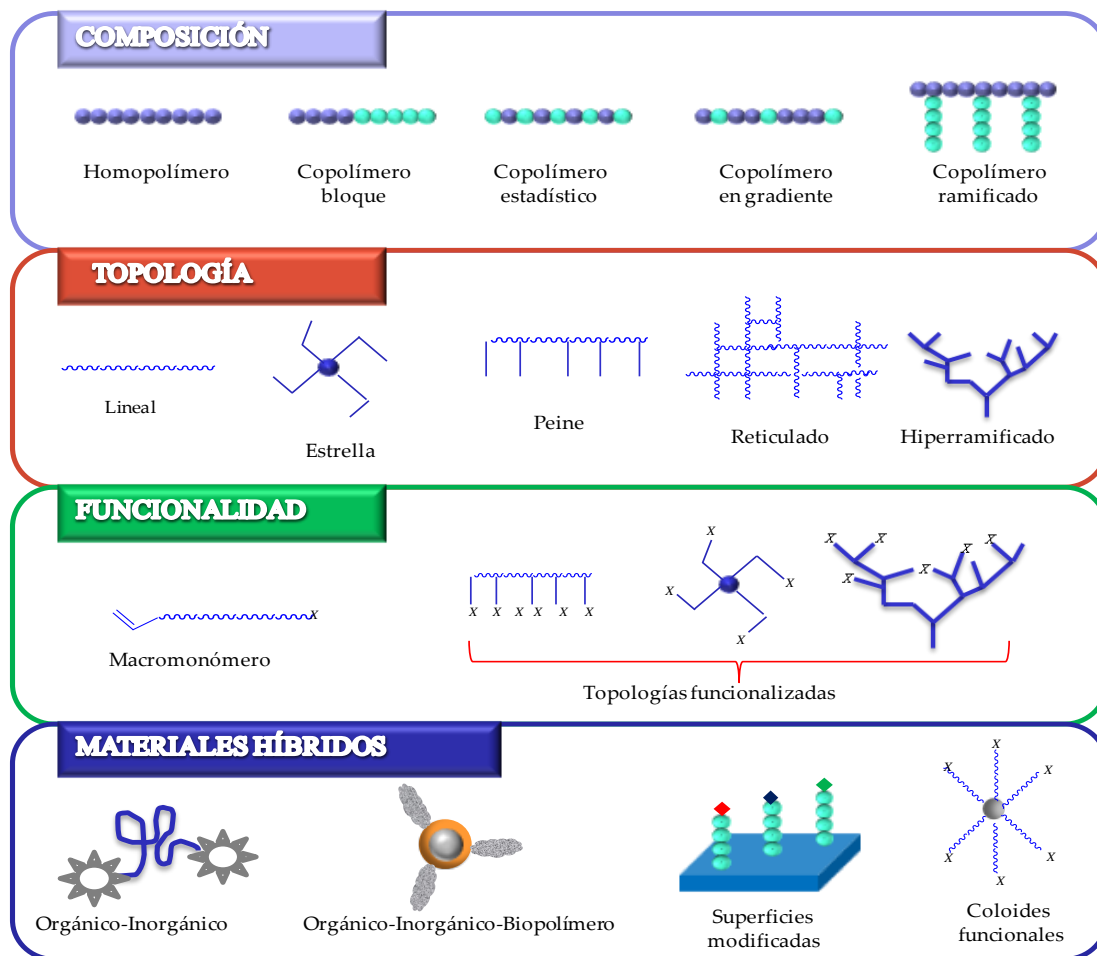


Fig. 13. Estructuras poliméricas obtenidas mediante copolimerización radical.

III.5. DISEÑO Y DESARROLLO DE FASES SENSORAS ÓPTICAS

En este apartado se va a explicar el diseño y el desarrollo de las fases sensoras ópticas, que se han utilizado en esta memoria para su posterior implementación en los sensores ópticos. Las fases sensoras ópticas desarrolladas emplean los siguientes soportes de inmovilización: polímeros de impronta molecular, vidrios sol-gel y membranas de inclusión polimérica.

III.5.1. *Polímeros de Impronta Molecular*

III.5.1.1. *Introducción histórica y generalidades*

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

Los polímeros de impronta molecular (MIPs) se pueden definir como¹²⁷ “*polímeros tridimensionales con huecos específicos inducidos por una molécula molde que*

sirven para el reconocimiento molecular y que dan lugar a un material donde el molde dirige la disposición y orientación de los componentes que lo forman mediante un mecanismo de autoensamblaje". Son materiales biomiméticos que reproducen de un modo más básico el mecanismo de reconocimiento de los sistemas biológicos (hormona-receptor, enzima-sustrato, antígeno-anticuerpo). Por tanto, la tecnología MIP consiste en desarrollar un material polimérico capaz de interactuar selectivamente con una molécula o ión actuando como "cerradura" ante un analito que tiene forma de "llave" (véase Figura 14).



Fig. 14. Modelo llave-cerradura aplicable al reconocimiento molecular de los MIPs.

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

Uno de los retos actuales más interesantes en la Química Analítica es la transformación de la interacción molecular, que tiene lugar entre el analito y el MIP,

en un cambio óptico medible. Este fenómeno daría lugar a la generación de sensores ópticos que integran las excelentes propiedades de reconocimiento molecular inherentes a los MIPs, con la selectividad y sensibilidad propias de las técnicas espectroscópicas, especialmente de la fluorescencia.

Este objetivo se puede alcanzar mediante diversas estrategias, aunque las más desarrolladas y que mejores resultados han ofrecido hasta la fecha son: el empleo de especies o analitos de interés ópticamente activos que puedan ser monitorizados ópticamente mediante su retención en el MIP^{83, 128}; o el uso de monómeros debidamente funcionalizados que, una vez generado el polímero, actúen como transductores ópticos del mismo^{129, 130}. De esta forma, la interacción del analito con el polímero produciría un cambio en las propiedades ópticas del material, permitiendo la determinación tanto cualitativa como cuantitativa del analito.

Las formas de inmovilización del material de reconocimiento para el desarrollo del sensor óptico pueden ser muy variadas, comprendiendo desde la inmovilización del MIP en una célula de flujo, que a su vez queda incorporada en un sistema de análisis por inyección en flujo (FIA)^{83, 128}, hasta su deposición en la punta de una fibra óptica¹³¹.

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

En torno a 1930, el químico soviético M.V. Polyakov fue uno de los muchos científicos que estuvieron implicados en investigaciones con siliconas para su uso en cromatografía. Polyakov preparó siliconas por acidificación de disoluciones de silicato sódico en las que, después del secado del polímero gelatinoso obtenido, se generaba una matriz rígida. En un artículo publicado en 1931¹³² se presentó el efecto que provocaba sobre la estructura porosa de la sílice, la presencia de una serie de

aditivos como benceno, tolueno o xileno. Después de 20-30 días de secado a temperatura ambiente en presencia de estos aditivos, los polímeros eran lavados con agua caliente. Cuando se usaba H_2SO_4 como iniciador de la polimerización (agente acidificante), se obtenía una correlación positiva entre el área superficial (por tanto, la capacidad de carga) y el peso molecular del aditivo correspondiente. Sin embargo, si el agente era $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$, los resultados diferían notablemente de los arriba mencionados. En este caso, cuando la silicona se colocaba en presencia de los aditivos, la cantidad de aditivo adsorbido dependía completamente de la estructura del aditivo con el que se hubiera llevado a cabo el secado, siendo mayor la retención de un aditivo determinado si éste era el mismo que se había utilizado para el secado de la matriz. En otras palabras, los aditivos fueron considerados como moldes que afectaban directamente a la estructura superficial de la silicona. Sin embargo, y a pesar de la enorme relevancia de los resultados, estos estudios pasaron en gran parte inadvertidos por la comunidad científica.

Años más tarde, Pauling y su discípulo Dickey¹³³, utilizaron un método muy similar al de Polyakov. La principal diferencia es que éstos adicionan la molécula molde durante el proceso de polimerización de la silicona. Así, al precipitar el gel de sílice en presencia de una serie de colorantes (naranja de metilo, etilo, propilo y butilo) y, tras secar la matriz y extraerlos; la estructura guardaba cierto efecto memoria hacia los aditivos con los que había sido sintetizada. Podría decirse, por tanto, que Pauling y Dickey fueron los padres de la impronta molecular.

Fue en 1972 cuando se marcó el comienzo de la impronta molecular como se conoce hoy en día, cuando los laboratorios de Wulff¹³⁴ y Klotz¹³⁵ divulgaron independientemente la preparación de polímeros orgánicos con una selectividad predeterminada hacia algunas moléculas. Los moldes utilizados, o sus derivados, que estaban presentes durante la polimerización eran reconocidos selectivamente por

el MIP. Los trabajos pioneros de los grupos de Wulff, Mosbach y Takagishi¹³⁶⁻¹³⁸, propusieron los fundamentos de la técnica de impronta molecular actual.

En la actualidad, la impronta molecular es una técnica que va en aumento. Durante los últimos cinco años se han publicado más de 2000 artículos referentes a MIPs. El aumento inicial durante los años 90 se debió principalmente a la fabricación de polímeros de impronta molecular por vía no-covalente y su aplicación en diversos campos. El trabajo publicado por Vlatakis *y col.* en 1993¹³⁹ fue el primer trabajo que demostraba que un sistema de MIPs puede rivalizar en selectividad con un sistema de anticuerpos. Este trabajo recibió mucha atención y representa, en gran medida, el trabajo más citado del área. Muchos logros importantes se han divulgado desde entonces, lo que ha contribuido al fomento de la impronta molecular como una técnica muy interesante y prometedora.

Para la preparación de un MIP¹⁴⁰ se utiliza generalmente un proceso de polimerización radical, donde uno o más monómeros junto con un entrecruzador y en presencia de la molécula molde forman lo que se conoce como el complejo de pre-polimerización. Éste, una vez que se inicia la reacción de polimerización radical mediante la adición de un iniciador de radicales, da lugar a un polímero tridimensional que contiene a la molécula molde en su estructura. Una vez obtenida esta resina polimérica y tras la extracción del molde, se crean cavidades en el interior del polímero que son complementarias en tamaño, forma geométrica y orientación de grupos funcionales a la molécula empleada como molde (véase Figura 15).

Las interacciones entre la molécula molde y los monómeros para dar lugar al complejo de pre-polimerización pueden ser básicamente de dos tipos: vía enlaces covalentes o mediante interacciones no covalentes (repulsiones hidrofóbicas/hidrofílicas, puentes de hidrógeno, interacciones π - π , fuerzas de Van der Waals, interacciones electrostáticas, etc.).

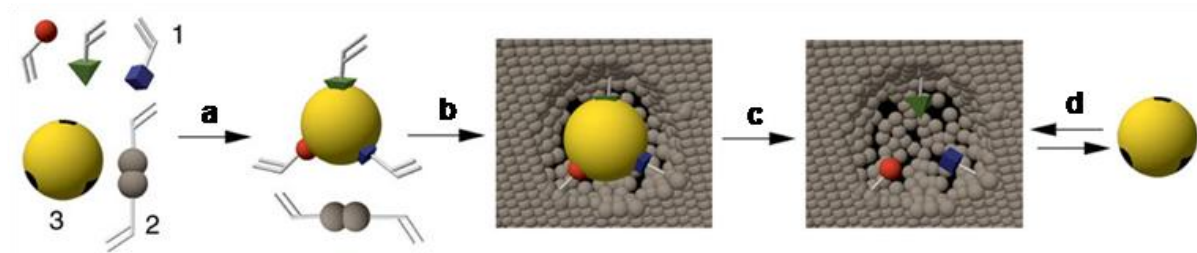


Fig 15. Representación esquemática de las etapas implicadas en la síntesis de MIPs¹⁴⁰.

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

Debido a la naturaleza polimérica de los MIPs, es fundamental poseer un conocimiento profundo de los diferentes tipos de reacciones de polimerización y de las distintas técnicas de llevar a cabo la polimerización para poder sintetizar el material de una forma controlada. Sin estos conocimientos previos, sería muy difícil llegar a la obtención de un material con propiedades elevadas de reconocimiento molecular y que además, sea compatible con el medio en el que va a tener lugar dicho reconocimiento. Por ello, las reacciones de polimerización orgánica en sus diferentes tipos se han constatado como una de las claves fundamentales para obtener un MIP de forma exitosa.

III.5.1.2. *Ventajas e inconvenientes de los MIPs*

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

- ✓ Son materiales baratos y sencillos de preparar.

- ✓ Permiten trabajar en disolventes orgánicos debido a su estructura altamente entrecruzada, así como en un amplio intervalo de temperaturas, pH y presiones.
- ✓ Se pueden preparar MIPs “a la carta” en función del molde empleado.
- ✓ Pueden utilizarse durante un número elevado de ciclos de reconocimiento sin que se vean alteradas sus propiedades analíticas.
- ✓ La adsorción de la molécula de interés tiene lugar de forma reversible y en un corto periodo de tiempo.
- ✓ No inducen respuesta inmune, a diferencia de las biomoléculas, lo cual puede facilitar la preparación de fases sensoras ópticas de uso in vivo.
- ✓ Pueden prepararse en una gran variedad de formatos físicos (nanopartículas, micropartículas, membranas poliméricas, fibras, etc.)
- ✓ Pueden almacenarse durante años a temperatura ambiente sin sufrir modificaciones significativas de sus propiedades¹⁴¹.

No obstante, como todo material también posee una serie de inconvenientes que se citan a continuación:

- ✗ Presentan una sensibilidad baja.
- ✗ Pueden producirse interacciones inespecíficas, puesto que son materiales porosos con un elevado porcentaje de cavidades no específicas para el analito, disminuyendo de este modo la selectividad.

- ✗ La extracción del molde es compleja e incompleta (queda retenido alrededor de un 5% en masa del molde).
- ✗ La cinética de unión entre el molde y los monómeros funcionales del polímero suele ser lenta.
- ✗ La constante de equilibrio termodinámico de unión del molde con el MIP es muy dependiente de las características químico-físicas (sobre todo, la polaridad) del disolvente en el que se lleva a cabo.
- ✗ La dependencia de la constante de equilibrio con las características del disolvente provoca que ciertas moléculas (moléculas de polaridad media y alta) en disolución y en condiciones normales de presión y temperatura, posean una constante de unión muy baja.
- ✗ Hay limitaciones en el tamaño de la molécula molde, debiendo emplearse de forma genérica, moléculas de peso molecular elevado que puedan generar cavidades lo suficientemente grandes, que permitan la impronta de la red polimérica.

III.5.1.3. *Vías de síntesis de MIPs*

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

Los MIPs obtenidos por **vía covalente** se basan en la interacción covalente entre la molécula molde y uno o varios monómeros funcionales empleados en la

polimerización. De este modo, al extraer la molécula molde, estos grupos funcionales quedan libres y son susceptibles de volver a unirse con ella durante el proceso de reconocimiento molecular. Dentro de la síntesis de MIPs por vía covalente, existen muchas variantes. Una variante interesante, que últimamente está siendo muy utilizada en el reconocimiento selectivo de iones, está basada en una reacción de complejación entre los monómeros funcionales y la molécula molde. En este caso, la molécula molde es un ión metálico que forma el complejo de pre-polimerización por reacción de complejación con los monómeros funcionales¹⁴².

Normalmente, los principales problemas que presentan este tipo de MIPs son la dificultad de extracción de la molécula molde y el elevado tiempo de respuesta necesario para el reconocimiento molecular.

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

En este caso, la concentración de **monómero funcional** juega un papel esencial en la adecuada formación del complejo de pre-polimerización: un exceso de monómero funcional puede incrementar el número de interacciones no específicas, con la consiguiente disminución de la selectividad; a su vez, una baja concentración de monómero funcional puede provocar que el fenómeno de impronta sea muy bajo, pudiendo llegar a ser nulo. Por tanto, la relación entre la molécula molde y el monómero funcional debe ser optimizada en cada caso. En la Figura 16 están representados los monómeros de tipo acrílico y vinílico más utilizados en la síntesis de MIPs.

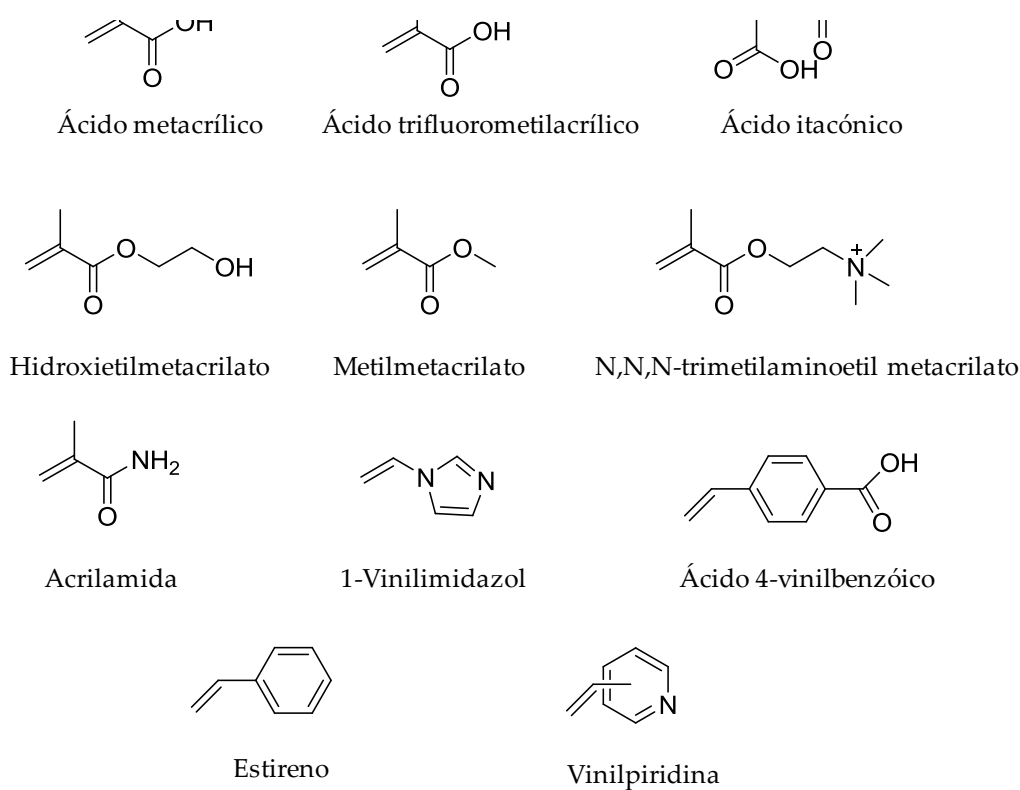
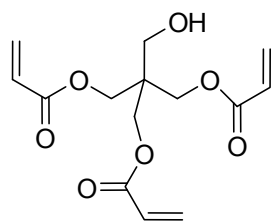
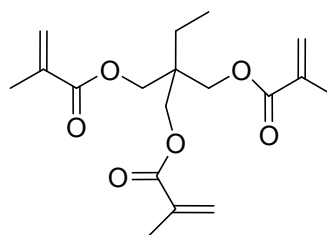


Fig. 16. Monómeros funcionales habitualmente empleados en la síntesis de MIPs.

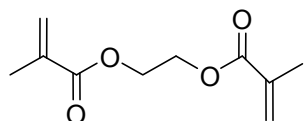
El **entrecruzador** es el responsable de la estructura final del MIP. Sus funciones son: estabilizar los sitios selectivos durante la polimerización, conferir rigidez y estabilidad a los disolventes, proporcionar estabilidad mecánica y térmica a los polímeros y evitar la deformación o desestructuración de los sitios de unión, puesto que el hinchamiento de los polímeros altamente entrecruzados es nulo. Por ello, el porcentaje de entrecruzador también es un parámetro a tener en cuenta. En la Figura 17 se representan los entrecruzadores de tipo acrílico y vínilico habitualmente empleados en la síntesis de MIPs.



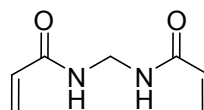
Pentaeritritol triacrilato (PETRA)



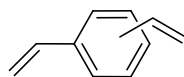
Trimetilpropano trimetacrilato (TRIM)



Etilenglicol dimetacrilato (EGDMA)



N,N'-Metilendiacrilamida



Divinilbenceno

Fig. 17. Entrecruzadores más empleados en la síntesis de MIPs.

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

La impronta molecular no covalente es la más utilizada, porque presenta una serie de ventajas frente a la covalente, como son:

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

III.5.1.4. Técnicas de síntesis de MIPs

Para la obtención de un MIP, se puede utilizar cualquier tipo reacción de polimerización de las comentadas en esta memoria (reacciones de polimerización por etapas y reacciones de polimerización en cadena), así como diferentes técnicas para su síntesis. Las técnicas más habituales son las que se comentarán a continuación.

III.5.1.4.1. Polimerización en masa

Es un tipo de polimerización en fase homogénea y consiste en mezclar todos los componentes de la polimerización (monómeros funcionales, entrecruzador e iniciador de radicales) junto con la molécula molde, en ausencia de porógeno (disolvente). Aquí, todos los componentes deben ser miscibles entre sí durante toda la polimerización.

III.5.1.4.2. *Polimerización en disolución*

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

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

Además, el disolvente o la mezcla de disolventes usados influye en las características morfológicas y estructurales de los materiales poliméricos finales, ya que son las interacciones entre las cadenas poliméricas en crecimiento y las

moléculas de disolvente las que condicionan que la polimerización transcurra en todo momento por vía homogénea o, en un momento determinado, avance de forma heterogénea; además de ser responsable en gran medida de la estructura porosa final del material debido a su evaporación durante la síntesis.

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

- **Caso (1):** Las interacciones polímero-disolvente son elevadas durante toda la polimerización. Así, las cadenas poliméricas están bien solvatadas y crecen extendidas en todas las direcciones del espacio hasta conectar unas con otras, formando al final de la polimerización una red tridimensional transparente y homogénea (o molécula infinita).
- **Caso (2):** Las interacciones polímero-disolvente son muy bajas produciéndose la separación de fases y precipitación antes de que llegue a producirse la interconexión entre cadenas. En esta situación, las cadenas poliméricas se encuentran totalmente separadas en el momento de producirse la separación de fases y la precipitación, por lo que siempre se obtienen suspensiones de materiales poliméricos entrecruzados (completamente insolubles en cualquier disolvente) con distintos tamaños y morfologías (partículas esféricas, microgeles, agregados, etc.).
- **Caso (3):** Las interacciones polímero-disolvente durante la polimerización son intermedia. Este caso es una situación intermedia entre los casos (1) y (2) y, da lugar a que se produzca la precipitación después de que gran parte de las

cadena polimérica en crecimiento hayan conectado entre sí (dependiendo del valor de las interacciones polímero-disolvente). Por tanto, justo antes de producirse la precipitación, coexisten en el medio estructuras tridimensionales parcialmente entrecruzadas y extendidas a lo largo de todo el sistema (estructura continua de peso molecular muy elevado y rígida, que ocupa toda la disolución y que no puede precipitar) y moléculas poliméricas individuales o pequeños retículos poliméricos predispuestos para la precipitación. Por ello, el material que se obtiene es un gel o resina sólida heterogénea y opaca, formada por una red polimérica tridimensional, que tiene atrapadas en su interior partículas poliméricas precipitadas. La morfología de los materiales poliméricos obtenidos en los casos intermedios depende del tiempo que necesite un fenómeno u otro: la formación de la red tridimensional o la precipitación de las cadenas poliméricas individuales. La Figura 18 muestra un esquema de los distintos materiales poliméricos que se pueden obtener para MIPs en función de las interacciones polímero-disolvente a lo largo de la polimerización.



Fig. 18. Materiales poliméricos obtenidos en función de las interacciones polímero-disolvente a lo largo de la polimerización en disolución.

III.5.1.4.3. *Polimerización por precipitación*

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

Los materiales que principalmente pueden obtenerse cuando se produce la precipitación son: microgeles, suspensiones de micro y nanopartículas esféricas y monodispersas; y micropartículas producidas por fenómenos de homocoagulación (agregación de un número pequeño de nanopartículas para producir una micropartícula). La Figura 19 muestra el mecanismo de la polimerización por precipitación y las diferentes morfologías o estructuras poliméricas que se pueden formar.

La aplicación más importante de la polimerización por precipitación está en el diseño y obtención de partículas esféricas y monodispersas, libres de surfactantes y estabilizadores, con distintos tamaños, distintas composiciones químicas (hidrofóbicas, hidrofílicas, etc.); y entrecruzadas, con grados de entrecruzamiento que suelen estar comprendidos entre el 3% y el 100%. Este entrecruzamiento confiere a las partículas propiedades especiales, tales como ser completamente insolubles en cualquier disolvente o tener mayor o menor capacidad de hinchamiento en un determinado disolvente, dependiendo del grado de entrecruzamiento obtenido (para entrecruzamientos superiores al 20% la capacidad de hinchamiento es muy baja). Además, este hinchamiento es reversible y controlable en función de las propiedades químico-físicas (polaridad) del disolvente, pH, temperatura, etc. Todo esto hace que este tipo de partículas tengan infinidad de aplicaciones en muchos campos de la ciencia: encapsulación y liberación controlada de fármacos, sistemas de extracción en

fase sólida, catálisis, diseño de fases sensoras, relleno de columnas cromatográficas, etc.

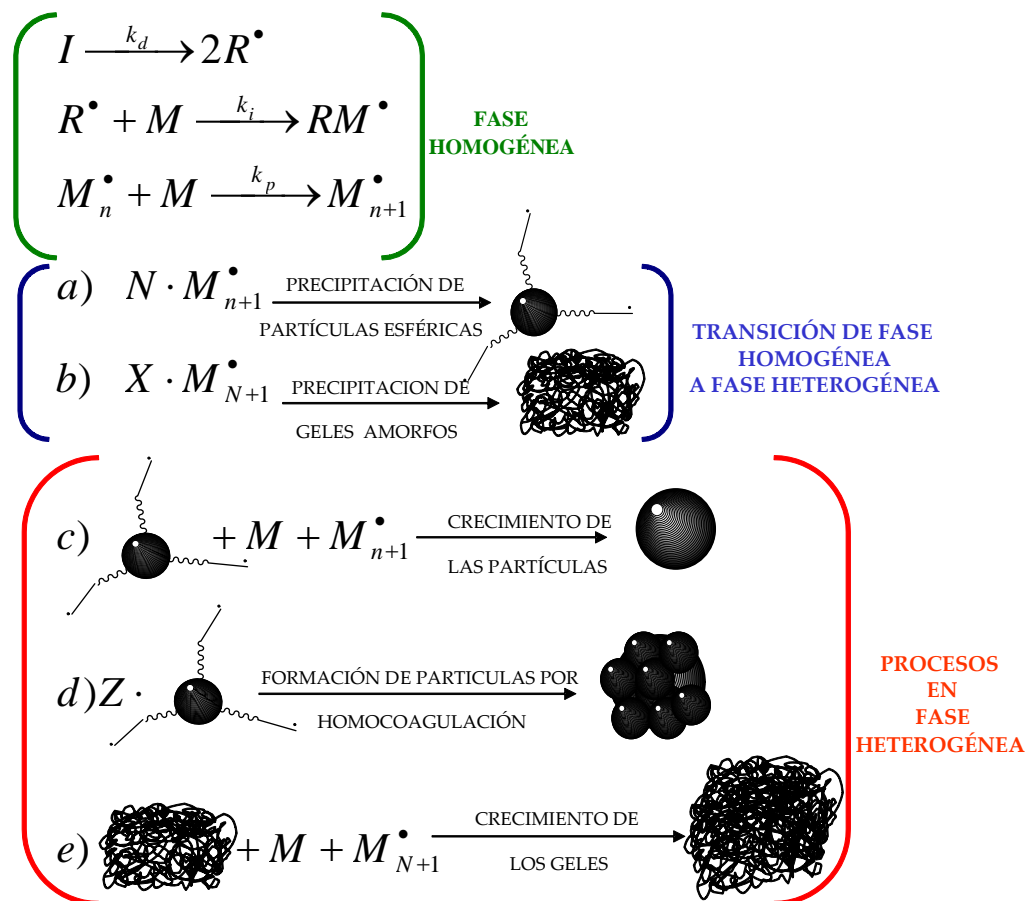


Fig. 19. Mecanismo de la polimerización por precipitación y diferentes estructuras y morfologías poliméricas que se pueden obtener. Iniciador (I), monómeros (M), cadenas poliméricas en crecimiento (M_{N+1} , M_{n+1}), N y n son los subíndices que indican el número de monómeros que tiene una cadena ($N > n$), Z es el número de partículas que agregan para generar el homocoágulo y X es el número de cadenas poliméricas que interaccionan para producir la precipitación.

En la polimerización por precipitación suelen emplearse concentraciones monoméricas muy diluidas, no superiores al 3% en masa de monómeros con respecto

a la masa de disolvente, evitando así la posible gelificación producida por una elevada concentración de cadenas poliméricas en crecimiento. En este caso, el disolvente o mezcla de disolventes tiene que permitir la solubilización inicial de todos los componentes de la polimerización y de las cadenas poliméricas hasta un determinado tamaño, o lo que es lo mismo, un determinado peso molecular. De este modo, cuando el polímero en crecimiento alcanza ese peso molecular se produce una separación de fases que da lugar a la precipitación, originando partículas de diferentes tamaños y morfologías. Posteriormente, la polimerización continúa en la interfase partícula-disolvente atendiendo a fenómenos de polimerización heterogénea. La cinética de la polimerización por precipitación se podría dividir en dos partes: antes de la separación de fases y precipitación, donde todo transcurre de la misma forma que una polimerización en fase homogénea; y después de la separación de fases y precipitación, la cinética transcurre de forma heterogénea (véase Figura 19).

Hay que destacar que la polimerización por precipitación puede llevarse a cabo sin agitación. En este caso, cuando las partículas precipitan, se agrupan y tienden a decantar en un tiempo determinado que dependerá de su tamaño. Esto provoca que el crecimiento de las partículas en fase heterogénea sea bajo, debido a que el contacto dinámico entre las partículas y la fase líquida, donde aún existen monómeros y macrorradicales, es bajo.

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

las partículas después de la precipitación, aumentando también el rendimiento de la polimerización.

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

III.5.1.4.4. *Polimerización por dispersión*

La polimerización por dispersión se lleva a cabo con la mezcla monomérica, un disolvente (o mezcla de ellos) en el que la mezcla monomérica es soluble pero no el polímero que se va formando, un iniciador de radicales soluble en el disolvente y un estabilizador o surfactante. El polímero se forma en la fase continua (disolvente y mezcla monomérica), pero a medida que se forma precipita, dando lugar a pequeñas partículas que se agregan formando partículas coloidales de polímero con monómero en su interior. Estas partículas coloidales de polímero obtenidas son estabilizadas por el surfactante. Posteriormente, la polimerización continúa dentro de estas partículas coloidales como una polimerización en fase heterogénea.

III.5.1.4.5. *Polimerización en suspensión*

Se produce combinando dos fases a priori inmiscibles, una de las fases se denomina fase discontinua y la otra fase continua. Cuando la fase discontinua es

hidrofóbica y la fase continua es hidrofílica (normalmente agua), la suspensión se denomina normal; sin embargo, cuando la fase discontinua es hidrofílica y la fase continua es hidrofóbica, se denomina inversa. La fase discontinua está compuesta por la mezcla de polimerización y siempre se encuentra en una proporción mucho menor que la fase continua (normalmente entre el 2% y el 20% con respecto al volumen total). Así, mediante el uso de agentes químicos (surfactantes) y aplicando energía, la fase discontinua se distribuye en forma de pequeñas gotículas en la fase continua. Estas gotículas se mantienen separadas durante la polimerización mediante el uso de agitación y aditivos. La característica que diferencia a la polimerización en suspensión del resto de polimerizaciones en fase heterogénea, es que el iniciador de radicales es soluble en la fase discontinua e insoluble en la fase continua. Debido a ello, el lugar de la polimerización son las gotas de fase discontinua, que se convierten de este modo en partículas poliméricas a medida que el proceso avanza. Una característica cinética de esta polimerización en fase heterogénea, es el posible tratamiento de cada gota de fase discontinua como un pequeño reactor homogéneo, y por tanto, la consiguiente aplicación de los argumentos desarrollados para la polimerización radical homogénea.

III.5.1.4.6. *Polimerización en miniemulsión*

Una miniemulsión es un sistema donde se crean, mediante un aporte alto de energía (normalmente mediante el uso de un ultrasonidos de alta energía u homogeneizador celular) pequeñas gotas de estabilidad elevada en una fase continua. La estrategia para la estabilización de las gotas es la adición de un agente que se disuelve en la fase discontinua, pero que es totalmente insoluble en la fase continua. Al principio de la homogeneización, la polidispersidad de las gotas es bastante elevada, pero mediante constantes procesos de fusión y fisión de las gotas,

inducidos por el aporte de energía, la polidispersidad decrece hasta que la miniemulsión alcanza su estado termodinámico más estable. En la miniemulsión, la tensión superficial alcanza valores elevados, lo que indica que la cubierta de surfactante en las gotas es muy baja¹⁴³. Normalmente, una cobertura incompleta de las gotas por parte del surfactante es una característica importante de la miniemulsión y muestra que, en estos casos, el surfactante se utiliza de forma muy eficiente. Se ha observado que la cobertura del surfactante depende del tamaño de las gotas, puesto que las gotas más pequeñas son las que necesitan mayor número de moléculas de surfactante para ser estabilizadas. El tamaño exacto de las gotas puede ser selectivamente ajustado mediante el tipo y la cantidad de surfactante empleado. Por un lado, los surfactantes aniónicos y catiónicos permiten el control de poblaciones de gotas monodispersas de tamaños comprendidos entre 30 y 200 nm. Por otro lado, los surfactantes no iónicos (distintos oligómeros y polímeros) se pueden usar para modular el tamaño de gota comprendido entre 100 y 800 nm.

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

Las nanogotas formadas en la miniemulsión presentan una elevada estabilidad. Además, la ausencia de intercambio de material entre gotas (en el caso de baja solubilidad de la fase dispersa en la fase dispersante) se ha demostrado experimentalmente¹⁴³ mediante el estudio de las propiedades ópticas de una mezcla que se obtiene, combinando una miniemulsión cuyas nanogotas contienen un reactivo, con otra miniemulsión cuyas nanogotas contienen una molécula que, al reaccionar con el reactivo confinado en las nanogotas de la primera miniemulsión,

produce un compuesto altamente coloreado. Al mezclar estas dos miniemulsiones, no se observó la aparición de color. Esto indica que las gotas coexisten, sin que ocurran procesos de fisión/fusión y de intercambio de material entre gotas.

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

Debido a sus características intrínsecas (nanopartículas monodispersas y altamente estables), la miniemulsión es una potente herramienta en el diseño y síntesis de nanopartículas con diferentes características químicas y físicas, así como en el diseño de nanopartículas híbridas.

III.5.1.4.7. *Polimerización por implantación (grafting imprinting)*

En todos los casos anteriores, los compuestos iniciales estaban disueltos en una fase líquida. En este tipo de polimerización, alguno de estos compuestos está soportado químicamente sobre una fase sólida, propiciando la polimerización sobre su superficie. Esta técnica consiste en el injerto o recubrimiento de la superficie porosa de una partícula de sílice de tamaño, porosidad, forma y distribución de poros perfectamente conocida y controlable. De este modo, se obtiene una partícula perfectamente caracterizada pero cuya porosidad está recubierta por un MIP (véanse Figura 20 y Figura 21).

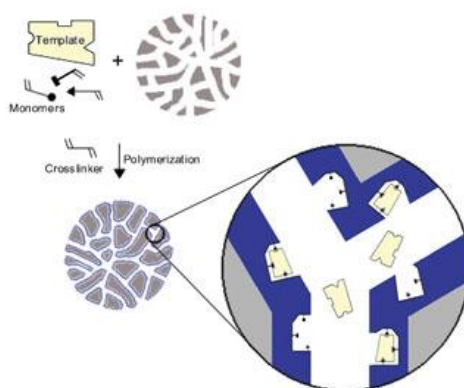


Fig. 20. Simulación de la técnica de “*grafting imprinting*”.

Esto se consigue mediante la unión covalente del iniciador de radicales a la superficie porosa de la partícula de sílice, obteniendo partículas de MIP en poco tiempo que presentan excelentes propiedades de transferencia de masa¹⁴⁴⁻¹⁴⁶.

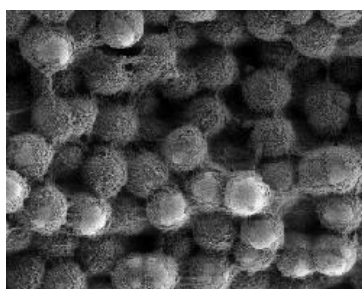


Fig. 21. Fotografía SEM de partículas de MIP obtenidas mediante “*grafting imprinting*”.

III.5.1.4.8. Polimerización jerarquizada (*hierarchical imprinting*)

La polimerización jerarquizada proporciona un nuevo formato de MIPs con un mejor control estructural. Ésta se basa en el control perfecto de la localización de los huecos específicos en la superficie polimérica, que es la zona de mayor

accesibilidad del polímero, lo que la hace una técnica muy interesante cuando se quieren determinar analitos de gran tamaño o de diferente polaridad a la del polímero usado, ya que éstos solo pueden acceder a los poros superficiales del MIP. Para ello (véase Figura 22), la molécula molde se inmoviliza químicamente en la superficie de los poros de una partícula porosa de sílice, después se rellenan estos poros con los demás componentes necesarios para la síntesis del MIP (monómeros, iniciador de radicales, porógenos, etc.) y se lleva a cabo la polimerización dentro de los poros de la partícula. Posteriormente, se procede a la disolución de la sílice resultando un MIP impreso superficialmente con la molécula molde, que estaba unida al soporte sólido y que tiene la forma exacta a la que poseían sus poros^{147, 148}.

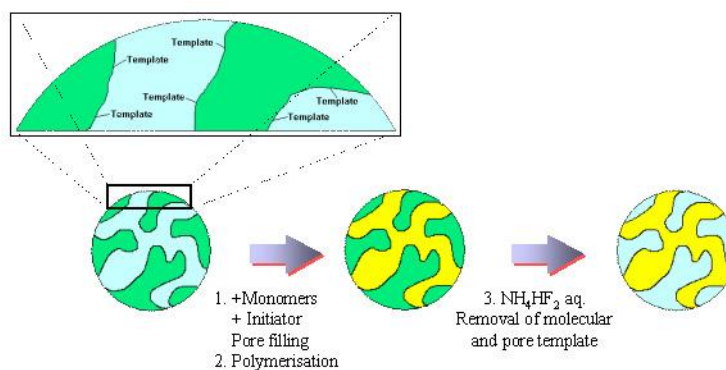


Fig. 22. Simulación de la técnica de “*hierarchical imprinting*” en la que se pueden ver las partículas de sílice y las partículas poliméricas obtenidas tras la disolución de la misma.

III.5.2. Vidrios sol-gel

III.5.2.1. Introducción histórica y generalidades

Un **vidrio sol-gel** se puede definir como “*un vidrio que se ha fabricado artificialmente a baja temperatura*”. Para ello, se parte de un monómero, que a través de

una serie de reacciones de polimerización forma una red tridimensional de grupos SiO₂.

El proceso de formación de sol-gel es un método de producción de materiales cerámicos que fue descrito por primera vez hace 150 años¹⁴⁹. Hace varias décadas, su aplicación analítica se vio revitalizada como consecuencia de su capacidad, una vez adaptándolo convenientemente, para incorporar en los poros del material cerámico sustancias termo y fotosensibles, tales como moléculas orgánicas y proteínas activas^{150, 151}. Recientemente diversos investigadores como Hench y *col.* en 1990¹⁵² y Livage y *col.* en 1992¹⁵³, hicieron posible la obtención de vidrios mediante la hidrólisis y posterior condensación a temperatura ambiente de tetraalcoxisilanos (Si(OR)₄) en disoluciones hidroalcohólicas; donde el vidrio obtenido se denominaba sol-gel.

La **tecnología sol-gel**¹⁵⁴ además de proporcionar materiales de gran estabilidad, transparentes y altamente porosos, ofrece la posibilidad de llevar a cabo una multitud de posibles modificaciones (a través de variaciones en la composición de la mezcla de precursores, pH, temperatura, etc.). Mediante estas modificaciones pueden ser especialmente útiles para servir como soporte de moléculas en el desarrollo de sensores químicos. La matriz porosa debe retener eficazmente las moléculas inmovilizadas, pero al mismo tiempo debe ofrecer una máxima accesibilidad para que los analitos puedan interaccionar con la molécula inmovilizada. Además, el proceso sol-gel permite llevar a cabo un ajuste adecuado de las propiedades de difusión del analito en el sol-gel, que minimice las tradicionales limitaciones al transporte de masa, presentes en los sensores clásicos, a través de modificaciones estructurales.

III.5.2.2. *Ventajas e inconvenientes de los vidrios sol-gel*

Los vidrios sol-gel¹⁵⁴ proporcionan una serie de ventajas frente a los soportes habituales:

- ✓ Son compatibles con una gran variedad de reactivos químicos y biológicos.
- ✓ Poseen rigidez física y resistencia a la deformación mecánica.
- ✓ No se aprecian deformaciones de la fase sensora al ser sumergidos en medios orgánicos o disoluciones acuosas.
- ✓ Son químicamente inertes.
- ✓ Tienen elevada estabilidad térmica, fotoquímica y biodegradabilidad.
- ✓ Poseen excelente transparencia óptica, lo que es ideal para realizar medidas de absorción o emisión.
- ✓ Se preparan en condiciones poco agresivas, lo que permite inmovilizar reactivos térmica y químicamente sensibles como biomoléculas.
- ✓ Se pueden obtener configuraciones muy variadas como: monolitos, láminas, fibras, electrodos, etc.

También presentan una serie de desventajas que disminuyen su aplicabilidad en la construcción de sensores:

- ✗ Son frágiles.
- ✗ Sufren hidrólisis a pHs elevados.

- ✖ Tienen gran capacidad de intercambio catiónico debido a los grupos silanoles superficiales.
- ✖ Requieren procesos relativamente complejos para la inmovilización química de reactivos orgánicos.
- ✖ Poseen largos tiempos de respuesta en medios acuosos, especialmente cuando los reactivos son atrapados en la estructura inorgánica.
- ✖ Pueden producirse pérdidas de reactivo por lixiviación.
- ✖ Modifican ligeramente las características espectroscópicas de los reactivos inmovilizados debido a la interacción con la superficie interna de los poros.
- ✖ Disminuyen la capacidad de difusión de los analitos a lo largo del tiempo.

III.5.2.3. *El proceso sol-gel*

La formación de matrices inorgánicas mediante la tecnología sol-gel¹⁵⁴ tiene lugar a través de la hidrólisis (en presencia de agua) y condensación de distintos precursores (principalmente tetraalcoxisilanos de bajo peso molecular como el TMOS (tetrametoxisilano) o el TEOS (tetraetoxisilano)) para producir una suspensión coloidal (**sol**). Posteriormente, tiene lugar una gelación por aglomeración de los monómeros coloidales formados con un aumento de la viscosidad del “sol” y originándose una estructura porosa de óxido del metal denominada **gel**. Las propiedades del gel continúan cambiando mientras queden disolventes y agua en la estructura porosa debido a las reacciones de policondensación, que tras una etapa de secado y contracción, proporciona el **xerogel** poroso (gel seco al haberse evaporado el agua y los disolventes orgánicos). Se emplea un medio ácido o básico para catalizar

la reacción de hidrólisis y controlar la superficie específica de los poros en el xerogel. En la Figura 23 se muestran las fases en la formación de un xerogel poroso mediante dopaje químico.

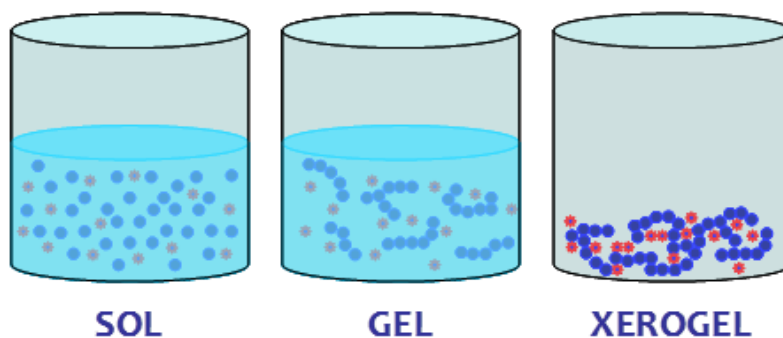


Fig. 23. Fases en la formación de un xerogel poroso mediante dopaje químico: (●) moléculas de precursor y (✱) agente dopante.

Resumiendo de forma esquemática, la preparación de un vidrio sol-gel consta de tres etapas fundamentales:

1. **Hidrólisis y condensación:** El precursor (compuesto que por hidrólisis se transforma en monómero) se mezcla con agua en medio ácido (el H^+ actúa como catalizador) y tras agitación vigorosa (o a través de ultrasonidos), se obtiene una disolución (sol). Puesto que el precursor es inmisible en agua, en ocasiones se facilita la disolución adicionando un alcohol (metanol o etanol). En realidad, esto no es estrictamente necesario ya que el alcohol que se libera durante el proceso de hidrólisis va favoreciendo la disolución, pero trabajando de esta forma el proceso de preparación del "sol" es más lento. Paralelamente a la hidrólisis del precursor, se produce la sucesiva condensación entre los grupos silanol. Las reacciones implicadas en esta etapa son:



Durante estos procesos se van formando dímeros, trímeros, cadenas lineales y redes tridimensionales. Las propiedades físicas del sol-gel dependen en gran medida del tamaño de las partículas y de su interconexión en esta etapa.

- 2. Gelación:** La gelación es un proceso por el cual toda esa red, constituida por polímeros de diferente longitud y estructura espacial, empieza a interconectarse para formar un gel. La evaporación del disolvente y el consumo de agua por parte de la hidrólisis del precursor origina que la disolución se concentre, provocando que la suspensión formada por esos polímeros de distinto tamaño, se desestabilice dando lugar a un sólido que se adapta al molde que lo contiene.
- 3. Secado y envejecimiento:** Durante las últimas etapas de la gelación, el agua y el disolvente orgánico van siendo desplazados de las cavidades que se están produciendo por la continua condensación entre grupos silanol, lo que da lugar a una considerable reducción en el volumen del sol-gel y en el tamaño de los poros.

III.5.2.4. Factores que afectan al proceso sol-gel

Como ya se ha dicho anteriormente, un vidrio sol-gel es una red tridimensional de SiO₂ y cuyas características (porosidad, tamaño de poro, resistencia mecánica, etc.) dependen de las condiciones en las que se realicen las etapas

anteriores. Hay un gran número de factores¹²⁴ que pueden afectar a las características del sol-gel obtenido, pero entre ellos, hay dos que son de gran importancia:

- ◆ **pH:** Un pH elevado acelera los procesos de hidrólisis y condensación aumentando de esta manera la disolución de partículas de precursor, y por lo tanto, proporcionando una fuente continua de monómeros. Asimismo, se aumenta la desprotonación y las cargas superficiales por lo que se posponen los procesos de agregación y gelación. Por tanto, un sol-gel fabricado a un pH elevado presenta una gran porosidad, y en consecuencia, una elevada superficie específica. A pH bajos ($\text{pH} < 2$) las velocidades de hidrólisis y condensación aumentan como consecuencia de la hidrólisis ácida. La policondensación a estos pHs recuerda a la de los polímeros orgánicos, generando materiales densos con muy poca área efectiva y poros pequeños.
- ◆ **Proporción agua/precursor:** Una elevada proporción agua/precursor acelera la velocidad de hidrólisis del alcóxido y disminuye la velocidad de condensación, produciéndose de este modo un incremento de la porosidad y del área específica. Sin embargo, cuando esta proporción se hace inferior a 4, la polimerización empieza a ser controlada por la velocidad de condensación. Proporciones agua/precursor bajas dan lugar a estructuras poliméricas lineales con un gran número de grupos alcóxido sin hidrolizar.

Existen otros factores^{152, 155} que también pueden influir en las características del vidrio sol-gel como: tipo de precursor, tiempo de envejecimiento, temperatura, disolvente, tensoactivos, etc. Así, una temperatura elevada favorece la disolución de las partículas del precursor aumentando la estabilidad del “sol” y permitiendo la obtención de materiales altamente porosos; los tensoactivos se utilizan para reducir la tensión superficial y estabilizar las partículas menores, así como para prevenir las fracturas en la etapa de secado.

III.5.2.5. *Métodos de inmovilización en vidrios sol-gel*

La inmovilización del reactivo en el vidrio sol-gel se puede llevar a cabo mediante diversos métodos¹⁵⁶:

- **Dopaje químico:** El reactivo que se quiere inmovilizar se añade junto a los monómeros al inicio de la polimerización, quedando atrapado en el interior del material poroso del sol-gel.
- **Inmovilización química:** Consiste en la formación de enlaces covalentes entre el reactivo a inmovilizar y los grupos silanol.
- **Impregnación:** Consiste en la inmersión del soporte poroso en una disolución concentrada del reactivo a inmovilizar, que queda adsorbido físicamente en los poros del material inorgánico.
- **Copolimerización:** Consiste en la polimerización mediante monómeros alcoxisilanos modificados, los cuales contienen el reactivo a inmovilizar enlazado covalentemente.

III.5.3. *Membranas de inclusión polimérica*

III.5.3.1. *Aspectos generales*

Las membranas de inclusión polimérica fueron, históricamente, los primeros soportes sólidos usados en el desarrollo de fases sensoras ópticas, debido a su amplio uso en el desarrollo de sensores electroquímicos y a la posibilidad de formar películas sensoras delgadas que contienen todos los reactivos necesarios para llevar a cabo la reacción de reconocimiento de la especie de interés.

Las membranas de inclusión polimérica (PIMs) se pueden definir como *“membranas sintéticas en las que el reactivo es inmovilizado dentro de una matriz polimérica”*.

Los componentes más importantes que constituyen las membranas de inclusión polimérica son el **reactivo a inmovilizar** y el **polímero empleado para su preparación**. A continuación, se van a describir los factores⁶² más importantes de estos dos componentes para su consideración en el desarrollo de membranas de inclusión polimérica:

- ▶ **Reactivo:** El reactivo seleccionado debe poseer una función química que le permita ser inmovilizado en una matriz rígida, sino sería preciso modificarlo para proveerle de una función química que posibilite el proceso de inmovilización. Este proceso no debe afectar a sus propiedades físico-químicas con el fin de que su reactividad en fase sólida sea similar a la que presenta en disolución.

La estabilidad fotoquímica del reactivo es muy importante para su empleo en fases sensoras ópticas, debido a que la fotodescomposición del reactivo inmovilizado puede producirse por la exposición prolongada de la fase sensora óptica a la radiación electromagnética.

Otro factor importante es la cantidad de reactivo inmovilizado, que depende del tipo de reacción involucrada en el proceso de detección. En reacciones reversibles la concentración del reactivo en la fase sólida es pequeña; mientras que si la reacción es irreversible, es preciso inmovilizar una gran cantidad de reactivo para disponer de una gran reserva del mismo y de este modo poder utilizar el dispositivo durante un largo periodo de tiempo. En todo caso la respuesta analítica obtenida como absorbancia, fluorescencia,

dispersión Raman, etc., se encuentra afectada por la cantidad de reactivo fijado.

Por último, otro factor es la posibilidad de regeneración del reactivo si interviene en un proceso irreversible; en caso de que esto no ocurra, se puede fabricar un dispositivo desechable.

- ▶ **Polímero:** El reactivo utilizado en fases sensoras ópticas se inmoviliza, preferentemente, en polímeros que sean rígidos y ópticamente transparentes. El polímero tiene un marcado efecto sobre las características de la fase sensora, que influye principalmente en el tiempo de respuesta e incluso modifica su selectividad.

El principal factor a examinar en la elección del polímero es la accesibilidad que tiene el analito al reactivo, ya que el polímero elegido debe favorecer las interacciones reactivo-analito con el fin de conseguir una respuesta rápida. Además, el polímero puede proporcionar a la fase sensora una gran selectividad de forma que su respuesta sólo se produzca para un determinado compuesto. Esta característica se conseguirá siempre que el polímero facilite la entrada del analito al reactivo y no de las demás especies presentes en el medio de análisis.

Otro factor a evaluar en la elección del polímero, es su posible fluorescencia intrínseca, como ocurre con algunos polímeros de poliestireno y polietileno. Este hecho da lugar al empeoramiento de los límites de detección de la especie a cuantificar, debido a la elevada señal óptica originada por el polímero (fondo).

Finalmente, otro factor interesante en la elección del polímero, es que éste posea una elevada resistencia mecánica y bacteriana.

Tanto la naturaleza del reactivo inmovilizado como la de los plastificantes y los aditivos iónicos usados, tienen una enorme influencia en la sensibilidad y selectividad de estas membranas.

III.5.3.2. Ventajas e inconvenientes de las PIMs

Las ventajas más importantes de las membranas de inclusión polimérica¹¹⁷ son:

- ✓ Pueden ser diseñadas de forma sencilla, ya que se dispone de toda la tecnología previamente desarrollada para la preparación de este tipo de membranas en sensores electroquímicos.
- ✓ En función de la técnica de deposición empleada, se puede controlar el espesor de la membrana polimérica y se pueden recubrir multitud de dispositivos de medida de forma sencilla y rápida.
- ✓ La gran información y los diferentes tipos de polímeros de los que se dispone habitualmente, permite que se puedan variar sus propiedades físico-químicas de manera que se puedan adaptar a las necesidades requeridas.
- ✓ Estas membranas pueden ser fácilmente entrecruzadas aumentando su estabilidad e impidiendo problemas de redisolución o “leaching” (blanqueamiento), obteniendo polímeros tridimensionales similares a los que también se han usado en el desarrollo de fases sensoras ópticas.

Los principales inconvenientes de este tipo de membranas¹¹⁷ son:

- ✗ Baja estabilidad, debido a la degradación de los reactivos empleados.
- ✗ Problemas de agregación de estos reactivos y, por tanto, una disminución progresiva de su sensibilidad.
- ✗ Tiempos de respuesta elevados, debido a que el analito tiene que difundir dentro de la membrana polimérica para dar lugar a la reacción de reconocimiento.

Estos inconvenientes de las membranas de inclusión polimérica se pueden solventar haciendo una buena selección de los ionóforos y/o cromoionóforos, así como del polímero lineal. Por tanto, es necesario llevar a cabo un esfuerzo investigador en el desarrollo de nuevos compuestos ópticamente activos para las especies de interés, que sean altamente fotoestables y termoestables, así como perfeccionar los procesos de reacción química entre éstos y los analitos de interés, que permitan aumentar su sensibilidad analítica.

Otro gran campo de investigación dentro de este tipo de fases sensoras, es el desarrollo de nuevos polímeros lineales que incluyan, dentro de su estructura polimérica, parte de los reactivos (o grupos funcionales) necesarios para poder llevar a cabo la reacción de reconocimiento. De este modo, se evitará su deterioro y, principalmente, los problemas de agregación debidos a su inmovilización dentro de la estructura polimérica.

III.5.3.3. *Preparación de las PIMs*

Aparte del reactivo seleccionado, los componentes habitualmente empleados para la obtención de fases sensoras ópticas mediante membranas de inclusión polimérica son: el polímero, el plastificante, el aditivo iónico y el disolvente. A continuación se describirá brevemente cada uno de ellos.

El **polímero** es el componente responsable de dar soporte en términos de consistencia y rigidez a la membrana. Se utilizan polímeros lineales, que tienen la capacidad de disolverse en un disolvente apropiado. Dependiendo de las características del reactivo seleccionado, pueden utilizarse polímeros hidrofóbicos (como poliestireno o policloruro de vinilo) o hidrofílicos (como nafión o 2-hidroxietil celulosa). Los polímeros más ampliamente utilizados en la preparación de PIMs son: poliestireno (PS), policloruro de vinilo (PVC), polimetilmetacrilato (PMMA), polidimetilsiloxanos (PDMS), politetrafluoroetilenos (PTFE) y derivados de celulosa, como etil celulosa. De entre todos ellos, el PVC es el polímero más usado porque presenta una elevada estabilidad mecánica y química, así como una baja resistencia eléctrica.

El **plastificante** también juega un papel importante en la preparación de la membrana, aunque para algunos polímeros determinados no sea necesaria su utilización. Su selección al igual que la del polímero constituye una etapa muy importante en la preparación de la membrana. El plastificante debe cumplir una serie de requisitos como: ser estable y químicamente inerte, tener una viscosidad y constante dieléctrica adecuadas, presentar propiedades solubilizantes para el reactivo y los demás componentes de la membrana, además de tener una lipofilidad importante y una toxicidad baja. Algunos de los plastificantes más representativos en la preparación de PIMs son: bis(2-etilhexil) adipato (DOA), dioctil

ftalato (DOP), bis(2-etilhexil) sebacato (DOS), 2-cianofenil octil éter (CPOE), 2-nitrofenil octil éter (NPOE), tributil fosfato (TBP) y glicerol.

Aparte de los componentes básicos de la membrana, en algunas ocasiones es necesario el uso de un **aditivo iónico**, que se incorpora a la membrana por razones de electroneutralidad. Los aditivos iónicos corresponden son los centros aniónicos lipofílicos y las sales altamente lipofílicas. El aditivo reduce o elimina las interferencias causadas por aniones lipofílicos, produciendo cambios significativos en la selectividad. Adicionalmente, disminuye la resistencia eléctrica de la membrana, además de reducir el tiempo de respuesta de la misma. El tetrafenilborato sódico o su análogo más lipofílico, el tetrakis(4-clorofenil)borato potásico (KTPClPB), son las dos sales más comúnmente utilizadas.

Por último, el **disolvente** es el encargado de solubilizar a todos los componentes de la membrana polimérica. Debe ser un disolvente volátil, que se evapore fácilmente durante la deposición para generar la membrana polimérica. Dependiendo de la composición de la membrana, los disolventes más usados son: tetrahidrofurano, cloroformo, acetona y metanol.

El procedimiento de construcción de una membrana de inclusión polimérica consiste en la preparación mediante agitación mecánica de una disolución (cóctel) constituida por el polímero, el reactivo, el plastificante, el aditivo iónico y el disolvente. Posteriormente, se lleva a cabo la deposición de esta disolución sobre un soporte inerte, y después de la evaporación del disolvente, se produce un plegamiento del polímero que retiene los elementos sensores dando lugar a la denominada membrana de inclusión polimérica.

III.5.3.4. Técnicas de deposición de PIMs

Uno de los parámetros más críticos en la preparación de una membrana de inclusión polimérica es la deposición de la disolución polimérica (cóctel) sobre el soporte. Para ello, existen diferentes técnicas de deposición, cuya selección se hará en función del espesor requerido o del tipo de soporte inerte en el que se deposite la fase sensora. A continuación se van a describir las dos técnicas de deposición empleadas en esta memoria: *spin-coating* y *dip-coating*.

III.5.3.4.1. Spin coating

El *spin coating* es una técnica muy sencilla que consiste en depositar películas delgadas y uniformes sobre soportes planos. En resumen, una determinada cantidad de disolución polimérica (cóctel) se deposita en la superficie del soporte, que está girando uniformemente a una velocidad de rotación elevada con el fin de extender el cóctel mediante la fuerza centrífuga. La rotación continúa mientras el cóctel se distribuye hasta los bordes de la superficie del soporte. Como ya se ha dicho, el disolvente empleado es volátil y se evapora simultáneamente. En la Figura 24 se muestran las etapas involucradas en la técnica de *spin coating*.

Un parámetro importante en esta técnica de deposición es la velocidad de rotación, que debe permanecer constante durante la deposición. Intuitivamente, existe una relación entre la velocidad de rotación del aparato (*spin coater*) y el espesor depositado sobre el soporte: a mayor velocidad de rotación se produce un espesor más delgado de la película y a menor velocidad de rotación se produce un espesor más grueso de la película. El control estricto de la velocidad de rotación proporciona fases sensoras con una reproducibilidad aceptable. El espesor de la película también

depende de la concentración del cóctel y del disolvente. Por lo tanto, el espesor final de la película determinará parámetros importantes de la fase sensora, tales como la sensibilidad y el tiempo de respuesta.

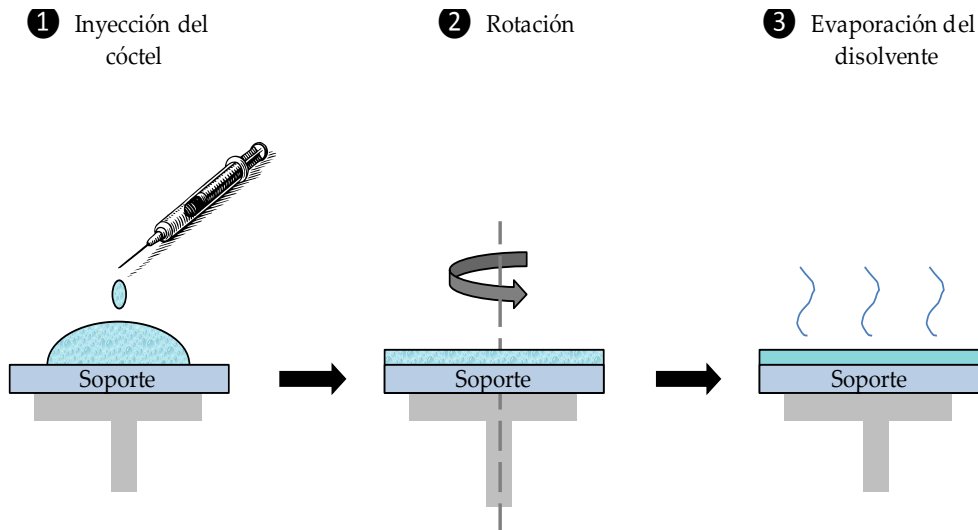


Fig. 24. Etapas involucradas en la técnica de deposición de “*spin coating*”.

Mediante esta técnica de deposición se pueden preparar membranas de inclusión polimérica con espesores que estén comprendidos aproximadamente entre 10 nm y 1 μm .

III.5.3.4.2. *Dip coating*

El *dip coating* es también una técnica de deposición muy simple, que consiste en sumergir el soporte dentro del cóctel, obteniéndose de este modo una capa depositada sobre el mismo. En la Figura 25 se muestran las etapas involucradas en la técnica de *dip coating*.

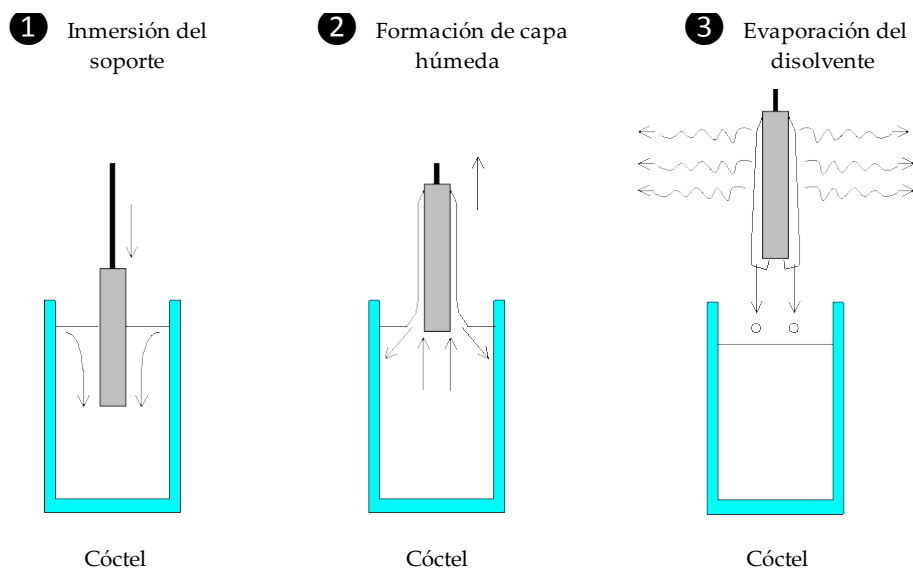


Fig. 25. Etapas involucradas en la técnica de deposición de “*dip coating*”.

Existen determinados parámetros importantes¹⁵⁷ en la técnica de *dip-coating* como son:

- ◆ **Velocidad de inmersión:** Debe ser constante al sumergir y al extraer el soporte (generalmente, suele ser similar). De forma intuitiva, hay una relación entre la velocidad de inmersión y el espesor de la capa depositada: a mayor velocidad el espesor de la capa aumenta, y viceversa. En esta técnica, el espesor final también influirá en la sensibilidad y en el tiempo de respuesta de la fase sensora.

Por otro lado, si la deposición es más gruesa hay más cantidad de reactivo inmovilizado, y a primera vista, la sensibilidad será más elevada; sin embargo, si la capa final es demasiado gruesa, puede producir pérdidas elevadas por dispersión junto con un incremento de la absorción óptica. Por lo

tanto, la velocidad de inmersión define las propiedades físicas de la deposición final.

- ◆ **Número de capas:** Obviamente, el espesor de la deposición final aumenta conforme asciende el número de inmersiones. Como se puede deducir, existe un compromiso entre la velocidad de inmersión y el número de capas depositadas. Por lo tanto, el proceso de construcción de la fase sensora tiene que ser optimizado con ambos parámetros¹¹⁶.
- ◆ **Curado térmico:** Para la deposición se emplea el cóctel formado por todos los componentes incluido el disolvente. Los disolventes orgánicos (alcoholes, diclorometano, cloroformo, tetrahidrofurano, etc.) usados para la deposición son compuestos orgánicos volátiles, que se evaporan de la capa formada para evitar interferencias no deseadas. Además, cuando el espesor de la deposición final aumenta, las capas ya fijadas pueden llegar a disolverse de nuevo en el cóctel, lo que empeora la homogeneidad de la deposición.

Estos problemas pueden ser solventados mediante un curado térmico después de cada inmersión. De este modo, todo el disolvente presente en la capa depositada se evapora rápidamente. Asimismo, el curado térmico endurece la capa depositada, y por tanto, aumenta la robustez de la fase sensora.

El control de estos parámetros críticos en la técnica de *dip coating* proporciona fases sensoras con una reproducibilidad aceptable.

III.6. BIBLIOGRAFÍA

1. Janata, J.; Bezegh, A., Chemical sensors. *Analytical Chemistry* **1988**, *60* (12), R62-R74.
2. Roe, J. N.; Szoka, F. C.; Verkman, A. S., Fiber optic sensor for the detection of potassium using fluorescence energy-transfer. *Analyst* **1990**, *115* (4), 353-358.
3. Hulanicki, A.; Glab, S.; Ingman, F., Chemical sensors definitions and classification. *Pure and Applied Chemistry* **1991**, *63* (9), 1247-1250.
4. Valcarcel, M.; Luque de Castro, M. D., *Flow-through (bio)chemical sensors*. Elsevier **1994**.
5. Cammann, K., Continuous pollution-control by chemical sensors. *Sensors and Actuators B-Chemical* **1992**, *6* (1-3), 19-24.
6. Pereiro, R. Tesis Doctoral: *Estudio de nuevas fases solidas reactivas para sensores opticos de elementos de interes biomedico: analisis de aluminio y potasio*. Universidad de Oviedo, Oviedo, **1991**.
7. Janata, J., *Principles of chemical sensors*. CRC Press: Boca Raton, FL, **1991**; Vol. 1.
8. Costa Fernandez, J. M.; Sanz Medel, A., In *Fosforescencia molecular analitica: una aproximacion practica*, Fernandez Gutierrez, A.; Schulman, S. G., Eds. Editorial Universidad de Granada: Granada, España, **2001**.
9. Edmonds, T. E., *Chemical Sensors*. Blackie & Son: UK, **1988**.
10. Barone, P. W.; Parker, R. S.; Strano, M. S., In vivo fluorescence detection of glucose using a single-walled carbon nanotube optical sensor: Design,

- fluorophore properties, advantages, and disadvantages. *Analytical Chemistry* **2005**, *77* (23), 7556-7562.
11. DuBois, S.; Eng, S.; Bhattacharya, R.; Rulyak, S.; Hubbard, T.; Putnam, D.; Kearney, D., Breath Ammonia Testing for Diagnosis of Hepatic Encephalopathy. *Digestive Diseases and Sciences* **2005**, *50* (10), 1780-1784.
 12. Billingsley, K.; Balaconis, M. K.; Dubach, J. M.; Zhang, N.; Lim, E.; Francis, K. P.; Clark, H. A., Fluorescent Nano-Optodes for Glucose Detection. *Analytical Chemistry* **2010**, *82* (9), 3707-3713.
 13. Fercher, A.; Borisov, S. M.; Zhdanov, A. V.; Klimant, I.; Papkovsky, D. B., Intracellular O₂ Sensing Probe Based on Cell-Penetrating Phosphorescent Nanoparticles. *ACS Nano* **2011**, *5* (7), 5499-5508.
 14. Ng, S.-M.; Narayanaswamy, R., Demonstration of a simple, economical and practical technique utilising an imprinted polymer for metal ion sensing. *Microchimica Acta* **2010**, *169* (3), 303-311.
 15. Yanaz, Z.; Filik, H.; Apak, R., Development of an optical fibre reflectance sensor for lead detection based on immobilised arsenazo III. *Sensors and Actuators B-Chemical* **2010**, *147* (1), 15-22.
 16. Nuriman; Kuswandi, B.; Verboom, W., Optical fiber chemical sensing of Hg(II) ions in aqueous samples using a microfluidic device containing a selective tripodal chromoionophore-PVC film. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2011**, *157* (2), 438-443.
 17. Richardson, J.; Drake, A.; Lazo-Miller, C.; Hand, J.; Morgan, T.; Lagadic, I., Lead detection in environmental water sample using an organoclay film-based

- attenuated total reflectance sensor. *Sensors and Actuators B-Chemical* **2011**, 158 (1), 271-277.
18. Beutel, S.; Henkel, S., In situ sensor techniques in modern bioprocess monitoring. *Applied Microbiology and Biotechnology* **2011**, 91 (6), 1493-1505.
 19. Yasin, M.; Harun, S. W.; Tan, C. F.; Phang, S. W.; Ahmad, H., Fiber optic chemical sensor using fiber coupler probe based on intensity modulation for alcohol detection. *Microwave and Optical Technology Letters* **2011**, 53 (8), 1935-1938.
 20. Yuana, C. L.; Chang, C. P.; Song, Y., Hazardous industrial gases identified using a novel polymer/MWNT composite resistance sensor array. *Materials Science and Engineering B-Advanced Functional Solid-State Materials* **2011**, 176 (11), 821-829.
 21. De Jong, A. R.; Boumans, H.; Slaghek, T.; Van Veen, J.; Rijk, R.; Van Zandvoort, M., Active and intelligent packaging for food: Is it the future? *Food Additives and Contaminants* **2005**, 22 (10), 975-979.
 22. Catala, R.; Gavara, R., Active and intelligent packaging and food safety. *Alimentaria* **2008**, (392), 75.
 23. Melgarejo Martinez, P., Active and intelligent packaging: from innovation to reality. *Alimentaria* **2009**, (Sp. Iss. SI), 76-79.
 24. Restuccia, D.; Spizzirri, U. G.; Parisi, O. I.; Cirillo, G.; Curcio, M.; Iemma, F.; Puoci, F.; Vinci, G.; Picci, N., New EU regulation aspects and global market of active and intelligent packaging for food industry applications. *Food Control* **2010**, 21 (11), 1425-1435.

25. Wanihsuksombat, C.; Hongtrakul, V.; Suppakul, P., Development and characterization of a prototype of a lactic acid -based time- temperature indicator for monitoring food product quality. *Journal of Food Engineering* **2010**, *100* (3), 427-434.
26. Alimelli, A.; Pennazza, G.; Santonico, M.; Paolesse, R.; Filippini, D.; D'Amico, A.; Lundstrom, I.; Di Natale, C., Fish freshness detection by a computer screen photoassisted based gas sensor array. *Analytica Chimica Acta* **2007**, *582* (2), 320-328.
27. Gil, L.; Barat, J. M.; Baigts, D.; Martinez-Manez, R.; Soto, J.; Garcia-Breijo, E.; Aristoy, M. C.; Toldra, F.; Llobet, E., Monitoring of physical-chemical and microbiological changes in fresh pork meat under cold storage by means of a potentiometric electronic tongue. *Food Chemistry* **2011**, *126* (3), 1261-1268.
28. Yam, K. L.; Takhistov, P. T.; Miltz, J., Intelligent packaging: Concepts and applications. *Journal of Food Science* **2005**, *70* (1), R1-R10.
29. Thomas, P. C.; Halter, M.; Tona, A.; Raghavan, S. R.; Plant, A. L.; Forry, S. P., A Noninvasive Thin Film Sensor for Monitoring Oxygen Tension during in Vitro Cell Culture. *Analytical Chemistry* **2009**, *81* (22), 9239-9246.
30. Myllyla, T. S.; Abou Elseoud, A.; Sorvoja, H. S. S.; Myllyla, R. A.; Harja, J. M.; Nikkinen, J.; Tervonen, O.; Kiviniemi, V., Fibre optic sensor for non-invasive monitoring of blood pressure during MRI scanning. *Journal of Biophotonics* **2011**, *4* (1-2), 98-107.
31. Naciri, M.; Kuystermans, D.; Al-Rubeai, M., Monitoring pH and dissolved oxygen in mammalian cell culture using optical sensors. *Cytotechnology* **2008**, *57* (3), 245-250.

-
32. Sud, D.; Mycek, M.-A., Calibration and validation of an optical sensor for intracellular oxygen measurements. *Journal of Biomedical Optics* **2009**, *14* (2). DOI: 10.1117/1.3116714.
 33. Zhu, H. Y.; Dale, P. S.; Caldwell, C. W.; Fan, X. D., Rapid and label-free detection of breast cancer biomarker CA15-3 in clinical human serum samples with optofluidic ring resonator sensors. *Analytical Chemistry* **2009**, *81* (24), 9858-9865.
 34. Thomazy, D.; So, S.; Kosterev, A.; Lewicki, R.; Dong, L.; Sani, A. A.; Tittel, F. K., Low-power laser-based carbon monoxide sensor for fire and post-fire detection using a compact Herriott multipass cell. In *Quantum Sensing and Nanophotonic Devices VII*. Razeghi M.; Sudharasanan R.; Brown G.J., Eds. **2010**, Vol. 7608. DOI: 10.1117/12.841926.
 35. Monk, D. J.; Walt, D. R., Optical fiber-based biosensors. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2004**, *379* (7-8), 931-945.
 36. Leung, A.; Shankar, P. M.; Mutharasan, R., A review of fiber-optic biosensors. *Sensors and Actuators B-Chemical* **2007**, *125* (2), 688-703.
 37. Orellana, G.; Haigh, D., New trends in fiber-optic chemical and biological sensors. *Current Analytical Chemistry* **2008**, *4* (4), 273-295.
 38. Sai, V. V. R.; Kundu, T.; Deshmukh, C.; Titus, S.; Kumar, P.; Mukherji, S., Label-free fiber optic biosensor based on evanescent wave absorbance at 280 nm. *Sensors and Actuators B-Chemical* **2010**, *143* (2), 724-730.

39. Goicoechea, J.; Zamarreño, C. R.; Matias, I. R.; Arregui, F. J., Optical fiber pH sensors based on layer-by-layer electrostatic self-assembled neutral red. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2008**, *132* (1), 305-311.
40. Chauhan, V. M.; Burnett, G. R.; Aylott, J. W., Dual-fluorophore ratiometric pH nanosensor with tuneable pK(a) and extended dynamic range. *Analyst* **2011**, *136* (9), 1799-1801.
41. Alizadeh, K.; Parooi, R.; Hashemi, P.; Rezaei, B.; Ganjali, M. R., A new Schiff's base ligand immobilized agarose membrane optical sensor for selective monitoring of mercury ion. *Journal of Hazardous Materials* **2011**, *186* (2-3), 1794-1800.
42. Huang, G. G.; Lee, C. J.; Tsai, B. C.; Yang, J.; Sathiyendiran, M.; Lu, K. L., Gondola-shaped tetra-rhenium metallacycles modified evanescent wave infrared chemical sensors for selective determination of volatile organic compounds. *Talanta* **2011**, *85* (1), 63-69.
43. Silva, L. I. B.; Freitas, A. C.; Rocha-Santos, T. A. P.; Pereira, M. E.; Duarte, A. C., Breath analysis by optical fiber sensor for the determination of exhaled organic compounds with a view to diagnostics. *Talanta* **2011**, *83* (5), 1586-1594.
44. Shin, H. J., Genetically engineered microbial biosensors for in situ monitoring of environmental pollution. *Applied Microbiology and Biotechnology* **2011**, *89* (4), 867-877.
45. Shevchenko, Y.; Francis, T. J.; Blair, D. A. D.; Walsh, R.; DeRosa, M. C.; Albert, J., In situ biosensing with a surface plasmon resonance fiber grating aptasensor. *Analytical Chemistry* **2011**, *83* (18), 7027-7034.

-
46. Kuswandi, B.; Nuriman; Huskens, J.; Verboom, W., Optical sensing systems for microfluidic devices: A review. *Analytica Chimica Acta* **2007**, *601* (2), 141-155.
 47. Watts, A. S.; Urbas, A. A.; Moschou, E.; Gavalas, V. G.; Zoval, J. V.; Madou, M.; Bachas, L. G., Centrifugal microfluidics with integrated sensing microdome optodes for multiion detection. *Analytical Chemistry* **2007**, *79* (21), 8046-8054.
 48. Ramirez-Garcia, S.; Baeza, M.; O'Toole, M.; Wu, Y.; Lalor, J.; Wallace, G. G.; Diamond, D., Towards the development of a fully integrated polymeric microfluidic platform for environmental analysis. *Talanta* **2008**, *77* (2), 463-467.
 49. Lin, L.; Gao, Z. X.; Wei, H. B.; Li, H. F.; Wang, F.; Lin, J. M., Fabrication of a gel particle array in a microfluidic device for bioassays of protein and glucose in human urine samples. *Biomicrofluidics* **2011**, *5* (3), 10. DOI: 10.1063/1.3623412.
 50. Kato, R.; Kide, K.; Hattori, T.; Wakahara, A.; Yamaguchi, M., Detection of moisture in oil using evanescent absorption from sapphire optical waveguide coated with co-doped silica film. *Analytical Letters* **2011**, *44* (4), 577-584.
 51. Sadrolhosseini, A. R.; Moxsin, M. M.; Yunus, W. M. M.; Talib, Z. A., Application of surface plasmon resonance sensor in detection of water in palm-oil-based biodiesel and biodiesel blend. *Sensors and Materials* **2011**, *23* (6), 315-324.
 52. Wildeboer, D.; Jiang, P.; Price, R. G.; Yu, S.; Jeganathan, F.; Abuknesha, R. A., Use of antibody-hapten complexes attached to optical sensor surfaces as a substrate for proteases: Real-time biosensing of protease activity. *Talanta* **2010**, *81* (1-2), 68-75.

53. Moczko, E.; Cauchi, M.; Turner, C.; Meglinski, I.; Piletsky, S., Optical assay for biotechnology and clinical diagnosis. *Biomedical Engineering, IEEE Transactions on* **2011**, *58* (8), 2154-2160.
54. Phillips, J. P.; Langford, R. M.; Chang, S. H.; Kyriacou, P. A.; Jones, D. P., Photoplethysmographic measurements from the esophagus using a new fiber-optic reflectance sensor. *Journal of Biomedical Optics* **2011**, *16* (7). DOI: 10.1117/1.3598858.
55. Long, F.; Gao, C.; Shi, H. C.; He, M.; Zhu, A. N.; Klibanov, A. M.; Gu, A. Z., Reusable evanescent wave DNA biosensor for rapid, highly sensitive, and selective detection of mercury ions. *Biosensors & Bioelectronics* **2011**, *26* (10), 4018-4023.
56. Ferreira, T. G.; Castillo, M.; Payne, F. A.; O'Donnell, C.; O'Callaghan, D., A sensor technology for monitoring and controlling syneresis in the cheese vat. *Journal of Dairy Science* **2010**, *93*, 328-328.
57. Alvarez, D.; Castillo, M.; Xiong, Y. L.; Payne, F. A., Prediction of beef meat emulsion quality with apparent light backscatter extinction. *Food Research International* **2010**, *43* (5), 1260-1266.
58. Katika, K. M.; Pilon, L., Feasibility analysis of an epidermal glucose sensor based on time-resolved fluorescence. *Applied Optics* **2007**, *46* (16), 3359-3368.
59. Esposito, R.; Della Ventura, B.; De Nicola, S.; Altucci, C.; Velotta, R.; Mita, D. G.; Lepore, M., Glucose sensing by time-resolved fluorescence of sol-gel immobilized glucose oxidase. *Sensors* **2011**, *11* (4), 3483-3497.

-
60. Borisov, S. M.; Klimant, I., Luminescent chemosensors - advanced tools in analytical chemistry. *Journal of Microelectronics Electronic Components and Materials* **2010**, *40* (4), 291-297.
 61. Plata, M. R.; Contento, A. M.; Ríos, A., State-of-the-art of (bio)chemical sensor developments in analytical spanish groups. *Sensors* **2010**, *10* (4), 2511-2576.
 62. Perez Conde, C., *Sensores opticos*. 1^a ed.; Editorial Universidad de Valencia: Valencia, **1996**.
 63. Faria, A. F.; Mignone, R. A.; Montenegro, M. A.; Mercadante, A. Z.; Borsarelli, C. D., Characterization and singlet oxygen quenching capacity of spray-dried microcapsules of edible biopolymers containing antioxidant molecules. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2010**, *58* (13), 8004-8011.
 64. Ruzicka, J.; Hansen, E. H., Optosensing at active surfaces - a new detection principle in flow-injection analysis. *Analytica Chimica Acta* **1985**, *173*, 3-21.
 65. Ruiz-Medina, A.; Llorent-Martinez, E. J., Recent progress of flow-through optosensing in clinical and pharmaceutical analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2010**, *53* (3), 250-261.
 66. Llorent-Martinez, E. J.; Ortega-Barrales, P.; Fernandez-de Cordova, M. L.; Ruiz-Medina, A., Trends in flow-based analytical methods applied to pesticide detection: A review. *Analytica Chimica Acta* **2011**, *684* (1-2), 30-39.
 67. Valcarcel, M.; Luque de Castro, M. D., *Analisis por inyeccion en flujo*. Editorial Universidad Cordoba / Monte de Piedad y Caja de Ahorros de Cordoba: Cordoba, **1984**.

68. Hansen, E. H.; Miro, M., How flow-injection analysis (FIA) over the past 25 years has changed our way of performing chemical analyses. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2007**, 26 (1), 18-26.
69. Silvestre, C. I. C.; Pinto, P.; Segundo, M. A.; Saraiva, M.; Lima, J., Enzyme based assays in a sequential injection format: A review. *Analytica Chimica Acta* **2011**, 689 (2), 160-177.
70. Van Staden, J. F.; Joubert, A. E.; Van Vliet, H. R., Flow-injection determination of nitrate in natural-waters with copper-cadmium and copperized cadmium tubes in the reaction manifold system. *Fresenius Zeitschrift Fur Analytische Chemie* **1986**, 325 (2), 150-152.
71. Choi, M. M. F., Progress in enzyme-based biosensors using optical transducers. *Microchimica Acta* **2004**, 148 (3-4), 107-132.
72. Abdullah, J.; Ahmad, M.; Heng, L. Y.; Karuppiyah, N.; Sidek, H., An optical biosensor based on immobilization of laccase and MBTH in stacked films for the detection of catechol. *Sensors* **2007**, 7 (10), 2238-2250.
73. Lam, L. H.; Shimamura, T.; Ishiyama, M.; Ukeda, H., Flow injection analysis of angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity with enzymatic reactors. *Talanta* **2009**, 79 (4), 1130-1134.
74. Valcarcel, M.; Rios, A., Selectivity in analytical-chemistry. *Analysis* **1990**, 18 (8), 469-475.
75. Fernandez-Sanchez, J. F.; Segura-Carretero, A.; Cruces-Blanco, C.; Fernandez-Gutierrez, A., Room-temperature luminescence optosensings based on immobilized active principles actives: Application to nafronyl and naproxen

- determination in pharmaceutical preparations and biological fluids. *Analytica Chimica Acta* **2002**, 462 (2), 217-224.
76. Fernandez-Sanchez, J. F.; Carretero, A. S.; Cruces-Blanco, C.; Fernandez-Gutierrez, A., A sensitive fluorescence optosensor for analysing propranolol in pharmaceutical preparations and a test for its control in urine in sport. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2003**, 31 (5), 859-865.
77. Casado-Terrones, S.; Fernandez-Sanchez, J. F.; Cañabate Diaz, B.; Segura Carretero, A.; Fernandez-Gutierrez, A., A fluorescence optosensor for analyzing naphazoline in pharmaceutical preparations: Comparison with other sensors. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2005**, 38 (4), 785-789.
78. Salinas-Castillo, A.; Fernandez-Sanchez, J. F.; Segura-Carretero, A.; Fernandez-Gutierrez, A., A facile flow-through phosphorimetric sensing device for simultaneous determination of naptalam and its metabolite 1-naphthylamine. *Analytica Chimica Acta* **2004**, 522 (1), 19-24.
79. Sanchez-Barragan, I.; Karim, K.; Costa-Fernandez, J. M.; Piletsky, S. A.; Sanz-Medel, A., A molecularly imprinted polymer for carbaryl determination in water. *Sensors and Actuators, B: Chemical* **2007**, 123 (2), 798-804.
80. Piccirilli, G. N.; Escandar, G. M.; Cañada, F. C.; Meras, I. D.; Muñoz de la Peña, A., Flow-through photochemically induced fluorescence optosensor for the determination of linuron. *Talanta* **2008**, 77 (2), 852-857.
81. Salinas-Castillo, A.; Sanchez-Barragan, I.; Costa-Fernandez, J. M.; Pereiro, R.; Ballesteros, A.; Gonzalez, J. M.; Segura-Carretero, A.; Fernandez-Gutierrez, A.; Sanz-Medel, A., Iodinated molecularly imprinted polymer for room

- temperature phosphorescence optosensing of fluoranthene. *Chemical Communications* **2005**, (25), 3224-3226.
82. Valero-Navarro, A.; Fernandez-Sanchez, J. F.; Medina-Castillo, A. L.; Fernandez-Ibanez, F.; Segura-Carretero, A.; Ibanez, J. M.; Fernandez-Gutierrez, A., A rapid, sensitive screening test for polycyclic aromatic hydrocarbons applied to Antarctic water. *Chemosphere* **2007**, 67 (5), 903-910.
83. Valero-Navarro, A.; Salinas-Castillo, A.; Fernandez-Sanchez, J. F.; Segura-Carretero, A.; Mallavia, R.; Fernandez-Gutierrez, A., The development of a MIP-optosensor for the detection of monoamine naphthalenes in drinking water. *Biosensors & Bioelectronics* **2009**, 24 (7), 2305-2311.
84. McDonagh, C.; Burke, C. S.; MacCraith, B. D., Optical chemical sensors. *Chemical Reviews* **2008**, 108 (2), 400-422.
85. Boisdé, G., Les capteurs chimiques a fibres optiques. Realites et perspectives. *Entropia* **1990**, 28, 155.
86. Matias, I. R.; Arregui, F. J.; Claus, R. O., Optical fiber sensors In *Enciclopedia of sensors*, Grimes, C. A.; Dickey, E. C.; M.V., P., Eds. American Scientific Publishers: Stevenson Ranch, CA, USA., **2006**; Vol. 9, pp 1-19.
87. Cusano, A.; Cutolo, A.; Giordano, M., Fiber optic chemical and biological sensors: Perspectives and challenges approaching the nano-era. *Current Analytical Chemistry* **2008**, 4 (4), 271-272.
88. Wolfbeis, O. S., Fiber-optic chemical sensors and biosensors. *Analytical Chemistry* **2008**, 80 (12), 4269-4283.

-
89. Abdukayum, A.; Yimit, A.; Mahmut, M.; Itoh, K., A planar optical waveguide sensor for hydrogen sulfide detection. *Sensor Letters* **2007**, *5* (2), 395-397.
 90. Bagal, D. S.; Vijayan, A.; Aiyer, R. C.; Karekar, R. N.; Karve, M. S., Fabrication of sucrose biosensor based on single mode planar optical waveguide using co-immobilized plant invertase and GOD. *Biosensors & Bioelectronics* **2007**, *22* (12), 3072-3079.
 91. Bhatta, D.; Michel, A. A.; Marti Villalba, M.; Emmerson, G. D.; Sparrow, I. J. G.; Perkins, E. A.; McDonnell, M. B.; Ely, R. W.; Cartwright, G. A., Optical microchip array biosensor for multiplexed detection of bio-hazardous agents. *Biosensors & Bioelectronics* **2011**, *30* (1), 78-86.
 92. Gopinath, S. C. B.; Awazu, K.; Fujimaki, M.; Kumar, P. K. R., Signal changes for dye-complexed biomolecular interactions on waveguide-sensor chips. *Sensors and Actuators, B: Chemical* **2011**, *155* (1), 239-244.
 93. Lee, B., Review of the present status of optical fiber sensors. *Optical Fiber Technology* **2003**, *9* (2), 57-79.
 94. Elosua, C.; Matias, I. R.; Bariain, C.; Arregui, F. J., Volatile organic compound optical fiber sensors: A review. *Sensors* **2006**, *6* (11), 1440-1465.
 95. McGuinness, C. D.; Sagoo, K.; McLoskey, D.; Birch, D. J. S., A new sub-nanosecond LED at 280 nm: application to protein fluorescence. *Measurement Science & Technology* **2004**, *15* (11), L19-L22.
 96. Wolfbeis, O. S., *Fiber optic chemical sensors and biosensors*. CRC Press: Boca Raton, FL., **1991**; Vol. 1.

97. Marazuela Lamata, M. D. Tesis Doctoral: *Diseño, caracterización y aplicación analítica de (bio)sensores de fibra óptica para la determinación de CO₂, O₂ y metabolitos de interés clínico*. Universidad Complutense de Madrid, Madrid, **1997**.
98. Kocincova, A. S.; Borisov, S. M.; Krause, C.; Wolfbeis, O. S., Fiber-optic microsensors for simultaneous sensing of oxygen and pH, and of oxygen and temperature. *Analytical Chemistry* **2007**, 79 (22), 8486-8493.
99. Pasic, A.; Koehler, H.; Klimant, I.; Schaupp, L., Miniaturized fiber-optic hybrid sensor for continuous glucose monitoring in subcutaneous tissue. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2007**, 122 (1), 60-68.
100. Bhatia, P.; Gupta, B. D., Fabrication and characterization of a surface plasmon resonance based fiber optic urea sensor for biomedical applications. *Sensors and Actuators, B: Chemical* **2011**.
101. Mahendran, R. S.; Wang, L.; Machavaram, V. R.; Pandita, S. D.; Chen, R.; Kukureka, S. N.; Fernando, G. F., Fiber-optic sensor design for chemical process and environmental monitoring. *Optics and Lasers in Engineering* **2009**, 47 (10), 1069-1076.
102. Filik, H.; Aksu, D.; Apak, R.; Sener, A.; Kiliç, E., An optical fibre reflectance sensor for p-aminophenol determination based on tetrahydroxycalix[4]arene as sensing reagent. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2009**, 136 (1), 105-112.
103. Rajan; Chand, S.; Gupta, B. D., Surface plasmon resonance based fiber-optic sensor for the detection of pesticide. *Sensors and Actuators, B: Chemical* **2007**, 123 (2), 661-666.

-
104. Peña-Vazquez, E.; Maneiro, E.; Perez-Conde, C.; Moreno-Bondi, M. C.; Costas, E., Microalgae fiber optic biosensors for herbicide monitoring using sol-gel technology. *Biosensors & Bioelectronics* **2009**, *24* (12), 3538-3543.
 105. Matias, F. A. A.; Tubino, M., A portable fiber-optic chemical device for the quantitative determination of carbon monoxide from automobile exhaust emissions. *Journal of the Air and Waste Management Association* **2001**, *51* (7), 962-965.
 106. Consales, M.; Buosciolo, A.; Cutolo, A.; Breglio, G.; Irace, A.; Buontempo, S.; Petagna, P.; Giordano, M.; Cusano, A., Fiber optic humidity sensors for high-energy physics applications at CERN. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2011**, *159* (1), 66-74.
 107. Mulrooney, J.; Clifford, J.; Fitzpatrick, C.; Chambers, P.; Lewis, E., Monitoring of carbon dioxide exhaust emissions using mid-infrared spectroscopy. *Journal of Optics A: Pure and Applied Optics* **2007**, *9* (6), S87-S91.
 108. Fernandez-Sanchez, J. F.; Carretero, A. S.; Cruces-Blanco, C.; Fernandez-Gutierrez, A., Highly sensitive and selective fluorescence optosensor to detect and quantify benzo[a]pyrene in water samples. *Analytica Chimica Acta* **2004**, *506* (1), 1-7.
 109. Casado-Terrones, S.; Fernandez-Sanchez, J. F.; Segura-Carretero, A.; Fernandez-Gutierrez, A., The development and comparison of a fluorescence and a phosphorescence optosensors for determining the plant growth regulator 2-naphthoxyacetic acid. *Sensors and Actuators B-Chemical* **2005**, *107* (2), 929-935.

110. Borisov, S. M.; Klimant, I., Ultrabright oxygen optodes based on cyclometalated iridium(III) coumarin complexes. *Analytical Chemistry* **2007**, *79* (19), 7501-7509.
111. Boldov, I. A.; Kuch'yanov, A. S.; Plekhanov, A. I.; Orlova, N. A.; Kargapolova, I. Y.; Shelkovnikov, V. V., Fiber-optic chemical sensor of amine-type compounds. *Physics of the Solid State* **2011**, *53* (6), 1152-1154.
112. Andrzejewski, D.; Klimant, I.; Podbielska, H., Method for lifetime-based chemical sensing using the demodulation of the luminescence signal. *Sensors and Actuators, B: Chemical* **2002**, *84* (2-3), 160-166.
113. Valledor, M.; Campo, J. C.; Sanchez-Barragan, I.; Costa-Fernandez, J. M.; Alvarez, J. C.; Sanz-Medel, A., Determination of phosphorescence lifetimes in the presence of high background signals using phase-shift measurements. *Sensors and Actuators, B: Chemical* **2006**, *113* (1), 249-258.
114. Skoog, D. A.; West, D. M.; Holler, F. J., *Quimica Analitica*. 6^a ed.; McGraw-Hill: **1995**.
115. Skoog, D. A.; Leary, J. J., *Analisis Instrumental*. 4^a ed.; Mc-Graw-Hill: **1998**.
116. Elosua, C.; Bariain, C.; Matias, I. R.; Rodriguez, A.; Colacio, E.; Salinas-Castillo, A.; Segura-Carretero, A.; Fernandez-Gutierrez, A., Pyridine vapors detection by an optical fibre sensor. *Sensors* **2008**, *8* (2), 847-859.
117. Medina Castillo, A. L. Tesis Doctoral: *Nuevas estrategias para la sintesis y caracterizacion de fases sensoras opticas nanoestructuradas*. Universidad de Granada, Granada, **2011**.

-
118. Valero Navarro, A. Tesis Doctoral: *Materiales nanoestructurados de ultima generacion para la deteccion optica y el reconocimiento selectivo de moleculas de interes biologico y ambiental*. Universidad de Granada, Granada, **2011**.
119. Staudinger, H.; Bruson, H. A., High polymer compounds. *Justus Liebigs Annalen Der Chemie* **1926**, *447*, 97-110.
120. Mie, G.; Hengstenberg, J.; Staudinger, H.; Johner, H.; Luthy, M.; Signer, R., The polymer formaldehyde, an exemplar of cellulose. *Naturwissenschaften* **1927**, *15*, 379-380.
121. Flory, P. J., *Principles of polymer chemistry*. 5 ed.; Cornell University Press: Ithaca N., **1992**.
122. Odian, G., *Principles of polymerization*. Ed. Wiley-Interscience: New Jersey, **2004**.
123. Areizaga, J.; Milagros Cortazar, M.; Elorza, J. M.; Iruin, J. J., *Polimeros*. Editorial Sintesis: Madrid, **2002**.
124. Sierra Cortes, J. F. Tesis Doctoral: *Posibilidades analiticas de la fluorescencia molecular intrinseca y extrinseca de las enzimas para la determinacion de alcoholes, glucosa y colesterol. Desarrollo de biosensores opticos*. Universidad de Zaragoza, Zaragoza, **1999**.
125. Min, K.; Gao, H. F.; Matyjaszewski, K., Preparation of homopolymers and block copolymers in miniemulsion by ATRP using activators generated by electron transfer (AGET). *Journal of the American Chemical Society* **2005**, *127* (11), 3825-3830.

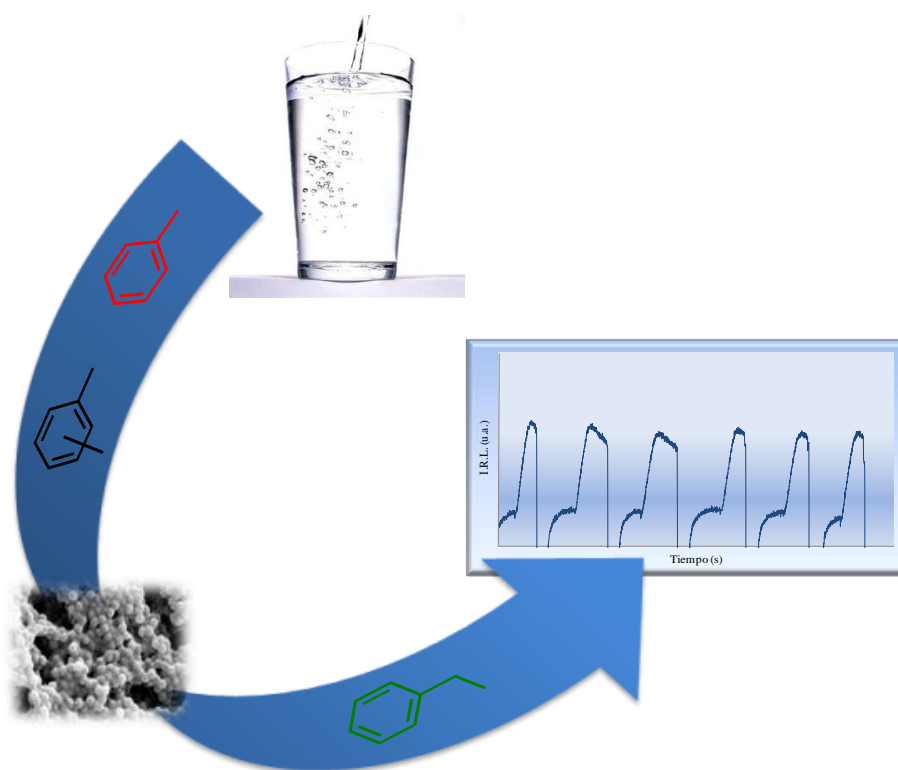
126. Hagiopol, C., *Copolymerization. Towards a systematic approach*. Kluwer Academic, Plenum Publishers: New York, **1999**.
127. Henry, O. Y. F.; Cullen, D. C.; Piletsky, S. A., Optical interrogation of molecularly imprinted polymers and development of MIP sensors: A review. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2005**, 382 (4), 947-956.
128. Valero-Navarro, A.; Damiani, P. C.; Fernandez-Sanchez, J. F.; Segura-Carretero, A.; Fernandez-Gutierrez, A., Chemometric-assisted MIP-optosensing system for the simultaneous determination of monoamine naphthalenes in drinking waters. *Talanta* **2009**, 78 (1), 57-65.
129. Wandelt, B.; Turkewitsch, P.; Wysocki, S.; Darling, G. D., Fluorescent molecularly imprinted polymer studied by time-resolved fluorescence spectroscopy. *Polymer* **2002**, 43 (9), 2777-2785.
130. Kubo, H.; Nariai, H.; Takeuchi, T., Multiple hydrogen bonding-based fluorescent imprinted polymers for cyclobarbital prepared with 2,6-bis(acrylamido)pyridine. *Chemical Communications* **2003**, 22, 2792-2793.
131. Chen, Y. C.; Barzier, J. J.; Yan, M. D.; Prah, S. A., Evaluation of molecularly imprinted polyurethane as an optical waveguide for PAH sensing. In *Nanosensing: Materials and Devices*. Islam, M. S.; Dutta, A. K., Eds. Spie-Int Soc Optical Engineering **2004**, Vol. 5593, pp 513-520.
132. Polyakov, M. V., Adsorption properties and structure of silica gel. *Zhur. Fiz. Khim.* **1931**, 2, 799.
133. Dickey, F., The preparation of specific adsorbents. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1949**, 35, 227-229.

-
134. Wulff, G.; Sarhan, A., Use of polymers with enzyme-analogous structures for resolution of racemates. *Angewandte Chemie-International Edition* **1972**, *11* (4), 341-&.
 135. Takagishi, T.; Klotz, I. M., Macromolecule-small molecule interactions; introduction of additional binding sites in polyethyleneimine by disulfide cross-linkages. *Biopolymers* **1972**, *11* (2), 483-491.
 136. Arshady, R.; Mosbach, K., Synthesis of substrate-selective polymers by host-guest polymerization. *Macromolecular Chemistry and Physics* **1981**, *182*, 687-692.
 137. Kozuka, H.; Takagishi, T.; Kuroki, N., Dependence of the extent of binding of methyl-orange on the concentration of macromolecules. *Journal of Polymer Science Part C-Polymer Letters* **1984**, *22* (6), 357-364.
 138. Andersson, L.; Sellergren, B.; Mosbach, K., Imprinting of amino acid derivatives in macroporous polymers. *Tetrahedron Letters* **1984**, *25* (45), 5211-5214.
 139. Vlatakis, G.; Andersson, L. I.; Muller, R.; Mosbach, K., Drug assay using antibody mimics made by molecular imprinting. *Nature* **1993**, *361* (6413), 645-647.
 140. Haupt, K., Imprinted polymers-Tailor-made mimics of antibodies and receptors. *Chemical Communications* **2003**, (2), 171-178.
 141. Svenson, J.; Nicholls, I. A., On the thermal and chemical stability of molecularly imprinted polymers. *Analytica Chimica Acta* **2001**, *435* (1), 19-24.

142. Garcia-Calzon, J. A.; Diaz-Garcia, M. E., Characterization of binding sites in molecularly imprinted polymers. *Sensors and Actuators B-Chemical* **2007**, *123*, 1180-1194.
143. Elaissari, A. H., *Colloidal Polymers, Synthesis and Characterization*. New York, **2003**.
144. Sulitzky, C.; Ruckert, B.; Hall, A. J.; Lanza, F.; Unger, K.; Sellergren, B., Grafting of molecularly imprinted polymer films on silica supports containing surface-bound free radical initiators. *Macromolecules* **2002**, *35* (1), 79-91.
145. Sellergren, B.; Ruckert, B.; Hall, A., Layer-by-layer grafting of molecularly imprinted polymers via iniferter modified supports. *Advanced Materials* **2002**, *14* (19), 1335-1335.
146. Titirici, M. M.; Sellergren, B., Thin molecularly imprinted polymer films via reversible addition-fragmentation chain transfer polymerization. *Chemistry of Materials* **2006**, *18* (7), 1773-1779.
147. Titirici, M. M.; Hall, A. J.; Sellergren, B., Hierarchical imprinting using crude solid phase peptide synthesis products as templates. *Chemistry of Materials* **2003**, *15* (4), 822-824.
148. Titirici, M. M.; Sellergren, B., Peptide recognition via hierarchical imprinting. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2004**, *378* (8), 1913-1921.
149. Kolle, C.; Gruber, W.; Trettnak, W.; Biebernik, K.; Dolezal, C.; Reininger, F.; O'Leary, P., Fast optochemical sensor for continuous monitoring of oxygen in breath-gas analysis. *Sensors and Actuators B-Chemical* **1997**, *38* (1-3), 141-149.
150. Parker, C., *Photoluminescence of Solutions*. Elsevier: Amsterdam, **1968**.

151. Love, L. J. C.; Grayeski, M. L.; Noroski, J.; Weinberger, R., Room-temperature phosphorescence, sensitized phosphorescence and fluorescence of light and illicit drugs enhanced by organized media. *Analytica Chimica Acta* **1985**, *170* (1), 3-12.
152. Hench, L. L.; West, J. K., The sol-gel process. *Chemical Reviews* **1990**, *90* (1), 33-72.
153. Livage, J.; Sanchez, C., Sol-gel chemistry. *Journal of Non-Crystalline Solids* **1992**, *145* (1-3), 11-19.
154. Salinas Castillo, A. Tesis Doctoral: *Nuevas fronteras metodologicas de la fosforescencia a temperatura ambiente. Fosforescencia inducida por atomos pesados y optosensores*. Universidad de Granada, Granada, **2005**.
155. Wright, J. D.; Sommerdijk, N. A., *Sol-gel Materials: Chemistry and Application*. CRC Press: Boca Raton: **2000**.
156. Lippitsch, M. E.; Draxler, S.; Kieslinger, D., Luminescence lifetime-based sensing: New materials, new devices. *Sensors and Actuators B-Chemical* **1997**, *38* (1-3), 96-102.
157. Elosua Aguado, C. Tesis Doctoral: *Contribution to the development of optical fibre sensors to detect volatile organic compounds and their potential application in opto-electronic noses*. Universidad Publica de Navarra, Pamplona, **2010**.

IV. EXPERIMENTAL



BLOQUE I

**DISEÑO Y SÍNTESIS DE UN POLÍMERO DE IMPRONTA
MOLECULAR PARA LA DETECCIÓN DE TEXs Y XILENOS
EN AGUA POTABLE**

IV.BI. DISEÑO Y SÍNTESIS DE UN MIP PARA LA DETECCIÓN DE TEXs Y XILENOS EN AGUA POTABLE

IV.BI.1. Generalidades de TEXs

El acrónimo **TEXs** define *la mezcla formada por tolueno, etilbenceno y los tres isómeros (o, m, p) de xileno*. En la Figura 26 se representa la estructura química de los TEXs. Todos ellos son **compuestos orgánicos volátiles** (VOCs) y forman parte de la familia de compuestos monoaromáticos. Poseen propiedades fluorescentes (aunque con bajos rendimientos cuánticos) y presentan una escasa solubilidad y una elevada velocidad de difusión en agua.

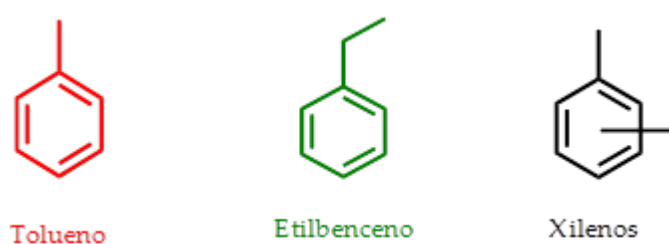


Fig. 26. Estructura química de compuestos TEXs.

Estos compuestos se usan ampliamente como disolventes y materias prima en muchas industrias¹, y están presentes en muchos derivados del petróleo². Debido a sus características químicas, polaridad y solubilidad, causan serios problemas de contaminación. Las principales fuentes de contaminación del agua por TEXs se producen por vertidos o escapes de petróleo y derivados en los pozos de producción, refinerías, tuberías, depósitos de almacenamiento y estaciones de servicio.

Los TEXs son contaminantes que pueden introducirse en los seres humanos a través de diferentes vías como ingestión, inhalación o absorción. La exposición a estos compuestos puede ser muy perjudicial para la salud humana³. Aunque el tolueno y etilbenceno no son considerados carcinogénicos, provocan daños en el hígado, los riñones y en el sistema nervioso central durante exposiciones prolongadas de los mismos. Los xilenos no son considerados tan perjudiciales como los anteriores, pero también afectan a los mismos órganos del cuerpo humano.

En nuestro país no existe ninguna legislación vigente sobre los valores máximos de estos contaminantes en agua. Sin embargo, la Agencia de Protección Medioambiental estadounidense (US EPA) ha establecido los **niveles de contaminante máximo** (MCL) para esta familia de compuestos⁴. La Tabla 1 muestra el nivel de contaminante máximo de cada compuesto en agua potable.

Tabla 1. MCLs de TEXs en agua potable.

| Compuesto | MCL* |
|-----------------|-----------|
| Tolueno | 1.0 mg/L |
| Etilbenceno | 0.7 mg/L |
| Xilenos (total) | 10.0 mg/L |

* Valores establecidos por la US EPA.

IV.BI.2. Test de screening. Generalidades y características

Un **test de "screening"**⁵ se define como "aquél que es capaz de llevar a cabo la selección de aquellas muestras cuyo contenido es similar o mayor que uno previamente establecido como nivel de corte". Por lo tanto, sólo sobre aquellas muestras que probablemente estén contaminadas será necesario llevar a cabo un análisis más

exhaustivo, utilizando para ello una técnica analítica convencional, lo que permitirá así obtener una información analítica más exacta⁶. Un esquema de funcionamiento de los test de “screening” se muestra en la Figura 27.

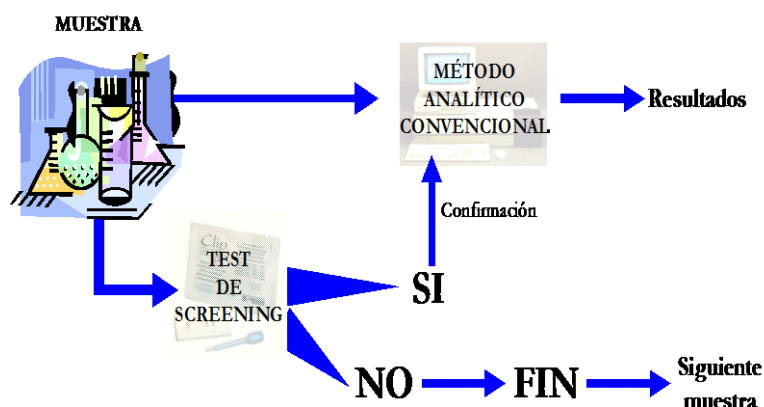


Fig. 27. Esquema de funcionamiento de los test de “screening”.

Entre las ventajas de los test de “screening” cabe destacar su rapidez, simplicidad, minimización de errores debido a tratamientos previos de la muestra y, muy importante, el ahorro de tiempo y dinero⁷; pues solamente las muestras que proporcionen una respuesta positiva al test necesitarán ser confirmadas con otra técnica más sofisticada, eliminándose todas aquellas que den respuestas negativas al test.

Realmente, no existen diferencias significativas entre “análisis” y “test de screening”, pero se pueden detallar algunas características relevantes que diferencian un test de un análisis convencional (véase Figura 28). Si todos los test no cumplen todas las características, al menos deben cumplir tres o más de ellas⁶.

Una de las características más relevantes de los test es el tipo de **respuesta binaria**, esto es SÍ/NO, asociado a los mismos⁸. De este tipo de respuesta se debe

resaltar su carácter cualitativo. No obstante, puede considerarse que en algunos procesos también proporcionan cierto carácter cuantitativo, pero, al igual que en las respuestas proporcionadas por los métodos convencionales, estas respuestas SÍ/NO también se encuentran sometidas a errores.

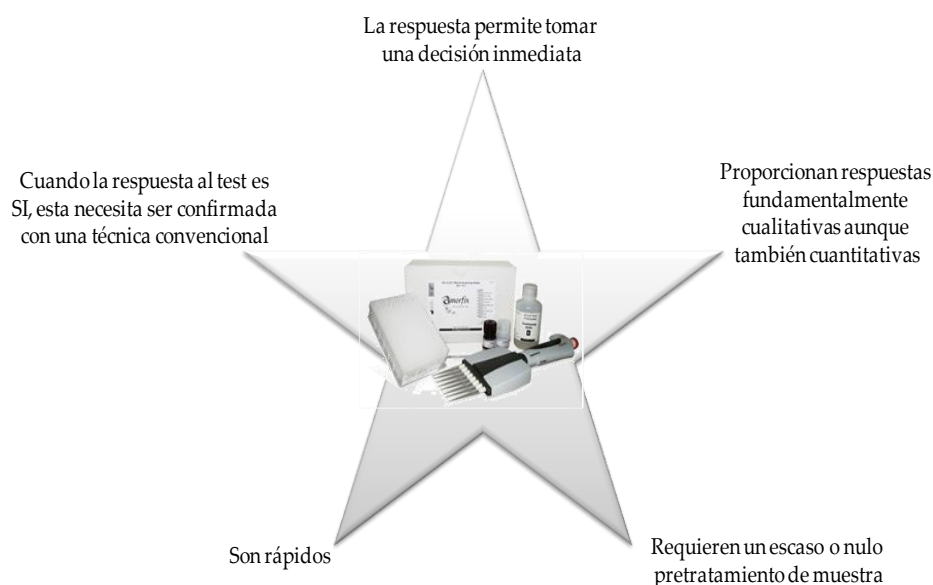


Fig. 28. Características más relevantes de los test de “screening”.

Un elemento importante en los test de “screening” es el denominado **“nivel de corte”**. Este nivel establece el valor de la concentración de analito a partir de la cual el test clasifica las muestras en positivas o negativas. Generalmente, este valor del nivel de corte se corresponde con el valor establecido por la legislación vigente en lo que se refiere a compuestos tóxicos para la salud humana. De este modo, el **“valor umbral”** corresponde al valor de la señal analítica obtenida con el nivel de corte establecido para dicho analito. Por lo tanto, muestras con valores de señal analítica superiores al valor umbral serán consideradas como contaminadas, y sin embargo, muestras con valores de señal analítica inferiores al valor umbral serán seleccionadas como no contaminadas.

Existen varios parámetros de calidad para establecer la fiabilidad de un test de “screening”. Uno de los parámetros de calidad más utilizados y populares en Química Analítica es el porcentaje de falsos positivos y falsos negativos⁹. Así, se puede establecer que:

- **Falsos negativos:** Se producen cuando el resultado del test es NO pero debería ser SÍ, es decir, un falso negativo corresponde a una muestra con una concentración de analito superior al nivel de corte y que proporciona una respuesta negativa.
- **Falsos positivos:** Se producen cuando el resultado del test es SÍ pero debería ser NO, es decir, un falso positivo corresponde a una muestra con una concentración de analito inferior al nivel de corte y que proporciona una respuesta positiva.

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

IV.BI.3. MIPs y compuestos orgánicos volátiles (TEXs)

De todas las estrategias posibles para la extracción selectiva de contaminantes, los polímeros de impronta molecular (MIPs) son los que mejores resultados han mostrado (véase apartado III.5.1).

Es bien sabido que el proceso de impronta se lleva a cabo, en primer lugar, mediante la formación de complejos de prepolimerización por interacciones no covalentes (puente de hidrógeno, interacciones ácido-base o fuerzas de Van der Waals) entre la molécula molde y los monómeros funcionales. Posteriormente, se inicia la polimerización que suele realizarse a baja temperatura y en sistemas cerrados con la finalidad de minimizar los fenómenos altamente dinámicos, tales como elevada agitación térmica y elevada velocidad de evaporación del disolvente. Finalizada la polimerización, la liberación de la molécula molde permite la obtención de un material nanoestructurado, con “memoria” selectiva para éste.

El mecanismo de formación de huecos selectivos en un MIP está ampliamente estudiado para moléculas que poseen grupos capaces de interactuar por puente de hidrógeno o por reacción ácido-base con los monómeros funcionales. Estas moléculas poseen tamaños mayores que los monómeros funcionales y son estructuras compactas y rígidas. Además, estas moléculas son sólidas y poseen bajas presiones de vapor a temperatura ambiente.

Existen moléculas, que debido a sus propiedades físico-químicas, pueden hacer que la síntesis de un MIP por el proceso convencional descrito anteriormente sea inviable. Por ejemplo, los compuestos orgánicos volátiles, como son los de la familia TEXs, que son moléculas muy pequeñas y de tamaño similar a los monómeros usados, son líquidas, tienen elevadas presiones de vapor y no poseen grupos funcionales. Estos hechos hacen que no se pueda producir la impronta molecular por el proceso de formación de un complejo de prepolimerización en las condiciones convencionalmente empleadas. En estos casos, la selectividad en el material puede ser introducida, contrariamente al caso anterior, mediante el control de la porosidad usando condiciones altamente dinámicas, como son: temperaturas más elevadas y velocidades de evaporación también más elevadas y controladas.

Una metodología que permite controlar la porosidad de los materiales de forma relativamente sencilla y en condiciones altamente dinámicas es la técnica de **polimerización en disolución**, utilizando mezclas adecuadas de disolventes que den lugar a la obtención de polímeros entrecruzados, homogéneos y transparentes (véase apartado III.5.1.4.2). En estos casos, el control de la porosidad del material se puede realizar durante el proceso de gelificación empleando una mezcla de disolventes donde uno de ellos sea la molécula “molde”. Así, paralelamente a la polimerización, se va controlando la evaporación de los disolventes mediante el control de la temperatura y, si es necesario, mediante la utilización de un flujo controlado de un gas inerte. Esto proporciona una estructura porosa donde el tamaño de poro es de dimensiones similares a la molécula molde, obteniéndose materiales con una porosidad selectiva “MIPs” a moléculas orgánicas volátiles.

Los inconvenientes que presenta la síntesis de MIPs para compuestos orgánicos volátiles han sido parcialmente solventados mediante el empleo de un **modelo semi-empírico** propuesto por nuestro Grupo de Investigación¹⁰. Este modelo está basado en los **parámetros de solubilidad de Hansen** y permite simplificar la síntesis de polímeros entrecruzados homogéneos y transparentes para su uso como fases sensoras ópticas, transformándola de esta manera en un proceso rutinario. El modelo propuesto puede ayudar a la síntesis y optimización (porcentaje de entrecruzador, cambios en hidrofiliidad, selección de porógenos, cantidad de molécula molde, etc.) de MIPs y NIPs homogéneos y transparentes con VOCs.

El modelo determina las zonas de homogeneidad (donde se produce la polimerización en disolución) y de heterogeneidad (donde se lleva a cabo la polimerización por precipitación) de sistemas ternarios, que están formados por la molécula molde y dos porógenos. La polimerización en disolución proporciona polímeros homogéneos y transparentes, mientras que la polimerización por

precipitación produce polímeros heterogéneos. Por tanto, en las zonas de homogeneidad se obtienen polímeros homogéneos y transparentes, y en las zonas de heterogeneidad se generan polímeros heterogéneos. En la Figura 29 se muestran las zonas de homogeneidad y heterogeneidad de un sistema ternario formado por tolueno- CCl_4 -metanol, donde x_a es la fracción molar de tolueno, x_b es la fracción molar de CCl_4 y x_c es la fracción molar de metanol.

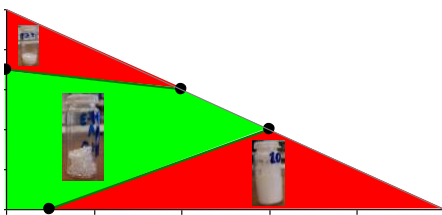


Fig. 29. Determinación de las zonas de homogeneidad (verde) y de heterogeneidad (rojo) de un sistema ternario formado por tolueno- CCl_4 -metanol para un polímero (80% MMA-20% EGDMA).

En esta memoria, se ha usado este modelo para la síntesis de polímeros de impronta molecular homogéneos y transparentes, que se puedan utilizar como fases sensoras ópticas.

La síntesis de los polímeros se llevó a cabo con los monómeros **metilmetacrilato** (MMA) e **hidroxietilmetacrilato** (HEMA), y como entrecruzador se utilizó **etilenglicoldimetacrilato** (EGDMA). La selección de este sistema se realizó en base a cuatro hipótesis:

- A diferencia de las matrices poliméricas que poseen anillos aromáticos, por ejemplo divinilbenceno-co-estireno (DVB-co-ES), las matrices poliméricas

sintetizadas con estos monómeros no presentan longitudes de onda de absorción o emisión, que puedan interferir con las longitudes de onda de los TEXs.

- El copolímero MMA-co-EGDMA es hidrofóbico (al igual que los TEXs).
- Pequeños porcentajes de HEMA en los copolímeros podrían mejorar la penetrabilidad del agua en los mismos.
- La modelización teórica de la copolimerización de estos sistemas prevé la obtención de copolímeros estadísticos y homogéneos durante toda la conversión.

IV.BI.4. *Bibliografía del bloque I*

1. Nollet, L. M. L., *Handbook of Water Analysis*. Ch. 33. Marcel Dekker: New York, **2001**.
2. Alberici, R. M.; Zampronio, C. G.; Poppi, R. J.; Eberlin, M. N., Water solubilization of ethanol and BTEX from gasoline: On-line monitoring by membrane introduction mass spectrometry. *Analyst* **2002**, *127* (2), 230-234.
3. Chiou, C. T.; Schmedding, D. W.; Manes, M., Partitioning of organic-compound in octanol-water systems. *Environmental Science & Technology* **1982**, *16* (1), 4-10.
4. US EPA, EPA 816-F-09-0004, May **2009**. List of Contaminants & their MCLs. <http://water.epa.gov/drink/contaminants/index.cfm>.

5. Valcarcel, M.; Cardenas, S.; Gallego, M., Sample screening systems in analytical chemistry. *Trac-Trends in Analytical Chemistry* **1999**, *18* (11), 685-694.
6. San Vicente de la Riva, B. Tesis Doctoral: *Metodologias luminiscentes para la determinacion de metales toxicos en muestras de interes medioambiental*. Universidad de Oviedo, Oviedo, **2001**.
7. San Vicente de la Riva, B.; Costa-Fernandez, J. M.; Pereiro, R.; Sanz-Medel, A., Spectrafluorimetric method for the rapid screening of toxic heavy metals in water samples. *Analytica Chimica Acta* **2002**, *451* (2), 203-210.
8. Valero Navarro, A. Tesis Doctoral: *Materiales nanoestructurados de ultima generacion para la deteccion optica y el reconocimiento selectivo de molculas de interes biologico y ambiental*. Universidad de Granada, Granada, **2011**.
9. Valero-Navarro, A.; Fernandez-Sanchez, J. F.; Medina-Castillo, A. L.; Fernandez-Ibanez, F.; Segura-Carretero, A.; Ibanez, J. M.; Fernandez-Gutierrez, A., A rapid, sensitive screening test for polycyclic aromatic hydrocarbons applied to Antarctic water. *Chemosphere* **2007**, *67* (5), 903-910.
10. Medina Castillo, A. L.; Fernandez Sanchez, J. F.; Segura Carretero, A.; Fernandez Gutierrez, A., A semi-empirical model to simplify the synthesis of homogeneous cross-linked polymers and their application in the preparation of optical sensing films. *Biosensors & Bioelectronics* **2009**, *25* (2), 442-449.

IV.BI.5. *Objetivos del bloque I*

Los objetivos principales de este bloque experimental son:

1. Diseñar y sintetizar, mediante la técnica de polimerización en disolución, un MIP que permita la detección fluorescente de TEXs en aguas de consumo humano. Todos los parámetros que puedan afectar a la sensibilidad y selectividad del polímero serán optimizados. Se evaluarán las propiedades de reconocimiento del MIP sintetizado. Tras la implementación del MIP como fase sensora en un optosensor convencional, se aplicará para el “screening” de TEXs en aguas de consumo humano.
2. Desarrollar un test de “screening” para la detección de xilenos en muestras de agua, a partir del MIP de “screening” sintetizado en el capítulo anterior. Del mismo modo, el MIP será implementado como fase sensora en el optosensor desarrollado, siendo necesario modificar tanto los parámetros del sistema FIA como los instrumentales, con el fin de evitar las posibles interferencias de los otros compuestos de la familia TEXs. Con el optosensor propuesto, se desarrollará un test de “screening” para detectar xilenos en muestras de agua.

IV.BI.6. *Capítulos del bloque I*

En este bloque experimental se han llevado a cabo los trabajos que se resumen en los siguientes capítulos:

- Capítulo 1:** Synthesis and characterization of a molecularly imprinted polymer optosensor for TEXs-screening in drinking water. *Biosensors and Bioelectronics* 2011, 26 (7), 3331-3338.

Capítulo 2: The development of a screening molecularly imprinted polymer optosensor for detecting xylenes in water samples. *Microchemical Journal* 2011, 99 (2), 278-282.

IV.BI.7. Capítulo 1: *Synthesis and characterization of a molecularly imprinted polymer optosensor for TEXs-screening in drinking water*

Synthesis and characterization of a molecularly imprinted polymer optosensor for TEX-screening in drinking water

F.J. Sainz-Gonzalo*, A.L. Medina-Castillo, J.F. Fernández-Sánchez*, A. Fernández-Gutiérrez

Department of Analytical Chemistry, Faculty of Sciences, University of Granada, Av. Fuentenueva s/n, 18071 Granada, Spain. www.ugr.es/local/fqm297

Abstract

A molecularly imprinted polymer (MIP) was synthesized using toluene as template, and was implemented in a fluorescence optosensor ($\lambda_{\text{exc}} = 260 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 284 \text{ nm}$) for the screening of TEXs in drinking water. All the parameters which can affect the sensitivity and selectivity of the optical sensing phase, such as synthesis conditions, template removal, FIA parameters, instrumental conditions, and chemical parameters of the sensing system, were carefully optimized. The screening test runs without the need for any pre-concentration step, thus rendering it suitable for routine use in water-quality-control laboratories. The test recognizes contaminated samples rapidly (81s) and inexpensively with a cut-off level of $700 \mu\text{g L}^{-1}$ ethylbenzene which corresponds with the maximum contaminant level (MCL) established by US Environmental Protection Agency (EPA) in drinking water. The threshold value of the screening test was $8.27 \pm 0.57 \text{ a.u.}$ (95% confidence level, $n = 10$). The reliability of the screening test was 32% false positives and 0% false negatives for 50 samples, and its applicability has been demonstrated by analyzing 15 samples of mineral, tap and river waters obtaining 0% false negatives.

Keywords: Molecular imprinting; Fluorescence optosensor; TEXs; Flow analysis; Screening test; Water analysis

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

E-mail address: franjaviersainz@ugr.es (F.J. Sainz-Gonzalo), jfferman@ugr.es (J.F. Fernandez-Sanchez)

1. Introduction

The acronym TEXs defines the mixture of volatile organic compounds (VOCs) which is formed by toluene, ethylbenzene and the three xylene isomers (*ortho*-, *meta*- and *para*-xylenes). These compounds are widely used as solvents and raw materials in many industries, such as printing, paint, synthetic resin and rubber (Nollet 2001). In addition, they are present in many petroleum derivatives, such as fuel oil and gasoline (Alberici et al. 2002). They are ubiquitous environmental pollutants which can be found in soil, water and air; and they penetrate in humans through ingestion, inhalation or absorption. Their effects on health could cause problems in the liver, kidneys, heart, lungs and nervous system, including neurological diseases or cancer (Chiou et al. 1982). The maximum contaminant levels (MCL) established by US Environmental Protection Agency (EPA) in drinking water are $1000 \mu\text{g L}^{-1}$ for toluene, $700 \mu\text{g L}^{-1}$ for ethylbenzene and $10000 \mu\text{g L}^{-1}$ for xylenes (sum of the three isomers). Therefore, for public health reasons, it is necessary the monitoring of these contaminants in drinking water.

TEXs have been analyzed by gas chromatography-flame ionization detection (GC-FID) or gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS), using conventional techniques of solid-phase extraction and liquid-liquid extraction (Beketov et al. 1996). Recently, novel techniques of extraction and concentration, which do not use large volumes of solvents such as purge-and-trap (PT) (Bianchi et al. 2002; Rosell et al. 2003), membrane extraction (Hauser and Popp 2001), solid-phase microextraction (SPME) (Florez Menendez et al. 2000; Prikryl et al. 2006), single-drop microextraction (SDME) (Aguilera-Herrador et al. 2008; Sarafraz-Yazdi et al. 2009), liquid-phase microextraction (LPME) (Sarafraz-Yazdi et al. 2008; Wang et al. 2006) and headspace solid-phase microextraction (HS SPME) (Almeida and Boas 2004; Arambarri et al. 2004; Florez Menendez et al. 2000; Ji et al. 2006; Lee et al. 2007; Menendez et al. 2000; Prikryl et al. 2006), have been developed for the analysis of TEXs in water samples.

These methods require long analysis times and quite expensive instrumentation. Chemical sensors have been developed in order to minimize these disadvantages, as well as to simplify the analytical procedure (Tsow et al. 2009). The combination of flow-injection system with detection on optically active surfaces packed in a flow-through cell (called optosensor) has proved to offer important advantages (Fernandez-Sanchez et al. 2003a, 2004; Fernandez-Sanchez et al. 2003b) due to its high sensitivity, precision, simplicity, speed and low cost. In

addition, the use of molecularly imprinted polymers (MIPs) as optically active surfaces has proved to provide highly selective molecular recognition properties and some excellent physical-chemical and mechanical properties in terms of robustness and stability (Alizadeh et al. 2009; Dickert et al. 1999; Liu et al. 2010; Medina-Castillo et al. 2010; Sanchez-Barragan et al. 2005; Tsow et al. 2009; Valero-Navarro et al. 2009a; Valero-Navarro et al. 2009b).

Anyway, the use of MIPs as optical sensing materials is not simple at all. The main disadvantage of these matrices compared to other state-of-the-art sensing layers includes difficulties in their synthesis because the crosslinked gels must be homogeneous and transparent. In addition, the imprinting of small molecules as volatile compounds is even more tedious because VOCs change the medium in which the MIP is synthesized compared to a reference non-imprinted polymer (NIP) or alter the solubility of the medium in which polymerization is going to take place (Medina-Castillo et al. 2009). For these reasons VOCs had not been used very frequently as templates and, for our knowledge, it is not possible to find any toluene imprinted polymer in the literature. These inconveniences have been partially solved by Medina-Castillo et al (Medina-Castillo et al. 2009). They have proposed a simple, semi-empirical model based on Hansen's solubility parameters to simplify the synthesis and the optimization of homogeneous and transparent VOC-imprinted polymers for use in optical measurement systems and transforms it into a routine process.

On the other hand, it is not always essential, however, to be aware of the exact quantity of pollutants in the sample, their presence alone being sufficient to contribute to a better knowledge of the environment (Lima et al. 2004). This also simplifies the process, reduces costs and shortens the time of analysis (San Vicente de la Riva et al. 2002). Methods that provide a binary yes/no response, which indicate if the target analytes are present above or below a pre-set concentration, are known as screening tests. Their potential in analytical chemistry has been pointed out by Valcárcel *et al.* (Valcárcel et al. 1999).

Bearing in mind that in routine analysis a large number of the samples may not be polluted, rapid analytical methods such as screening tests are of increasing interest (Valero-Navarro et al. 2007). They can be described as tests to select only those samples with analyte levels "similar to" or "higher than" a previously established threshold. In this way only those "probably polluted" samples must be further examined with more exact instrumental methods (San Vicente de la Riva et al. 2002).

This paper describes the use of the semiempirical model proposed by our research group for the synthesis and optimization of a toluene-imprinted polymer and its implementation in a luminescent optosensor for screening TEXs in drinking waters. Thus, the proposed optosensor combines the recognition characteristics of a MIP with the luminescent properties of TEXs, the advantages of the flow-injection procedures with fluorimetric detection on optically active surfaces, and the simplicity of the screening test. The reliability of the screening test was 32% false positives and 0% false negatives for 50 synthetic samples. The applicability was confirmed by analyzing mineral, tap and river water samples obtaining a reliability of 0% false negatives for 15 samples.

2. Experimental

2.1. Chemicals and reagents

Methyl methacrylate (MMA), ethylene glycol dimethacrylate (EDMA), 2-hydroxyethyl methacrylate (HEMA) were purchased from Aldrich (Steinheim, Germany). 2,2'-Azobis(2-methylpropionitrile) (AIBN), ethylbenzene, *o*-xylene, *m*-xylene, *p*-xylene, and styrene were obtained from Fluka (Buchs, Switzerland). Toluene, acetonitrile, Chloroform, acetone, tetrahydrofuran, methanol, *n*-hexane and chlorobenzene were purchased from Lab-Scan (Gliwice, Poland). Benzene, 1,4-dioxane and phenol were obtained from Panreac (Barcelona, Spain). Nitrobenzene was purchased from Probus (Barcelona, Spain). Sodium chloride was obtained from Riedel-de Haën (Seelze, Germany). All chemicals and reagents were used as received without further purification.

Aqueous solutions were prepared using doubly distilled water obtained from a Milli-Q Plus 185 ultrapure water system (Millipore, UK). Stock and working standard solutions of TEXs were prepared daily and were stored in amber glass-stopper bottles at 4 °C. The working standard solutions and samples were kept in closed amber glass bottles for avoiding their evaporation during their analysis.

2.2. Instrumentation

Aminco Bowman Series 2 Luminescence Spectrometer (Sim Aminco, Madison, USA) interfaced with a computer was used to perform the fluorescent spectra and the relative

fluorescent intensity measurements. The excitation and emission spectra and the diagrams were acquired and processed using the AB2 data control and acquisition program.

Vibromatic 384 JPselecta mechanical stirrer (JPselecta, Abrera, Spain), Start Milestone microwave (Milestone S.r.l, Bergamo, Italy) and 3510 Branson Bransonic ultrasonic cleaner (Branson Ultrasonics Corporation, Danbury, USA) were used for the extraction template.

2.3. *Synthesis of molecularly imprinted polymers*

The synthesis of MIP in this work is based on the semi-empirical model proposed by Medina Castillo et al. (Medina-Castillo et al. 2009). It is based on the Hansen's solubility parameters of used monomers and solvents. It simplifies the synthesis of transparent and homogeneous cross-linked polymers which can be used for developing optical sensing films.

The optimum MIP was prepared in a closed vial by mixing MMA and EDMA (80:20 mol % for a total number of moles of 0.0123) with 13.7 mg AIBN, which was used as radical initiator, 0.783 mL of toluene (molar fraction 0.18) which was used as template molecule, and 2.717 mL of chloroform (molar fraction 0.82) which was used as porogen and solvent. After homogenization, the pre-polymerization mixture was kept in the dark at -20°C for 20 min to avoid evaporation of solvent during nitrogen purging. It was purged with nitrogen for 5 min and then sealed. Polymerization was undertaken in an 80°C oil bath heated for 5 h under a nitrogen flow of 20 mL min⁻¹ controlled with MKS mass-flow controllers. Nitrogen purging during the polymerization process has two functions: firstly to eliminate oxygen, which may react with free radicals and stop the polymerization process, and secondly to control the evaporation of the solvent, which helps polymerization as a bulk polymer (Medina-Castillo et al. 2009).

Non-imprinted polymer (NIP) for use as control was prepared and treated in the same manner, except that no template molecule was used during the polymerization stage.

The extraction of the template molecule was achieved by shaking the polymer with a mixture of 5 mL of *n*-hexane and 5 mL of acetone for 20 min.

2.4. *Optosensing set-up*

A flow injection analysis (FIA) system was used for the analytical evaluation of the polymers. Connections between the different parts of the flow assembly were made with bored poly(tetra-fluoroethylene) (PTFE) connecting tubing (0.8 mm id), and various end fittings and connectors (Omnifit, England). Electronic supporting Information (ESI, see Fig.

ESI-1) shows the optosensing manifold. A Minipuls 3 Gilson peristaltic pump (Gilson, Villiers Le Bel, France) was used for carrier delivering and flow regulation (flow-rate 1.5 mL min⁻¹). Two carrier solutions, pure water (Carrier A) and 1.0 M NaCl (Carrier B), were used; Carrier A was used for the regeneration (cleaning) of polymer with acetone (500 µL), and Carrier B was used in order to increase the selectivity of the optosensor (injection volume 2 mL). Three 5020 Rheodyne low pressure injection valves (Rheodyne, USA) were used for injecting samples (valve 1), regeneration solution (valve 2) and for selecting the carrier solution (valve 3).

For packaging the MIP, the polymer was milled, sieved (80-120 µm diameter particles) and introduced into a 176.052-QS Quartz Suprasil Hellma (Hellma GmbH & Co. KG, Müllheim, Germany) precision cell (light path: 1.5 mm x 1.5 mm, centre: 15 mm). It was placed in the sample compartment of the luminescence spectrometer.

The luminescence measurements were developed at $\lambda_{exc/em}=260/284$ nm, which correspond with the maxima excitation and emission wavelengths of TEXs, detector voltage of 700 V and 4 nm of both excitation and emission slit widths. The optosensor response was considered as the difference between the fluorescence intensity after injection and fluorescence intensity of the baseline before injection.

All experiments were carried out in triplicate to calculate the error.

2.5. Sample preparation

The pH of the sample has to be adjusted to pH=11.0 (by using 0.5 M NaOH) before injection in order to reduce the number of interferents.

For determining the reliability of the screening test, stock solutions of TEXs (50 mg L⁻¹ in milli-Q water at pH 11.0) were prepared. A total of 50 samples were utilized for establishing the reliability of the proposed screening test. The samples were prepared mixing different volumes of the stock solutions until they reached the desired concentration. Table 1 shows the composition of each sample.

For determining the applicability of the screening MIP optosensor 15 samples (bottled, tap and river waters) were analyzed. All of them were transparent, so filtration was not necessary. In addition, none of them contained TEXs thus they had to be spiked (see Table 2 for the concentration). They were treated as it was commented before: the pH was adjusted to 11.0, by using 0.5 M NaOH, before the injection.

3. Results and discussion

3.1. Synthesis of MIP

The imprinting effectiveness for a molecularly imprinted polymer is defined as the ratio of the template readsorption on an imprinted polymer (MIP) to that on a non-imprinted polymer (NIP) of the same composition. Thus, MIP/NIP ratio was the criterion used to evaluate the imprinting properties of the polymers during the optimization of the chemical parameters.

All the chemical variables which can affect to the synthesis of the MIP have been evaluated: composition of the polymeric network (kind and percentage of monomers and cross-linker), composition of the solvent/porogen media, and amount of template molecule. In addition, other two variables have also been tested: volume and temperature of the polymerization reaction.

3.1.1. Optimization of chemical variables

In order to simplify the synthesis and the optimization of the MIP, we used the semiempirical model proposed by our research group (Medina-Castillo et al. 2009), thus we followed the steps commented in this publication:

Step 1: Selection of polymer composition. MMA and HEMA were selected as monomers. HEMA was used in order to improve the permeability of the water inside the polymer and obtain a more hydrophilic polymer. EDMA was selected as cross-linker, AIBN as radical initiator and toluene as template.

Step 2: Selection of the solvents which have to be evaluated as porogens. Chloroform, tetrahydrofuran, 1,4-dioxane, acetone, acetonitrile and methanol were selected as solvents and/or porogens in order to produce adequate porosity to assure good flow-through properties, to provide suitable polarity to reduce any interference during complex formation between the imprinting molecule and the monomers, to solubilize the reagents (template molecule, initiator, monomers and cross-linker) and products (dimers, trimers, ...), and to swell the crosslinked gel in formation (Medina-Castillo et al. 2009).

Step 3: Plotting the ternary diagrams to predict the zones in which solution polymerization or precipitation polymerization is carried out. The diagrams were obtained for 80% MMA-20% EDMA polymeric systems. Fig. 1 shows the ternary diagram of this polymer in

presence of chloroform and acetonitrile. The other diagrams are showed in ESI (see Fig. ESI-2).

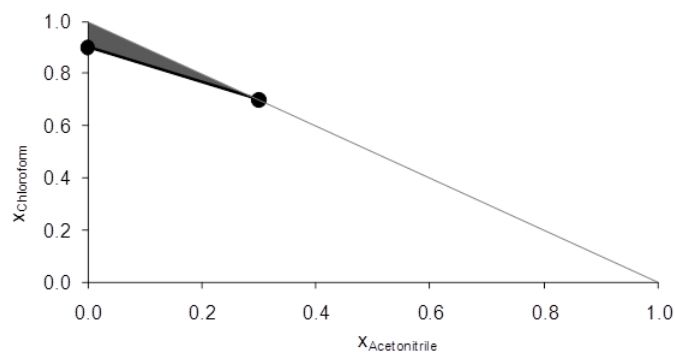


Fig. 1. Determination of the homogeneity (white) and heterogeneity (grey) zones for the polymer 80% MMA-20% EDMA taking into account the three solubility parameters when using toluene, chloroform and acetonitrile by using the model proposed by (Medina-Castillo et al. 2009).

Using this information, the programming of the optimization was quite simple. Therefore, firstly the percentage of the cross-linking was studied by varying the percentage of EDMA. 20, 25, 30, 35, 60 and 80 mol % were evaluated (see ESI, Fig. ESI-3). This study reveals that the percentage of the cross-linker does not affect the imprinting phenomena. However, lower values of cross-linker produced smaller regeneration times and simplified the template removal, thus 20% was considered for the rest of the experimental work.

The following step was the evaluation of the percentage of HEMA. Five molar percentages of HEMA were tested: 0, 6, 12, 17 and 34%. ESI shows the relation between the MIP/NIP ratio and the percentage of HEMA (see ESI, Fig. ESI-4). It shows that the addition of HEMA to the polymeric cocktail decreases considerably the MIP/NIP ratio, providing a plateau for higher percentages of HEMA. Therefore, in order to increase the selectivity of the polymeric network it should be hydrophobic. It could be due to an increase of the hydrophobic properties of MIP and NIP decreases the unspecific interaction toluene-polymer and therefore increases the imprinting factor of the MIP. Thus, only MMA was selected as monomer and the optimum composition of the polymeric network is 80% MMA-20% EDMA.

Finally, the optimum composition of the porogen/solvent mixture was also studied. According with semiempirical model, the solvents have been selected to provide an ideal

mixture, or at least as ideal as possible. In addition, the template is considered as solvent *A*, solvent *B* should have medium δ_h and δ_p values to counteract the absence of toluene in the NIP, and solvent *C* should have high δ_h and δ_p to allow the solvation of the more polar chemicals. Therefore, Chloroform, tetrahydrofuran and 1,4-dioxane have been selected as solvents *B*, and acetone, acetonitrile and methanol have been used as solvents *C*.

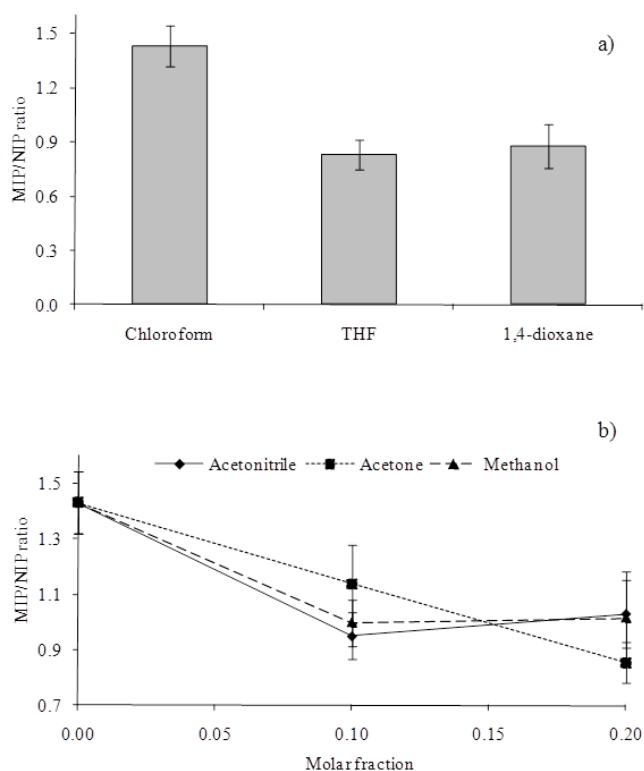


Fig. 2. Effect of the MIP/NIP ratio with a) solvent *B* (medium δ_h and δ_p values) and b) solvent *C* (high δ_h and δ_p values) [Toluene]= 500 $\mu\text{g L}^{-1}$, $\lambda_{\text{exc/em}}=260/284$ nm, excitation and emission slit widths of 4 nm, 550v detector voltage, flow-rate 1.5 mL min^{-1} and injection volume 2 mL.

Fig. 2 shows the selection of solvent media. Chloroform was the solvent *B* which produced the highest MIP/NIP ratio and an acceptable imprinting effect (see Fig. 2a). It could be due to the similarity between Hansen solubility parameters of the template and this solvent, and also to the big difference between their boiling points. Thus, chloroform was selected as solvent *B*. On the other hand, the use of a third component of the ternary system provides a considerable decrease on the imprinting factor (see Fig. 2b). Thus, it is possible to conclude that the solvent media used for synthesizing the MIP is going to be formed by two solvents: toluene (solvent *A*) which is the template and chloroform (solvent *B*) which is the porogen; MIP can be

considered as being a binary mixture of solvents: template (solvent *A*) and one porogen (solvent *B*) and the NIP as a simple mixture of one porogen (solvent *B*).

In order to establish the amount of each solvent (template and porogen), several polymers prepared with different molar fractions of toluene were tested. ESI shows that the maximum MIP/NIP ratio and therefore, the maximum imprinting effect is reached when a molar fraction of 0.18 of toluene is used; lower and higher amounts of template provide a decrease on the imprinting factor (see ESI, Fig. ESI-5). It could be explained in such a way that small molar fraction produced few specific sites and the imprinting factor was similar to 1 and that large molar fractions produced a less dense polymer, obtaining similar values of the imprinting factor. Therefore, the optimized molar fractions of toluene and chloroform were 0.18 and 0.82, respectively.

3.1.2. Optimization of total volume

Four total volumes (2.0, 3.0, 4.5 and 6.0 mL) were evaluated for pointing out its effect (see ESI, Fig. ESI-6). It is possible to conclude, on the one hand, that smaller volumes (between 2.0 and 3.0 mL) provide less transparent and less homogeneous polymers than higher volumes (i.e. between 4.5 and 6.0 mL). In addition, large regeneration times were obtained by those small volumes. On the other hand, the MIP/NIP ratios when volumes between 3.0 and 4.5 mL are used are practically constant. Therefore, an intermediate value of 3.5 mL was selected, in which an acceptable value of MIP/NIP ratio is combined with low regeneration time and good homogeneity and transparency.

3.1.3. Effect of the reaction temperature

Polymerization of the MIP was done at several temperatures: 60, 65, 70, 75, 80, 95 and 110.0 °C (see ESI, Fig. ESI-7). The MIP synthesized at temperatures lower than 75°C showed many unspecified sites (low MIP/NIP ratios) in their polymeric network. It could be due to the porogen (chloroform), which is used for MIP and NIP, is not evaporating, so it is imprinting both polymers and providing a high number of unspecific sites. However, temperatures higher than 95°C also provide low MIP/NIP ratios. It could be due to the evaporation of both, template (toluene, b.p. 110.6 °C) and solvent (chloroform, b.p. 61.2 °C). It provides the formation of few specific sites into the polymer and therefore similar signals between MIP and NIP. Furthermore, an intermediate temperature, 80°C, between the boiling points of chloroform (b.p. 61.2 °C) and toluene (b.p. 110.6 °C) should be used. At this

temperature, toluene is not evaporated and imprinted MIP, and chloroform is evaporated avoiding the imprinting of the NIP and increasing the porosity of MIP and NIP.

3.2. Template extraction

Three procedures were performed for the template extraction: mechanical stirring, microwave assisted extraction (MAE) and ultrasonic cleaning. In all of them, the polymer was treated with the same mixture of solvents (5 mL of *n*-hexane and 5 mL of acetone) and during the same time (20 min).

A shaker was used for the mechanical stirring extraction (70%), for MAE the conditions were: 70 °C, 300 w, 26% stirring and 29% Qlimit; and for ultrasonic cleaning a common ultrasonic bath at 100% power was used. For the selection of the optimum procedure, signal/noise ratio (detection limit) and signal-noise difference (sensitivity) were evaluated (see ESI, Fig. ESI-8). No significant differences were observed between the three extraction systems thus we selected mechanical stirring due to its simplicity and low cost.

3.3. Spectrofluorimetric characteristics of TEXs in solid-phase

When TEXs are immobilized within MIP, they show maximum excitation and emission wavelengths very similar to those in solution, as is described elsewhere in the literature. Furthermore, there are no significant differences between the spectra obtained on a solid surface and those obtained in solution, so it would seem that the interaction between TEXs and MIP works through weak interaction and not via covalent bonds. On the other hand, in order to develop a screening test for TEXs, we set 260/284 nm as excitation and emission wavelengths.

3.4. Optimization of the flow-through sensor

The instrumental parameters (detector voltage and excitation and emission slit widths), the flow injection variables (flow rate and injection volume) and the chemical variables (presence of organic solvent, pH and ionic strength) were optimized following similar procedures to those described by (Valero-Navarro et al. 2009b).

The detector voltage affects both the analytical value of the signal and its repeatability. The optimum voltage was 700 V giving the best signal with lowest noise (see ESI, Fig. ESI-9).

The excitation slit influences the amount of light that reaches the sample, and therefore the light it emits. The opening of the emission slit influences the amount of light that reaches the detector. Thus, the excitation and emission slits were both set at 4 nm.

Analyte retention is influenced by the flow-rate from 0.5 to 2.0 mL min⁻¹. An increase of flow-rate causes a significant decrease in the fluorescence signal and a concomitant decrease in sensor response time. Thus we chose an optimum value of 1.5 mL min⁻¹ for the rest of the experimental work (see ESI, Fig. ESI-10).

The volume of sample injected exercises a considerable effect upon the fluorescence emission signals. Thus, an increase in injection volume increases both the fluorescence signal (resulting in a plateau when it is greater than 2.0 mL) and the response time. In order to reduce the response time whilst maintaining a satisfactory signal we chose 2.0 mL as optimum injection volume (see ESI, Fig. ESI-11).

The addition of organic solvents to the carrier is an important experimental variable because it helps to dissolve the analyte and avoids any retention of the analyte in the flow system, guaranteeing that all the injected analyte reaches the MIP. It was observed the addition of 1,4-dioxane in the carrier caused a decrease in the sensitivity, producing the elution of the compounds. Thus, the addition of an organic solvent was rejected.

The influence of the pH of the carrier solution was not investigated due to the absence of protonable groups in both, the polymer and the analytes. Thus, the pH could not affect the fluorescence determination of TEXs with the proposed MIP. Anyway, as we will comment later, one of the interference compounds is phenol. In order to decrease the interference of this compound we decide to fix the pH of the sample at pH=11 because the luminescence properties of TEXs are not affected by pH but, at pH 11, the phenol is deprotonate to phenolate which is very low fluorescence. Thus, the pH of samples has to be fixed at pH 11 in order to eliminate the interference of phenol.

In addition, significant differences of intensity between tap and distilled waters due to the presence of ionic salts in tap water were observed. A study of the ionic strength was performed to evaluate the MIP response when real water samples were analyzed (see ESI, Fig ESI-12). To study the ionic strength of the media we added NaCl to the carrier in the range of 0-1.5 M. It showed that an increase of the ionic strength provides an increase of the sensing response up to 1.0 M. After that, an increase of the ionic strength does not affect the sensing response. Therefore, in order to eliminate the effect of the ionic strength in the analysis of real

samples, 1.0 M NaCl carrier solution was used. ESI also shows the signal of two spiked samples, 700 $\mu\text{g L}^{-1}$ ethylbenzene in bidistilled water (conductivity $5.5 \cdot 10^{-2} \mu\text{S cm}^{-1}$) and tap water (conductivity $450 \mu\text{S cm}^{-1}$) when bidistilled water and 1.0 M NaCl carrier solution were used. It is possible to conclude that the use of 1.0 M NaCl carrier solution eliminates the interference of the ionic strength.

Fig. 3 shows the optimum diagrams when 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ of toluene were injected into the flow system using MIP and NIP as sensing materials. It also shows the regeneration with acetone and, in addition, the reproducibility of the sensing scheme.

MIP provides a higher response than NIP, MIP/NIP ratio of 1.35 ± 0.10 . In addition, the signal is completely reversible and reproducible, 4.9% expressed as relative standard deviation, and the response time (t_{90}) of the optosensor is 81 ± 6 s.

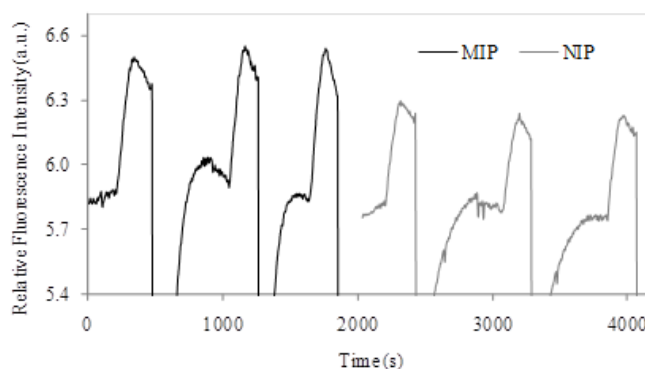


Fig. 3. Response of the optosensor for three consecutive injections of 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ toluene when MIP (black line) and NIP (grey line) were used as sensing materials. $\lambda_{\text{exc/em}}=260/284$ nm, excitation and emission slit widths of 4 nm, 550v detector voltage, flow-rate 1.5 mL min^{-1} and injection volume 2 mL.

3.5. Study of interferences

Five monoaromatic compounds with different functional groups (benzene, phenol, chlorobenzene, nitrobenzene and styrene) and similar size than TEXs were selected as interferences in order to check the selectivity of the synthesized MIP. ESI shows the results of this study (see ESI, Fig. ESI-13a). It shows that benzene, chlorobenzene, nitrobenzene and styrene have lower signal than ethylbenzene, which is the less luminescent compound of TEXs. Only phenol shows a higher luminescence signal. It is due to the very high quantum

yield of phenol, therefore the retention of small amount of this analyte into the MIP provides a high signal. Phenol is deprotonated to phenolate in basic media. Phenolate is less luminescent than phenol, thus we decided raising the pH until a value of 11.0 in the samples. It eliminates the interferences of phenol (see ESI, Fig. ESI-13b).

3.6. Screening test

The main objectives of a screening test are to obtain a reliable response, to reduce the preliminary operations of the conventional analytical processes, and to minimize the need of expensive instruments because they help to select only those samples with analyte levels “similar to” or “higher than” a previously established threshold. Thus only those “probably polluted” samples must be further examined with more exact instrumental methods.

3.6.1. Cut-off level and threshold value

The cut-off level is a critical parameter for screening methods. Such level is generally established by legal requirements when it is related to toxic compounds for human health.

When solutions of $250 \mu\text{g L}^{-1}$ of each TEX in distilled water at pH 11.0 were injected in the optosensor, the lowest signal was acquired for ethylbenzene (see Fig. 4). Therefore, in order to develop a screening test which can distinguish between contaminated or uncontaminated samples by TEXs, and to decrease the number of false negatives, which is the most important parameter of the reliability of this kind of screening, we selected ethylbenzene as representative compound of TEXs for the establishment of the cut-off level.

The maximum contaminant level (MCL) establishes by US Environmental Protection Agency (EPA), according to the decree 816-F-09-004 (May 2009), for ethylbenzene in drinking water is $700 \mu\text{g L}^{-1}$. Thus we set this value as cut-off level.

In order to determine the threshold value of the cut-off level, 10 injections of $700 \mu\text{g L}^{-1}$ ethylbenzene were injected and the average of their relative fluorescence intensities were measured. So, the threshold value was 8.27 ± 0.57 a.u. (95% confidence level, $n= 10$) (see ESI, Fig. ESI-14). According to this, water samples whose fluorescent intensities are higher than the threshold value will be considered as contaminated. However, water samples with fluorescent intensities lower than the threshold value will be selected as uncontaminated.

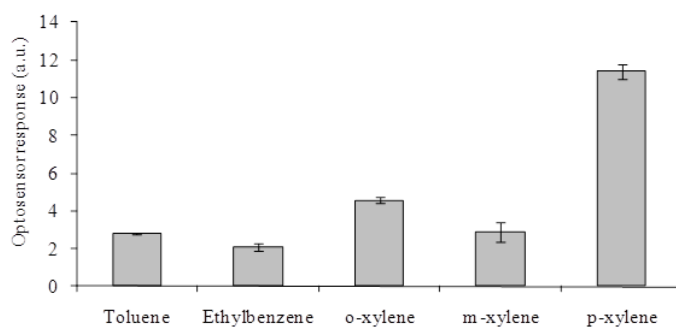


Fig. 4. Optosensor response of $250 \mu\text{g L}^{-1}$ of each TEXs at pH 11. $\lambda_{\text{exc/em}}=260/284 \text{ nm}$, excitation and emission slit widths of 4 nm, 700v detector voltage, flow-rate 1.5 mL min^{-1} and injection volume 2 mL.

3.6.2. Reliability of the screening test

Several quality parameters can be utilized to establish the reliability of a screening test. We used the percentage of false positives and false negatives through a simple chemometric study (Valcárcel et al. 1999), as parameter of the reliability of our proposed screening system. It is simple and the most popular quality parameter used in analytical chemistry to establish the reliability of a screening test (Lima et al. 2004; Nascentes et al. 2002; Valero-Navarro et al. 2007). A false positive corresponded to a water sample containing a TEXs concentration lower than the cut-off level but giving a positive response. However, a false negative corresponded to a water sample with a TEXs concentration higher than the cut-off level giving a negative response.

The philosophy of the proposed optosensing screening test is to detect those samples which could be “probably polluted” in order to reduce the number of samples which have to be further examined with more exact instrumental methods. Therefore, the percentage of false negatives is the most important parameter of the reliability of the screening test because it indicates the percentage of number of polluted samples which are going to be considered as non-polluted.

Table 1. Results of the reliability of the proposed screening test.

| Water sample | Toluene ppm | Ethylbenzene ppm | o-xylene ppm | m-xylene ppm | p-xylene ppm | Theoretical response | Optosensor response |
|--------------|-------------|------------------|--------------|--------------|--------------|----------------------|---------------------|
| 1 | - | - | - | - | - | No | No |
| 2 | 0.5 | - | - | - | - | No | No |
| 3 | - | 0.5 | - | - | - | No | No |
| 4 | - | - | 1 | - | - | No | Yes |
| 5 | - | - | - | 1 | - | No | Yes |
| 6 | - | - | - | - | 1 | No | Yes |
| 7 | 3 | - | - | - | - | Yes | Yes |
| 8 | - | 3 | - | - | - | Yes | Yes |
| 9 | - | - | 20 | - | - | Yes | Yes |
| 10 | - | - | - | 20 | - | Yes | Yes |
| 11 | - | - | - | - | 20 | Yes | Yes |
| 12 | 0.8 | - | - | - | - | No | No |
| 13 | - | 0.6 | - | - | - | No | No |
| 14 | - | - | 9 | - | - | No | Yes |
| 15 | - | - | - | 9 | - | No | Yes |
| 16 | - | - | - | - | 9 | No | Yes |
| 17 | 0.8 | 0.6 | - | - | - | No | Yes |
| 18 | - | 0.6 | 3 | - | - | No | Yes |
| 19 | - | 0.6 | - | 3 | - | No | Yes |
| 20 | - | 0.6 | - | - | 3 | No | Yes |
| 21 | 0.8 | 0.6 | 3 | - | - | No | Yes |
| 22 | 0.8 | 0.6 | - | 3 | - | No | Yes |
| 23 | 0.8 | 0.6 | - | - | 3 | No | Yes |
| 24 | 0.8 | 0.6 | 3 | 3 | - | No | Yes |
| 25 | 0.8 | 0.6 | 3 | - | 3 | No | Yes |
| 26 | 0.8 | 0.6 | - | 3 | 3 | No | Yes |
| 27 | 2 | - | - | - | - | Yes | Yes |
| 28 | - | 1.4 | - | - | - | Yes | Yes |
| 29 | - | - | 12 | - | - | Yes | Yes |
| 30 | - | - | - | 12 | - | Yes | Yes |
| 31 | - | - | - | - | 12 | Yes | Yes |
| 32 | 2 | 1.4 | - | - | - | Yes | Yes |
| 33 | 2 | - | 12 | - | - | Yes | Yes |
| 34 | 2 | - | - | 12 | - | Yes | Yes |
| 35 | 2 | - | - | - | 12 | Yes | Yes |
| 36 | - | 1.4 | 12 | - | - | Yes | Yes |
| 37 | - | 1.4 | - | 12 | - | Yes | Yes |
| 38 | - | 1.4 | - | - | 12 | Yes | Yes |
| 39 | - | - | 12 | 12 | - | Yes | Yes |
| 40 | - | - | 12 | - | 12 | Yes | Yes |
| 41 | - | - | - | 12 | 12 | Yes | Yes |
| 42 | 1 | - | - | - | - | Yes | Yes |
| 43 | - | 0.7 | - | - | - | Yes | Yes |
| 44 | - | - | 10 | - | - | Yes | Yes |
| 45 | - | - | - | 10 | - | Yes | Yes |
| 46 | - | - | - | - | 10 | Yes | Yes |
| 47 | - | - | 5 | 5 | - | Yes | Yes |
| 48 | - | - | 5 | - | 5 | Yes | Yes |
| 49 | - | - | - | 5 | 5 | Yes | Yes |
| 50 | - | - | 3.4 | 3.3 | 3.3 | Yes | Yes |

Fifty water samples were used to establish the reliability of the screening test. A design for the composition of the water samples was performed in the screening system. Table 1 shows the TEXs content of each sample, and both theoretical and experimental responses to the screening test: YES means contaminated sample and NO means uncontaminated sample. To establish which samples are contaminated or not the US-EPA regulations have been used. US-EPA considers that water is contaminated by TEXs when samples contain $1000 \mu\text{g L}^{-1}$ of toluene or $700 \mu\text{g L}^{-1}$ of ethylbenzene or $10000 \mu\text{g L}^{-1}$ of xylenes (sum of the three isomers). The results of the screening test are: 32% false positives and 0% false negatives. Thus, all the contaminated samples were detected by the screening test, demonstrating that the proposed method could be used for the screening of TEXs in water samples.

3.6.3. Confirmation of reliability by analyzing real water samples

A total of fifteen real water samples were used to confirm the applicability of the screening test. Different types of real water samples, as bottled, tap and river waters, were analyzed. None of them contained TEXs, so all the samples were spiked with different concentrations of TEXs. Table 2 shows the concentration of TEXs added to each sample and the response of the screening test. The results were similar to those obtained with stock solutions (prepared with bidistilled water): 20% false positives and 0% false negatives. Therefore, it is possible to conclude that the proposed screening test could be used in routine labs to discriminate between TEX contaminated and uncontaminated sample, decreasing the number of samples which have to be analyzed by a more accurate but tedious and expensive analytical method.

4. Conclusions

The results presented here demonstrate that a molecularly imprinted polymer was developed successfully for the TEX compounds. The selection of the solvent and the polymerization conditions were the most important steps to synthesize non-covalently imprinted polymer. The study of FIA and instrumental parameters improved the analytical characteristics of the MIP, which were excellent for the detection of small molecules. The MIP/NIP ratio obtained for this type of compounds was acceptable. Response times were short and the reproducibility and repeatability obtained with the MIP was high. The

elimination of interferences was performed with the adjustment of the water samples at pH 11.0 and by using 1.0 M NaCl carrier solution.

The optosensor, which was made up of the synthesized MIP, was used to develop a screening test for TEXs in drinking water. The test recognized contaminated water samples very quickly and inexpensively with a cut-off level of $700 \mu\text{g L}^{-1}$ for ethylbenzene and a threshold value of 8.27 ± 0.57 a.u.. The test ran without the need for any pre-concentration step, being suitable for routine use in water-quality control and in environmental laboratories. The reliability of the screening test was established showing 32% false positives and 0% false negatives for fifty samples. To demonstrate the applicability of the test, fifteen real water samples were analyzed obtaining 20% false positives and 0% false negatives. In both cases, the percentage of false negatives was 0%; all the contaminated samples (35 of 65) were detected by the optosensing screening test. Thus, it has been successfully used in the determination of TEXs in drinking water, and it could be an important alternative to the routine labs for reducing the number of samples which have to be analysed by more expensive techniques.

Table 2. Composition and results of non spiked and spiked real water samples analyzed for the confirmation of the reliability of the proposed screening test. Samples 1,4,7,10 and 13 correspond to a mineral water; samples 2,5,8,11 and 14 correspond to tap water from Granada city; and samples 3,6,9,12 and 15 correspond to a water from an irrigation ditch.

| Water sample | Toluene ppm | Ethylbenzene ppm | o-xylene ppm | m-xylene ppm | p-xylene ppm | Theoretical response | Optosensor response |
|--------------|-------------|------------------|--------------|--------------|--------------|----------------------|---------------------|
| 1 | - | - | - | - | - | No | No |
| 2 | - | - | - | - | - | No | No |
| 3 | - | - | - | - | - | No | No |
| 4 | 0.8 | - | - | - | - | No | Yes |
| 5 | 0.8 | - | - | - | - | No | Yes |
| 6 | 0.8 | - | - | - | - | No | Yes |
| 7 | - | 0.6 | - | - | - | No | No |
| 8 | - | 0.6 | - | - | - | No | No |
| 9 | - | 0.6 | - | - | - | No | No |
| 10 | 2 | 1.4 | - | - | - | Yes | Yes |
| 11 | 2 | 1.4 | - | - | - | Yes | Yes |
| 12 | 2 | 1.4 | - | - | - | Yes | Yes |
| 13 | 2 | - | - | - | 12 | Yes | Yes |
| 14 | 2 | - | - | - | 12 | Yes | Yes |
| 15 | 2 | - | - | - | 12 | Yes | Yes |

Acknowledgements

The Spanish Ministry of Education and Science (Project CTQ2008-01394) and the Regional Government of Andalusia (Excellence projects P07-FQM-2738 and P07-FQM-2625) were thanked for the financial support of this work.

References

- Aguilera-Herrador, E., Lucena, R., Cárdenas, S., Valcárcel, M., 2008. Ionic liquid-based single-drop microextraction/gas chromatographic/mass spectrometric determination of benzene, toluene, ethylbenzene and xylene isomers in waters. *Journal of Chromatography A* 1201(1), 106-111.
- Alberici, R.M., Zampronio, C.G., Poppi, R.J., Eberlin, M.N., 2002. Water solubilization of ethanol and BTEX from gasoline: on-line monitoring by membrane introduction mass spectrometry. *Analyst* 127(2), 230-234.
- Alizadeh, T., Ganjali, M.R., Norouzi, P., Zare, M., Zeraatkar, A., 2009. A novel high selective and sensitive para-nitrophenol voltammetric sensor, based on a molecularly imprinted polymer-carbon paste electrode. *Talanta* 79(5), 1197-1203.
- Almeida, C.M.M., Boas, L.V., 2004. Analysis of BTEX and other substituted benzenes in water using headspace SPME-GC-FID: method validation. *Journal of Environmental Monitoring* 6(1), 80-88.
- Arambarri, I., Lasa, M., Garcia, R., Millan, E., 2004. Determination of fuel dialkyl ethers and BTEX in water using headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-flame ionization detection. *Journal of Chromatography A* 1033(2), 193-203.
- Beketov, V.I., Parchinskii, V.Z., Zorov, N.B., 1996. Effects of high-frequency electromagnetic treatment on the solid-phase extraction of aqueous benzene, naphthalene and phenol. *Journal of Chromatography A* 731(1-2), 65-73.
- Bianchi, F., Careri, M., Marengo, E., Musci, M., 2002. Use of experimental design for the purge-and-trap-gas chromatography-mass spectrometry determination of methyl tert-butyl ether, tert-butyl alcohol and BTEX in groundwater at trace level. *Journal of Chromatography A* 975(1), 113-121.

- Chiou, C.T., Schmedding, D.W., Manes, M., 1982. Partitioning of organic-compounds in octanol-water systems. *Environmental Science & Technology* 16(1), 4-10.
- Dickert, F.L., Tortschanoff, M., Bulst, W.E., Fischerauer, G., 1999. Molecularly Imprinted Sensor Layers for the Detection of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Water. *Anal. Chem.* 71, 4559-4563.
- Fernandez-Sanchez, J.F., Carretero, A.S., Cruces-Blanco, C., Fernandez-Gutierrez, A., 2003a. The development of solid-surface fluorescence characterization of polycyclic aromatic hydrocarbons for potential screening tests in environmental samples. *Talanta* 60(2-3), 287-293.
- Fernandez-Sanchez, J.F., Carretero, A.S., Cruces-Blanco, C., Fernandez-Gutierrez, A., 2004. Highly sensitive and selective fluorescence optosensor to detect and quantify benzo[a]pyrene in water samples. *Analytica Chimica Acta* 506(1), 1-7.
- Fernandez-Sanchez, J.F., Segura-Carretero, A., Costa-Fernandez, J.M., Bordel, N., Pereiro, R., Cruces-Blanco, C., Sanz-Medel, A., Fernandez-Gutierrez, A., 2003b. Fluorescence optosensors based on different transducers for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in water. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 377(4), 614-623.
- Florez Menendez, J.C., Fernández Sánchez, M.L., Sánchez Uría, J.E., Fernández Martínez, E., Sanz-Medel, A., 2000. Static headspace, solid-phase microextraction and headspace solid-phase microextraction for BTEX determination in aqueous samples by gas chromatography. *Analytica Chimica Acta* 415(1-2), 9-20.
- Hauser, B., Popp, P., 2001. Combining membrane extraction with mobile gas chromatography for the field analysis of volatile organic compounds in contaminated waters. *Journal of Chromatography A* 909(1), 3-12.
- Ji, J., Deng, C.H., Shen, W.W., Zhang, X.M., 2006. Field analysis of benzene, toluene, ethylbenzene and xylene in water by portable gas chromatography-microflame ionization detector combined with headspace solid-phase microextraction. *Talanta* 69(4), 894-899.
- Lee, M.-R., Chang, C.-M., Dou, J., 2007. Determination of benzene, toluene, ethylbenzene, xylenes in water at sub-ng l-1 levels by solid-phase microextraction coupled to cryo-trap gas chromatography-mass spectrometry. *Chemosphere* 69(9), 1381-1387.
- Lima, R.A.C., Santos, S.R.B., Costa, R.S., Marcone, G.P.S., Honorato, R.S., Nascimento, V.B., Araujo, M.C.U., 2004. Hardness screening of water using a flow-batch photometric system. *Analytica Chimica Acta* 518(1-2), 25-30.

- Liu, J.X., Chen, H., Lin, Z., Lin, J.M., 2010. Preparation of Surface Imprinting Polymer Capped Mn-Doped ZnS Quantum Dots and Their Application for Chemiluminescence Detection of 4-Nitrophenol in Tap Water. *Anal. Chem.* 82(17), 7380-7386.
- Medina-Castillo, A.L., Fernandez-Sanchez, J.F., Segura-Carretero, A., Fernandez-Gutierrez, A., 2009. A semi-empirical model to simplify the synthesis of homogeneous and transparent cross-linked polymers and their application in the preparation of optical sensing films. *Biosensors & Bioelectronics* 25(2), 442-449.
- Medina-Castillo, A.L., Mistlberger, G., Fernandez-Sanchez, J.F., Segura-Carretero, A., Klimant, I., Fernandez-Gutierrez, A., 2010. Novel Strategy To Design Magnetic, Molecular Imprinted Polymers with Well-Controlled Structure for the Application in Optical Sensors. *Macromolecules* 43(1), 55-61.
- Menendez, J.C.F., Sanchez, M.L.F., Uria, J.E.S., Martinez, E.F., Sanz-Medel, A., 2000. Static headspace, solid-phase microextraction and headspace solid-phase microextraction for BTEX determination in aqueous samples by gas chromatography. *Analytica Chimica Acta* 415(1-2), 9-20.
- Nascentes, C.C., Cárdenas, S., Gallego, M., Valcárcel, M., 2002. Continuous photometric method for the screening of human urines for phenothiazines. *Analytica Chimica Acta* 462(2), 275-281.
- Nollet, L.M.L. (Ed.), 2001. *Handbook of Water Analysis*. Marcel Dekker, New York (Chapter 33).
- Prikryl, P., Kubinec, R., Jurdakova, H., Sevcik, J., Ostrovsky, I., Sojak, L., Berezkin, V., 2006. Comparison of needle concentrator with SPME for GC determination of benzene, toluene, ethylbenzene, and xylenes in aqueous samples. *Chromatographia* 64(1-2), 65-70.
- Rosell, M., Lacorte, S., Ginebreda, A., Barcelo, D., 2003. Simultaneous determination of methyl tert.-butyl ether and its degradation products, other gasoline oxygenates and benzene, toluene, ethylbenzene and xylenes in Catalonian groundwater by purge-and-trap-gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 995(1-2), 171-184.
- San Vicente de la Riva, B., Costa-Fernandez, J.M., Pereiro, R., Sanz-Medel, A., 2002. Spectrafluorimetric method for the rapid screening of toxic heavy metals in water samples. *Analytica Chimica Acta* 451(2), 203-210.

- Sanchez-Barragan, I., Costa-Fernandez, J.M., Pereiro, R., Sanz-Medel, A., Salinas, A., Segura, A., Fernandez-Gutierrez, A., Ballesteros, A., Gonzalez, J.M., 2005. Molecularly imprinted polymers based on iodinated monomers for selective room-temperature phosphorescence optosensing of fluoranthene in water. *Anal. Chem.* 77(21), 7005-7011.
- Sarafraz-Yazdi, A., Amiri, A.H., Es'haghi, Z., 2008. BTEX determination in water matrices using HF-LPME with gas chromatography-flame ionization detector. *Chemosphere* 71(4), 671-676.
- Sarafraz-Yazdi, A., Amiri, A.H., Es'haghi, Z., 2009. Separation and determination of benzene, toluene, ethylbenzene and o-xylene compounds in water using directly suspended droplet microextraction coupled with gas chromatography-flame ionization detector. *Talanta* 78(3), 936-941.
- Tsow, F., Forzani, E., Rai, A., Wang, R., Tsui, R., Mastroianni, S., Knobbe, C., Gandolfi, A.J., Tao, N.J., 2009. A Wearable and Wireless Sensor System for Real-Time Monitoring of Toxic Environmental Volatile Organic Compounds. *Ieee Sensors Journal* 9(12), 1734-1740.
- Valcárcel, M., Cárdenas, S., Gallego, M., 1999. Sample screening systems in analytical chemistry. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 18(11), 685-694.
- Valero-Navarro, A., Damiani, P.C., Fernandez-Sanchez, J.F., Segura-Carretero, A., Fernandez-Gutierrez, A., 2009a. Chemometric-assisted MIP-optosensing system for the simultaneous determination of monoamine naphthalenes in drinking waters. *Talanta* 78(1), 57-65.
- Valero-Navarro, A., Fernandez-Sanchez, J.F., Medina-Castillo, A.L., Fernandez-Ibanez, F., Segura-Carretero, A., Ibanez, J.M., Fernandez-Gutierrez, A., 2007. A rapid, sensitive screening test for polycyclic aromatic hydrocarbons applied to Antarctic water. *Chemosphere* 67(5), 903-910.
- Valero-Navarro, A., Salinas-Castillo, A., Fernandez-Sanchez, J.F., Segura-Carretero, A., Mallavia, R., Fernandez-Gutierrez, A., 2009b. The development of a MIP-optosensor for the detection of monoamine naphthalenes in drinking water. *Biosensors & Bioelectronics* 24(7), 2305-2311.
- Wang, J.X., Jiang, D.Q., Yan, X.P., 2006. Determination of substituted benzenes in water samples by fiber-in-tube liquid phase microextraction coupled with gas chromatography. *Talanta* 68(3), 945-950.

Electronic Supporting Information

Synthesis and characterization of a molecularly imprinted polymer optosensor for TEXs-screening in drinking water

*F.J. Sainz-Gonzalo**, *A.L. Medina-Castillo*, *J.F. Fernández-Sánchez**, *A. Fernández-Gutiérrez*

Department of Analytical Chemistry, Faculty of Sciences, University of Granada, Av. Fuentenueva s/n, 18071 Granada, Spain. www.ugr.es/local/fqm297

Index

Fig. ESI-1: Scheme of the FIA system

Fig. ESI-2: Ternary diagrams used

Fig. ESI-3: Effect of percentage of EDMA

Fig. ESI-4: Effect of percentage of HEMA

Fig. ESI-5: Effect of amount of template

Fig. ESI-6: Effect of the total volume

Fig. ESI-7: Effect of temperature

Fig. ESI-8: Cleaning of the MIP

Fig. ESI-9: Effect of the detector voltage

Fig. ESI-10: Effect of the flow-rate

Fig. ESI-11: Effect of the injection volume

Fig. ESI-12: Effect of the ionic strength

Fig. ESI-13: Interference study

Fig. ESI-14: Threshold value

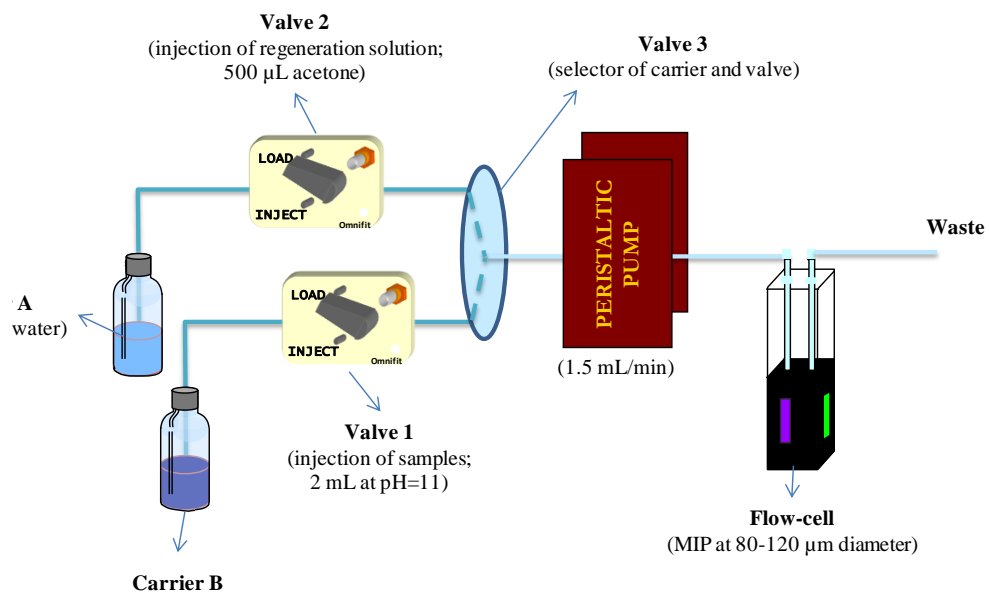


Fig. ESI-1. Optosensing manifold.

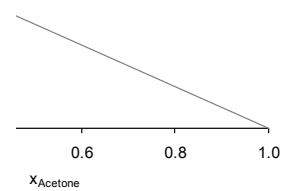


Fig. ESI-2. Determination of the homogeneity (white) and heterogeneity (red) zones for the polymer 80% MMA-20% EDMA taking into account the three solubility parameters.

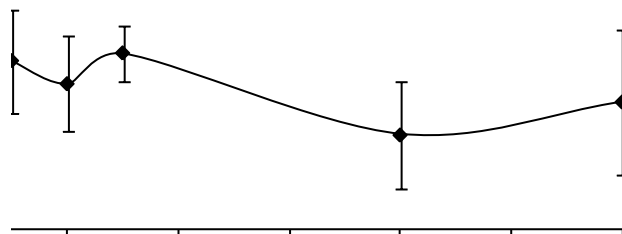


Fig. ESI-3. Effect of the percentage of the cross-linker EDMA on the MIP/NIP ratio.

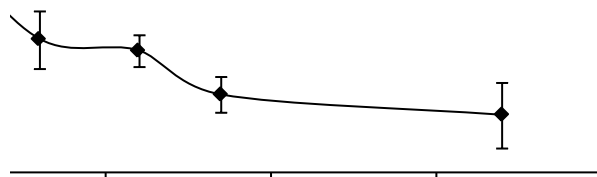


Fig. ESI-4. Variation of the MIP/NIP ratio versus the percentage of HEMA. [Toluene]= $500 \mu\text{g L}^{-1}$, $\lambda_{\text{exc/em}}=260/284 \text{ nm}$, excitation and emission slit widths of 4 nm, 550v detector voltage, flow-rate 1.5 mL min^{-1} and injection volume 2 mL.

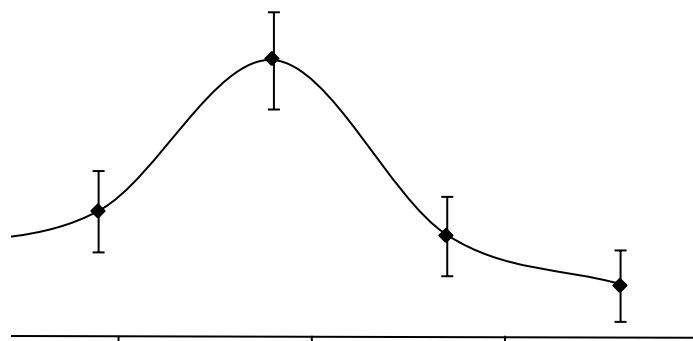


Fig. ESI-5. Effect of the amount of template molecule (toluene) in the imprinting polymer.

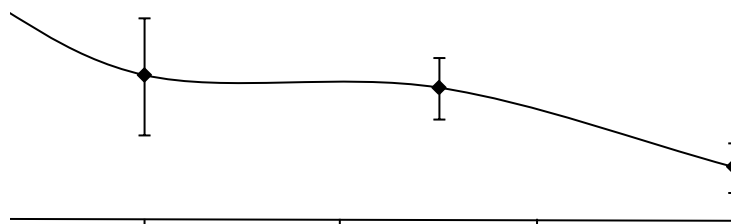


Fig. ESI-6. Variation of the imprinting factor versus total reaction volume.

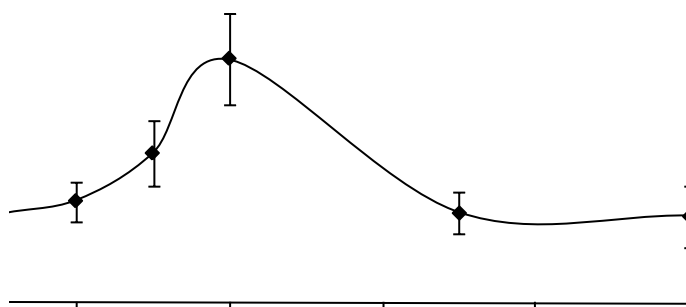


Fig. ESI-7. Effect of the reaction temperature in the MIP/NIP ratio.

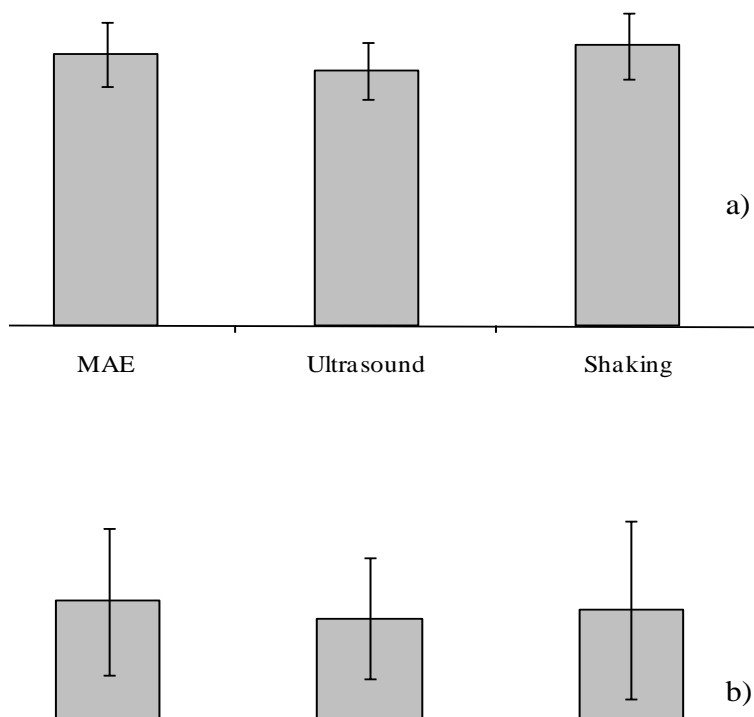


Fig. ESI-8. Effect of the three template extraction protocols used in this work versus both a) signal/noise ratio and b) signal-noise difference.

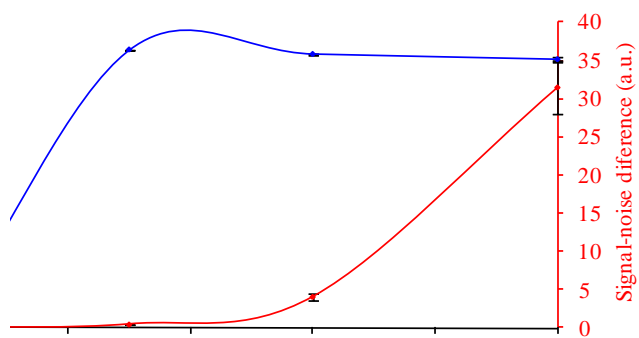


Fig. ESI-9. Effect of the detector voltage versus signal/noise ratio and signal-noise difference.

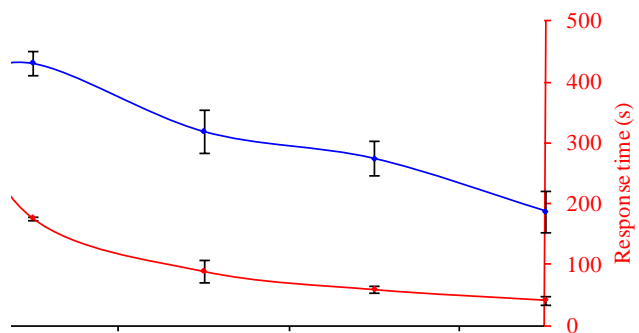


Fig. ESI-10. Effect of the flow-rate versus relative fluorescence intensity and response time.

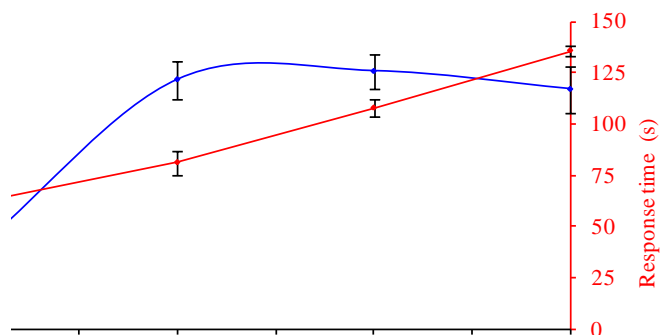


Fig. ESI-11. Effect of the injection volume versus relative fluorescence intensity and response time.

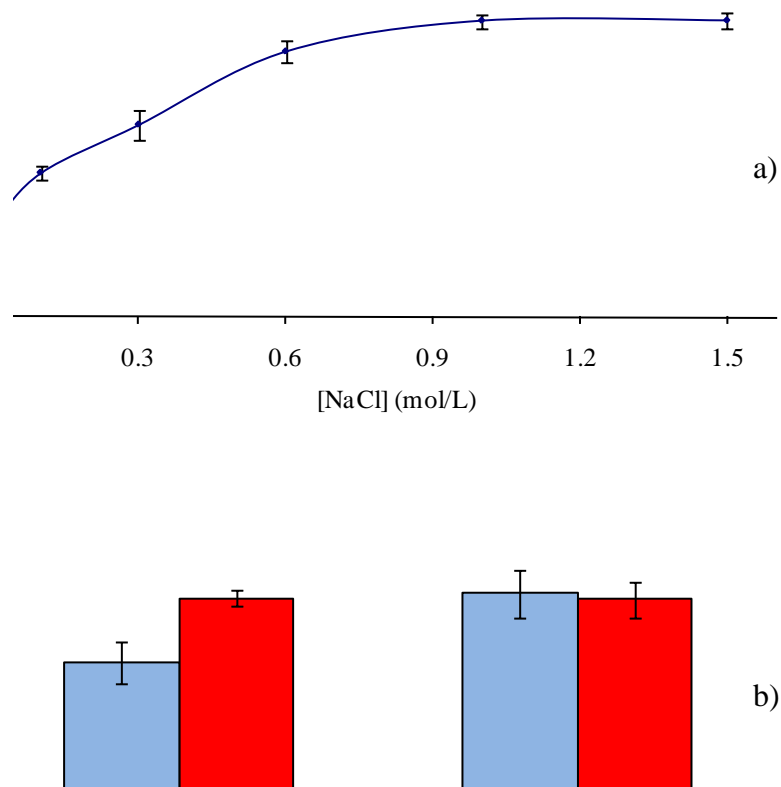


Fig. ESI-12. a) Effect of the ionic strength versus the optosensor response. b) Response of spiked bidistilled water (blue) and tap water (red) when pure water and 1.0M NaCl solution were used as carrier.

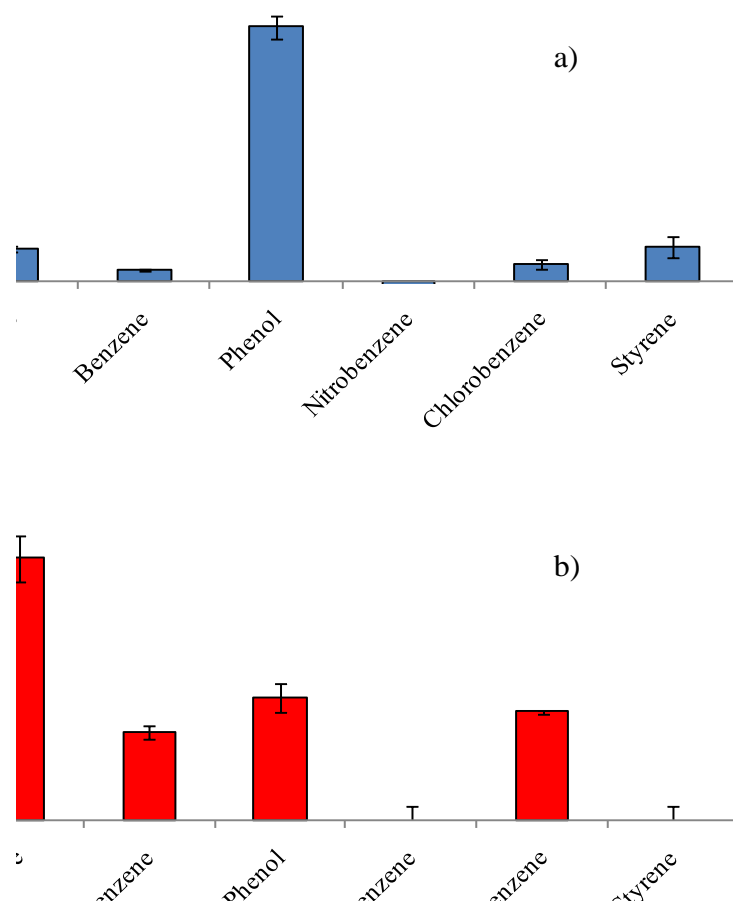


Fig. ESI-13. Interference of the tested species a) at pH=7 and b) at pH=11.

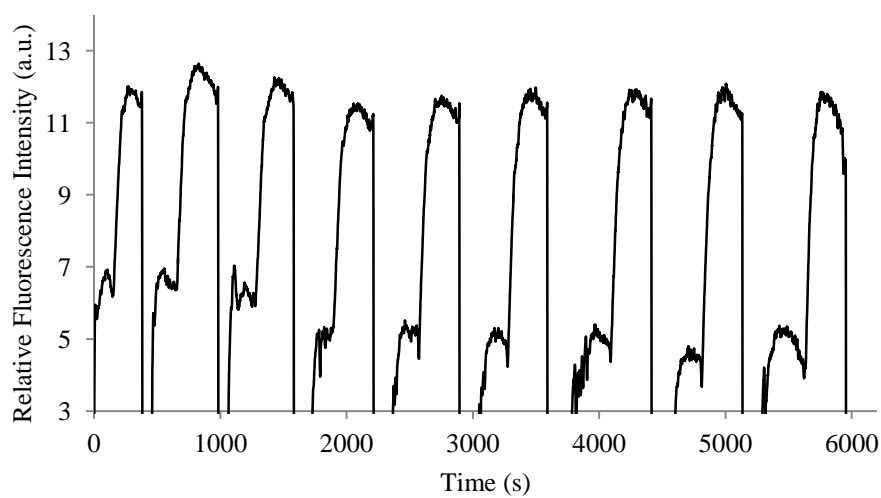


Fig. ESI-14. FIagram used for the determination of the threshold value.

IV.BI.8. Capítulo 2: *The development of a screening molecularly imprinted polymer optosensor for detecting xylenes in water samples*

The development of a screening MIP-optosensor for detecting xylenes in water samples

F.J. Sainz-Gonzalo, J.F. Fernandez-Sanchez*, A. Fernandez-Gutierrez

Department of Analytical Chemistry, Faculty of Sciences, University of Granada, Av. Fuentenueva s/n, 18071 Granada, Spain. www.ugr.es/local/fqm297

Abstract

We describe a rapid, sensitive, fluorescent screening test for xylenes in water samples that avoids more costly time-consuming methods. The screening test is based on a molecularly imprinted polymer and it runs without the need for any pre-concentration step, thus rendering it suitable for routine use in water-quality-control laboratories. The test recognizes contaminated samples rapidly (50 s) and inexpensively with a cut-off level of $10 \mu\text{g mL}^{-1}$, which is the value that the International Organization have laid down in its assessment of the water quality for human consumption. The reliability of the screening test was 23% false positives and 0% false negatives in 30 samples. The applicability was confirmed by analysing mineral, tap and river water samples.

Keywords: Molecular imprinting; Fluorescence optosensor; Xylenes; Flow analysis; Screening test; Water analysis

* Corresponding author. Tel.: +34 958 248409; fax: +34 958243328.

E-mail address: jffernan@ugr.es (J.F. Fernandez-Sanchez)

1. Introduction

Xylenes (*ortho*-, *meta*- and *para*- xylenes) are included in the family of TEX compounds. They are widely used as solvents and raw materials in many industries, such as printing, paint, synthetic resin and rubber [1]. In addition, they are present in many petroleum derivatives,

such as fuel oil and gasoline [2]. They are ubiquitous environmental pollutants which can be found in soil, water and air; and they penetrate in humans through ingestion, inhalation or absorption. Their effects on health could cause problems in the liver, kidneys, heart, lungs and nervous system, including neurological diseases or cancer [3]. The maximum contaminant level (MCL) established by US Environmental Protection Agency (EPA) in drinking water is $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ (sum of the three isomers).

TEXs have been analysed by GC-FID or GC-MS, using solid-phase and liquid-liquid extractions [4], purge-and-trap (PT) [5, 6], membrane extraction [7], solid-phase microextraction (SPME) [8, 9], single-drop microextraction (SDME) [10, 11], liquid-phase microextraction (LPME) [12, 13] and *headspace solid-phase microextraction* (HS SPME) [8, 9, 14-17]. All of these methods require long analysis times and quite expensive instrumentation.

Chemical sensors have been developed in order to minimize these disadvantages, as well as to simplify the analytical procedure [18]. The combination of flow-injection system with detection on optically active surfaces packed in a flow-through cell (called optosensor) has proved to offer important advantages [19-21]; the use of molecularly imprinted polymers (MIPs) as optically active surfaces has provided highly selective molecular recognition properties and some excellent physical-chemical and mechanical properties in terms of robustness and stability [18, 22-28]. In addition, the development of screening tests (methods that provide a binary yes/no response, which indicate if the target analytes are present above or below a pre-set concentration) simplifies the process, reduces costs and shortens the analysis time [27, 29-33].

For this reason, our research group has synthesised a molecularly imprinted polymer [33] which is based on the semiempirical model proposed by Medina-Castillo et al. [34]. This MIP is based on the polymerization of MMA and EDMA (80:20 mol %) in the presence of toluene (which was used as template molecule), chloroform (which was used as solvent/porogen) at 80°C and under a strict control of the evaporation of solvents.

In this paper, we use this MIP for developing a screening optosensor for detecting xylenes in drinking water. Thus, it combines the recognition characteristics of a MIP with the luminescent properties of xylenes, the advantages of the flow-injection procedures, the fluorimetric detection on optically active surfaces, and the simplicity of the screening test. Therefore, this screening optosensor can detect polluted waters without any previous

treatment and with a cut-off level lower than the MCL established by US Environmental Protection Agency (EPA) in drinking water. The reliability of the screening test was 23% false positives and 0% false negatives for 30 synthetic samples. The applicability was confirmed by analyzing mineral, tap and river water samples obtaining a reliability of 0% false negatives for 9 samples.

2. Experimental

2.1. Chemicals and reagents

Methyl methacrylate (MMA) and ethylene glycol dimethacrylate (EDMA) were purchased from Aldrich (Steinheim, Germany). 2,2'-Azobis(2-methylpropionitrile) (AIBN), ethylbenzene, *o*-xylene, *m*-xylene, *p*-xylene and styrene were obtained from Fluka (Buchs, Switzerland). Toluene, *chloroform* and chlorobenzene were purchased from Lab-Scan (Gliwice, Poland). Benzene and phenol were obtained from Panreac (Barcelona, Spain). Nitrobenzene was purchased from Probus (Barcelona, Spain). Sodium chloride was obtained from Riedel-de Haën (Seelze, Germany). All chemicals and reagents were used as received without further purification.

Aqueous solutions were prepared using doubly distilled water obtained from a Milli-Q Plus 185 ultrapure water system (Millipore, UK). Stock and working standard solutions of xylenes were prepared daily and were stored in amber glass-stopper bottles at 4 °C. The working standard solutions and samples were kept in closed amber glass bottles for avoiding their evaporation during their analysis.

2.2. Instrumentation

Aminco Bowman Series 2 Luminescence Spectrometer (Sim Aminco, Madison, USA) interfaced with a computer was used to perform the fluorescent spectra and the relative fluorescent intensity measurements. The excitation and emission spectra and the fiagrams were acquired and processed using the AB2 data control and acquisition program.

2.3. Synthesis of molecularly imprinted polymers

The synthesis of the MIP has been previously published by our research group [33]. It was prepared by mixing MMA and EDMA (80:20 mol % for a total number of moles of 0.0123) with 13.7 mg AIBN, 0.783 mL of toluene (molar fraction 0.18) and 2.717 mL of chloroform (molar fraction 0.82). After homogenization, the pre-polymerization mixture was purged with nitrogen. Polymerization was undertaken in an 80°C oil bath heated for 5 h under a nitrogen flow of 20 mL min⁻¹ controlled with MKS mass-flow controllers.

Non-imprinted polymer (NIP) for use as control was prepared and treated in the same manner, except that no template molecule was used during the polymerization stage.

The extraction of the template molecule was achieved by shaking the polymer with a mixture of 5 mL of *n*-hexane and 5 mL of acetone for 20 min.

2.4. Optosensing set-up

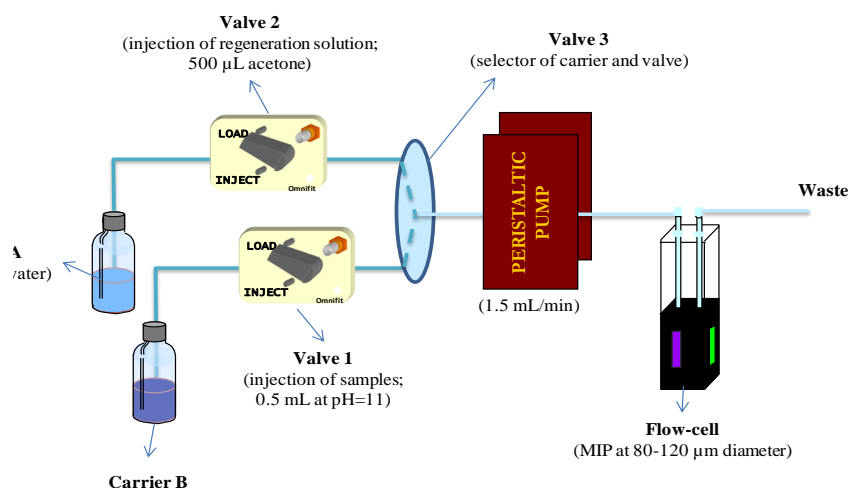


Fig. 1. Screening MIP-optosensing manifold.

A flow injection analysis (FIA) system was used for the analytical evaluation of the polymers. Connections between the different parts of the flow assembly were made with bored poly(tetra-fluoroethylene) (PTFE) connecting tubing (0.8 mm id), and various tube end fittings and connectors (Omnifit, England). Fig. 1 shows the optosensing manifold. A Minipuls 3 Gilson peristaltic pump (Gilson, Villiers Le Bel, France) was used for carrier delivering and flow regulation (flow-rate 1.5 mL min⁻¹). Two carriers, bidistilled water

(Carrier A) and 1.0 M NaCl solution (Carrier B) were used; Carrier A was used for the regeneration (cleaning) of polymer with acetone (500 μL), and Carrier B was used in order to increase the selectivity of the optosensor (injection volume 0.5 mL). Three 5020 Rheodyne low pressure injection valves (Rheodyne, USA) were used for injecting samples (valve 1), regeneration solution (valve 2) and for selecting the carrier solution (valve 3).

For packaging the MIP, the polymer was milled, sieved (80-120 μm diameter particles) and introduced into a 176.052-QS Quartz Suprasil Hellma (Hellma GmbH & Co. KG, Müllheim, Germany) precision cell (light path: 1.5 mm x 1.5 mm, centre: 15 mm). It was placed in the sample compartment of the luminescence spectrometer.

The luminescence measurements were developed at $\lambda_{\text{exc/em}}=260/284$ nm, which correspond with the maxima excitation and emission wavelengths of xylenes, detector voltage of 700 V and 4 nm of both excitation and emission slit widths. The optosensor response was considered as the difference between the fluorescence intensity after injection and fluorescence intensity of the baseline before injection.

All experiments were carried out in triplicate to calculate the error.

2.5. Sample preparation

The pH of the sample has to be adjusted to pH=11.0 (by using 0.5 M NaOH) before injection in order to reduce the number of interferences.

For determining the reliability of the screening test, stock solutions of xylenes (50 mg L^{-1} in milli-Q water at pH 11.0) were prepared. A total of 30 samples were utilised for establishing the reliability of the proposed screening test. The samples were prepared mixing different volumes of the stock solutions until they reached the desired concentration. Table 1 shows the composition of each sample.

For determining the applicability of the screening MIP optosensor 9 samples (bottled, tap and river waters) were analysed. All of them were transparent, so filtration was not necessary. In addition, none of them contained xylenes thus they had to be spiked (see Table 2 for the concentration). They were treated as it was commented before: the pH was adjusted to 11.0, by using 0.5 M NaOH, before the injection.

Table 1. Results of the reliability of the proposed screening test.

| Sample | <i>o</i> -Xylene ppm | <i>m</i> -Xylene ppm | <i>p</i> -Xylene ppm | Theoretical response | Optosensor response |
|--------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|------------------------|
| 1 | - | - | - | N | No |
| 2 | 6 | - | - | No | No |
| 3 | - | 6 | - | No | No |
| 4 | - | - | 6 | No | Yes |
| 5 | 3 | 3 | - | No | No |
| 6 | - | 3 | 3 | No | Yes |
| 7 | 10 | - | - | Yes | Yes |
| 8 | - | 10 | - | Yes | Yes |
| 9 | - | - | 10 | Yes | Yes |
| 10 | 20 | - | - | Yes | Yes |
| 11 | - | 20 | - | Yes | Yes |
| 12 | - | - | 20 | Yes | Yes |
| 13 | 10 | - | 10 | Yes | Yes |
| 14 | - | 10 | 10 | Yes | Yes |
| 15 | 9 | - | - | No | Yes |
| 16 | - | 9 | - | No | No |
| 17 | - | - | 9 | No | Yes |
| 18 | 4.5 | 4.5 | - | No | No |
| 19 | 4.5 | - | 4.5 | No | Yes |
| 20 | - | 4.5 | 4.5 | No | Yes |
| 21 | 3 | 3 | 3 | No | Yes |
| 22 | 3 | 4 | 2 | No | No |
| 23 | 12 | - | - | Yes | Yes |
| 24 | - | 12 | - | Yes | Yes |
| 25 | - | - | 12 | Yes | Yes |
| 26 | 6 | 6 | - | Yes | Yes |
| 27 | 6 | - | 6 | Yes | Yes |
| 28 | - | 6 | 6 | Yes | Yes |
| 29 | 4 | 4 | 4 | Yes | Yes |
| 30 | 4 | 2 | 6 | Yes | Yes |

3. Results and discussion

As we have commented before, this work is based in the use of the MIP developed by Sainz-Gonzalo et al [33]. In this paper we use a similar configuration but the loop of the injection valve (valve 1) is decreased (0.5 mL). Table 3 shows the instrumental, chemical and flow-injection variables used for detecting xylenes.

Table 2. Composition and results of non spiked and spiked real water samples analyzed for the confirmation of the reliability of the proposed screening test. Samples 1, 4 and 7 correspond to a mineral water; samples 2, 5 and 8 correspond to tap water from Granada city; and samples 3, 6 and 9 correspond to a water from an irrigation ditch.

| Water sample | <i>o</i> -Xylene ppm | <i>m</i> -Xylene ppm | <i>p</i> -Xylene ppm | Theoretical response | Optosensor response |
|--------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|---------------------|
| 1 | - | - | - | No | No |
| 2 | - | - | - | No | No |
| 3 | - | - | - | No | No |
| 4 | 3 | 3 | - | No | No |
| 5 | 3 | 3 | - | No | No |
| 6 | 3 | 3 | - | No | No |
| 7 | 6 | 6 | - | Yes | Yes |
| 8 | 6 | 6 | - | Yes | Yes |
| 9 | 6 | 6 | - | Yes | Yes |

Table 3. Instrumental, chemical and flow variables used for detecting xylenes with the proposed screening MIP-optosensor.

| Variable | Optima values |
|------------------------------------|-------------------|
| $\lambda_{\text{exc/em}}$ (nm) | 260/284 |
| Slits width _{exc/em} (nm) | 4/4 |
| Detector voltage (V) | 700 |
| pH of sample | 11 |
| Carrier A | Bidistilled water |
| Carrier B | 1.0 M NaCl |
| Flow-rate (mL min ⁻¹) | 1.5 |
| Injection volume (mL) | 0.5 |

Xylenes are the TEX compounds with the highest fluorescence quantum yields, thus decreasing the injection volume it is possible to eliminate the interferences of toluene and ethylbenzene, and only xylenes can be detected by fluorescence. The rest of instrumental and chemical variables were kept equal than the previous work.

3.1. Study of interferences

In order to test the selectivity of the MIP-optosensor, six monoaromatic compounds with different functional groups (benzene, toluene, phenol, chlorobenzene, nitrobenzene and styrene) and similar size than xylenes were selected as interferences (see Fig. 2).

It shows that any of them (included toluene and ethylbenzene) interfere in the detection of xylenes, even when the concentrations of both toluene and ethylbenzene are the MLC established by EPA. Therefore, we can conclude that decreasing the injection volume of the sample we can also increase the selectivity of the MIP-optosensor and develop a screening MIP-optosensor for detecting xylenes.

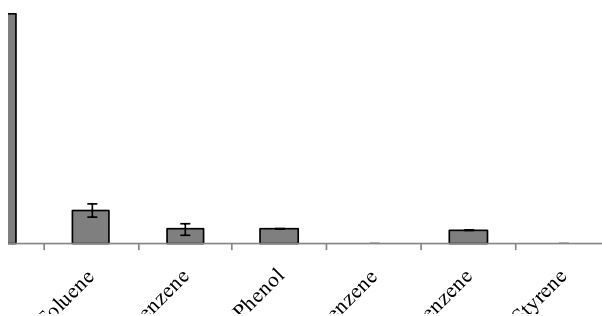


Fig. 2. Interference study at pH 11.0. [*m*-xylene]=10.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$, [toluene]=1.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$, [ethylbenzene]=0.7 $\mu\text{g mL}^{-1}$, [phenol]=[nitrobenzene]=[chlorobenzene]=[styrene]= 0.25 $\mu\text{g mL}^{-1}$; $\lambda_{\text{exc/em}}$ =260/284 nm, excitation and emission slit widths of 4 nm, 700V detector voltage, flow-rate 1.5 mL min^{-1} and injection volume 0.5 mL.

3.2. Screening test

It is not always essential to be aware of the exact quantity of pollutants in the sample, their presence alone being sufficient to contribute to a better knowledge of the environment [29]. Methods that provide a binary yes/no response, which indicate if the target analytes are present above or below a pre-set concentration (cut-off level), are known as screening tests.

The main objectives of a screening test are to obtain a reliable response, to reduce the preliminary operations of the conventional analytical processes, and to minimize the need of expensive instruments because they help to select only those samples with analyte levels “similar to” or “higher than” a previously established cut-off level. Thus only those “probably polluted” samples must be further examined with more exact instrumental methods.

3.2.1. Cut-off level and threshold value

The cut-off level is a critical parameter for screening methods. Such level is generally established by legal requirements when it is related to toxic compounds for human health.

When the three xylenes were injected in the screening MIP-optosensor, *m*-xylene showed the lowest signal. Therefore, in order to decrease the number of false negatives, which is the most important parameter of the reliability of this kind of screening, we selected *m*-xylene as target analyte for the establishment of the cut-off level.

The maximum contaminant level (MCL) established by US Environmental Protection Agency (EPA), according to the decree 816-F-09-004 (May 2009), for xylenes in drinking water is $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ (sum of the three isomers). Thus we set this value as cut-off level.

In order to determine the threshold value of the cut-off level, 10 injections of $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ *m*-xylene were injected and their relative fluorescence intensities were measured. The threshold value was 48.9 ± 2.6 a.u. (95% confidence level, $n= 10$). According to this, water samples whose fluorescent intensities are higher than the threshold value will be considered as contaminated. However, water samples with fluorescent intensities lower than the threshold value will be selected as uncontaminated.

3.2.2. Reliability of the screening test

Several quality parameters can be utilised to establish the reliability of a screening test. We used the percentage of false positives and false negatives through a simple chemometric study [31], as parameter of the reliability of our proposed screening system. It is simple and the most popular quality parameter used in analytical chemistry to establish the reliability of a screening test [29, 32, 35]. A false positive corresponded to a water sample containing a xylene concentration lower than the cut-off level but giving a positive response. However, a

false negative corresponded to a water sample with a xylene concentration higher than the cut-off level giving a negative response.

The philosophy of the proposed optosensing screening test is to detect those samples which could be “probably polluted” in order to reduce the number of samples which have to be further examined with more exact instrumental methods. Therefore, the percentage of false negatives is the most important parameter of the reliability of the screening test because it indicates the percentage of number of polluted samples which are going to be considered as non-polluted.

Thirty water samples were used to establish the reliability of the screening test. A design for the composition of the water samples was performed in the screening system. Table 1 shows the xylene content of each sample, and both theoretical and experimental responses to the screening test: YES means contaminated sample and NO means uncontaminated sample. To establish which samples are contaminated or not the US-EPA regulations have been used. US-EPA considers that water is contaminated by xylenes when samples contain a concentration equal or higher of $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ of xylenes (sum of the three isomers). The results of the screening test were: 23% false positives and 0% false negatives. Thus, all the contaminated samples were detected by the screening test, demonstrating that the proposed method could be used for the screening of xylenes in water samples.

3.2.3. Confirmation of reliability by analyzing real water samples

A total of nine real water samples were used to confirm the applicability of the screening test. Different types of real water samples, as bottled, tap and river waters, were analysed. None of them contained xylenes, so all the samples were spiked with different concentrations of xylenes. Table 2 shows the concentration of xylenes added to each sample and the response of the screening test. The results were similar to those obtained with stock solutions (prepared with bidistilled water): 0% false positives and 0% false negatives. Therefore, it is possible to conclude that the proposed screening test could be used in routine labs to discriminate between xylene contaminated and uncontaminated samples, decreasing the number of samples which have to be analysed by a more accurate but tedious and expensive analytical method.

4. Conclusions

The results presented here demonstrate that the screening MIP-optosensor developed by our research group can be also used for detecting xylene polluted waters. The reduction of the injection volume increases the selectivity of the proposed optosensor allowing the selective determination of the three isomers of xylene and avoiding the interference of the other compounds of the TEX family. Response times were short and the reproducibility and repeatability obtained with the MIP was high.

The screening MIP-optosensor recognised contaminated water samples very quickly and inexpensively with a cut-off level of $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ for *m*-xylene and a threshold value of 48.9 ± 2.6 a.u.. The test ran without the need for any pre-concentration step, being suitable for routine use in water-quality control and in environmental laboratories. The reliability of the screening test was established showing 23% false positives and 0% false negatives for 30 samples. To demonstrate the applicability of the test, 9 real water samples were analysed obtaining 0% false positives and 0% false negatives. In both cases, the percentage of false negatives was 0%; all the contaminated samples (19 of 39) were detected by the screening MIP-optosensor. Thus, it has been successfully used in the determination of xylenes in drinking water, and it could be an important alternative to the routine labs for reducing the number of samples which have to be analysed by more expensive techniques.

Acknowledgements

The Spanish Ministry of Education and Science (Project CTQ2008-01394) and the Regional Government of Andalusia (Excellence projects P07-FQM-2738 and P07-FQM-2625) are thanked for the financial support of this work.

References

- [1] L.M.L. Nollet (Ed.), Handbook of Water Analysis. Marcel Dekker, New York (Chapter 33), 2001.
- [2] R.M. Alberici, C.G. Zampronio, R.J. Poppi, M.N. Eberlin, *Analyst*, 127 (2002) 230.

- [3] C.T. Chiou, D.W. Schmedding, M. Manes, *Environmental Science & Technology*, 16 (1982) 4.
- [4] V.I. Beketov, V.Z. Parchinskii, N.B. Zorov, *Journal of Chromatography A*, 731 (1996) 65.
- [5] M. Rosell, S. Lacorte, A. Ginebreda, D. Barcelo, *Journal of Chromatography A*, 995 (2003) 171.
- [6] F. Bianchi, M. Careri, E. Marengo, M. Musci, *Journal of Chromatography A*, 975 (2002) 113.
- [7] B. Hauser, P. Popp, *Journal of Chromatography A*, 909 (2001) 3.
- [8] J.C. Florez Menendez, M.L. Fernández Sánchez, J.E. Sánchez Uría, E. Fernández Martínez, A. Sanz-Medel, *Analytica Chimica Acta*, 415 (2000) 9.
- [9] P. Prikryl, R. Kubinec, H. Jurdakova, J. Sevcik, I. Ostrovsky, L. Sojak, V. Berezkin, *Chromatographia*, 64 (2006) 65.
- [10] E. Aguilera-Herrador, R. Lucena, S. Cárdenas, M. Valcárcel, *Journal of Chromatography A*, 1201 (2008) 106.
- [11] A. Sarafraz-Yazdi, A.H. Amiri, Z. Es'haghi, *Talanta*, 78 (2009) 936.
- [12] J.X. Wang, D.Q. Jiang, X.P. Yan, *Talanta*, 68 (2006) 945.
- [13] A. Sarafraz-Yazdi, A.H. Amiri, Z. Es'haghi, *Chemosphere*, 71 (2008) 671.
- [14] C.M.M. Almeida, L.V. Boas, *Journal of Environmental Monitoring*, 6 (2004) 80.
- [15] I. Arambarri, M. Lasa, R. Garcia, E. Millan, *Journal of Chromatography A*, 1033 (2004) 193.
- [16] J. Ji, C. Deng, W. Shen, X. Zhang, *Talanta*, 69 (2006) 894.
- [17] M.-R. Lee, C.-M. Chang, J. Dou, *Chemosphere*, 69 (2007) 1381.
- [18] F. Tsow, E. Forzani, A. Rai, R. Wang, R. Tsui, S. Mastroianni, C. Knobbe, A.J. Gandolfi, N.J. Tao, *Ieee Sensors Journal*, 9 (2009) 1734.
- [19] J.F. Fernandez-Sanchez, A. Segura-Carretero, J.M. Costa-Fernandez, N. Bordel, R. Pereiro, C. Cruces-Blanco, A. Sanz-Medel, A. Fernandez-Gutierrez, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 377 (2003) 614.
- [20] J.F. Fernandez-Sanchez, A.S. Carretero, C. Cruces-Blanco, A. Fernandez-Gutierrez, *Talanta*, 60 (2003) 287.
- [21] J.F. Fernandez-Sanchez, A.S. Carretero, C. Cruces-Blanco, A. Fernandez-Gutierrez, *Analytica Chimica Acta*, 506 (2004) 1.

- [22] T. Alizadeh, M.R. Ganjali, P. Norouzi, M. Zare, A. Zeraatkar, *Talanta*, 79 (2009) 1197.
- [23] F.L. Dickert, M. Tortschanoff, W.E. Bulst, G. Fischerauer, *Analytical Chemistry*, 71 (1999) 4559.
- [24] J.X. Liu, H. Chen, Z. Lin, J.M. Lin, *Analytical Chemistry*, 82 (2010) 7380.
- [25] A.L. Medina-Castillo, G. Mistlberger, J.F. Fernandez-Sanchez, A. Segura-Carretero, I. Klimant, A. Fernandez-Gutierrez, *Macromolecules*, 43 (2010) 55.
- [26] I. Sanchez-Barragan, J.M. Costa-Fernandez, R. Pereiro, A. Sanz-Medel, A. Salinas, A. Segura, A. Fernandez-Gutierrez, A. Ballesteros, J.M. Gonzalez, *Analytical Chemistry*, 77 (2005) 7005.
- [27] A. Valero-Navarro, P.C. Damiani, J.F. Fernandez-Sanchez, A. Segura-Carretero, A. Fernandez-Gutierrez, *Talanta*, 78 (2009) 57.
- [28] A. Valero-Navarro, A. Salinas-Castillo, J.F. Fernandez-Sanchez, A. Segura-Carretero, R. Mallavia, A. Fernandez-Gutierrez, *Biosensors & Bioelectronics*, 24 (2009) 2305.
- [29] R.A.C. Lima, S.R.B. Santos, R.S. Costa, G.P.S. Marcone, R.S. Honorato, V.B. Nascimento, M.C.U. Araujo, *Analytica Chimica Acta*, 518 (2004) 25.
- [30] B. San Vicente de la Riva, J.M. Costa-Fernandez, R. Pereiro, A. Sanz-Medel, *Analytica Chimica Acta*, 451 (2002) 203.
- [31] M. Valcárcel, S. Cárdenas, M. Gallego, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 18 (1999) 685.
- [32] A. Valero-Navarro, J.F. Fernandez-Sanchez, A.L. Medina-Castillo, F. Fernandez-Ibanez, A. Segura-Carretero, J.M. Ibanez, A. Fernandez-Gutierrez, *Chemosphere*, 67 (2007) 903.
- [33] F.J. Sainz-Gonzalo, A.L. Medina-Castillo, J.F. Fernández-Sánchez, A. Fernández-Gutiérrez, *Biosensors and Bioelectronics*, 26 (2010) 3331.
- [34] A.L. Medina-Castillo, J.F. Fernandez-Sanchez, A. Segura-Carretero, A. Fernandez-Gutierrez, *Biosensors & Bioelectronics*, 25 (2009) 442.
- [35] C.C. Nascentes, S. Cárdenas, M. Gallego, M. Valcárcel, *Analytica Chimica Acta*, 462 (2002) 275.

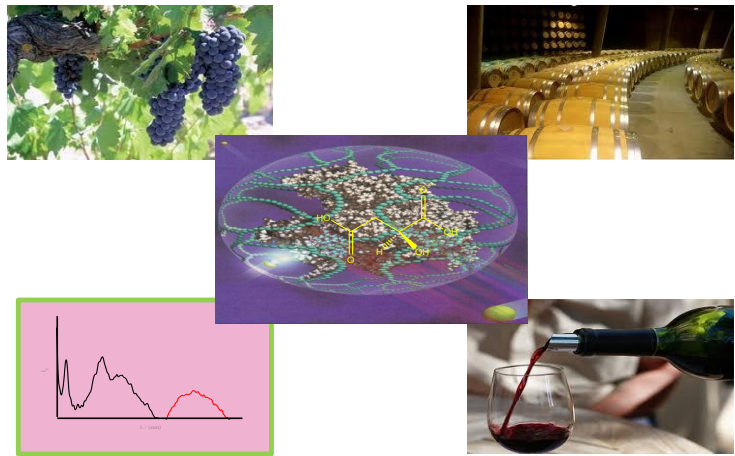
IV.BI.9. Resumen de resultados del bloque I

1. Se ha sintetizado un polímero de impronta molecular (MIP) por la técnica de polimerización en disolución. Tanto el porógeno como las condiciones de polimerización fueron los factores clave para su síntesis. El MIP fue implementado en un optosensor convencional con detección fluorescente, y se optimizaron los parámetros FIA e instrumentales. La eliminación de interferencias se llevó a cabo ajustando las muestras de agua a pH 11.0 y utilizando una disolución portadora de NaCl 1.0 mol L⁻¹. El optosensor fue utilizado para desarrollar un test de “screening” de TEXs en agua de consumo humano.

El test estableció un valor umbral de 8.27 ± 0.57 u.a. para un nivel de corte de 700 $\mu\text{g L}^{-1}$ de etilbenceno. La fiabilidad del test de “screening” mostró un 32% de falsos positivos y un 0% de falsos negativos, para un total de 50 muestras. Para demostrar la aplicabilidad del test, se analizaron 15 muestras de agua reales, obteniéndose un 20% de falsos positivos y un 0% de falsos negativos.

2. Se ha utilizado el optosensor convencional desarrollado, basado en el MIP de screening sintetizado en el capítulo 1, para la detección de xilenos en agua. La reducción del volumen de inyección de muestra permitió la detección selectiva de los tres xilenos, evitando de este modo, las interferencias producidas por los otros compuestos de la familia TEXs. El optosensor fue empleado para llevar a cabo un test de “screening” de xilenos en muestras de agua. Los tiempos de respuesta fueron cortos (50 s), así como la reproducibilidad y la repetibilidad obtenidas fueron elevadas.

El nivel de corte seleccionado para el test de “screening” fue de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ de *m*-xileno, el cual proporcionó un valor umbral de 48.9 ± 2.6 u.a. El estudio de la fiabilidad del test estableció un 23% de falsos positivos y un 0% de falsos negativos para un total de 30 muestras. Para demostrar la aplicabilidad del test, se analizaron 9 muestras de agua reales; produciéndose en este caso, la ausencia de falsos positivos y falsos negativos.



BLOQUE II

DESARROLLO DE UNA FASE SENSORA FLUORESCENTE PARA LA DETERMINACIÓN DE ÁCIDO L-MÁLICO EN VINOS

IV.BII. DESARROLLO DE UNA FASE SENSORA FLUORESCENTE PARA LA DETERMINACIÓN DE ÁCIDO L-MÁLICO EN VINOS

IV.BII.1. *Vino. Acidez y componentes*

El jugo de uva y el **vino** son disoluciones ácidas diluidas. Sin los ácidos, el mosto tendría un sabor muy insípido y se estropearía fácilmente, la fermentación daría lugar a productos poco satisfactorios y el vino resultante se echaría a perder rápidamente, proporcionando un color pobre y un sabor insípido (sin paladar).

Hay muchas formas de clasificar los componentes del vino. Una de ellas¹ lo hace según el aroma y el sabor del vino. Los sabores que los componentes proporcionan al vino pueden dividirse en: ácido, azucarado, amargo y salado. La Tabla 2 muestra los ácidos presentes en el vino y su origen.

Tabla 2. Ácidos presentes en el vino y su origen.

| Origen | Ácido | Tipo de acidez | Acidez |
|--------------|-----------|----------------|--------|
| Uva | Tartárico | Fija | Total |
| | Málico | | |
| | Cítrico | | |
| Fermentación | Succínico | Volátil | |
| | Láctico | | |
| | Acético | | |

El **contenido ácido del vino** es importante desde el punto de vista del sabor e, indirectamente, por sus efectos sobre el pH, el color, la estabilidad y la vida media del producto. Dentro de los ácidos procedentes de la uva, los más importantes son el ácido tartárico y el **ácido málico**. Los ácidos fijos dan sabor al vino pero no

intervienen en el aroma. El ácido acético, al ser volátil, produce picor en el vino, siendo un defecto para el mismo.

IV.BII.2. Ácido málico

IV.BII.2.1. Introducción y características

El ácido málico, además de ser uno de los **principales ácidos de las uvas**, posee un enorme interés desde el punto de vista fisiológico². A temperaturas altas (40.5 °C) lo exhalan las uvas, fenómeno que no ocurre con el tartárico a menos que la temperatura suba hasta 57.2 °C. Consecuentemente, durante los meses de julio y agosto disminuye el contenido en ácido málico del fruto, tanto relativa como absolutamente. Al comienzo de la sazón, el contenido de ácido málico puede alcanzar hasta el 60% de la fracción ácida de la uva; mientras que en el comienzo de la madurez puede variar entre el 10% y el 40% de dicha fracción. Por ello, el ácido málico tiene concentraciones en la uva desde 1 g L⁻¹ hasta 4 g L⁻¹, siendo éste el responsable del sabor verde y ácido de las mismas. También cabe destacar que el **ácido L-málico** es el isómero existente en la naturaleza. En la Figura 30 se representa la estructura química del ácido L-málico.

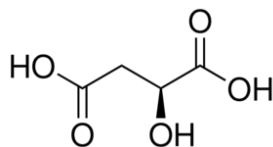


Fig. 30. Estructura química del ácido L-málico.

Por otra parte, el ácido málico tiene un gran significado en el vino, ya que es más vulnerable al ataque de los microorganismos que los ácidos tartárico o succínico. En Europa se utiliza con frecuencia cierto tipo de ataque bacteriano con la finalidad de reducir la acidez excesiva del vino. Sin embargo, si dicho ataque no se controla, se reduce indebidamente la acidez total, dando como resultado vinos insípidos.

El contenido en ácido málico de los vinos está influenciado por el desarrollo, o no, de la **fermentación maloláctica (FML)**. En las regiones frías, o años fríos, las variedades con acidez málica elevada pueden dar lugar a vinos que contengan 5 g L^{-1} o más, si no se llega a producir la FML.

IV.BII.2.2. Determinación de ácido málico

Para controlar la FML es necesaria la realización de una determinación diaria de ácido málico. Por ejemplo, para una bodega mediana que posea 30 depósitos de vinificación, es inevitable la presencia de un analista exclusivamente dedicado a dichos análisis de rutina. Por tanto, se podría conseguir un control más efectivo si se dispone de sistemas automáticos de determinación de ácido málico, lo que lleva a pensar en el empleo de sensores químicos.

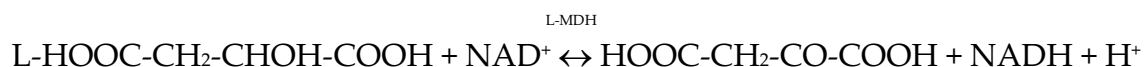
A continuación, se van a describir los métodos de análisis basados en sistemas más o menos automáticos que permitan derivar en un sensor. La determinación de ácido málico se realiza mayoritariamente por reacciones enzimáticas. Se han desarrollado dos **métodos enzimáticos**, los cuales parecen ser más rápidos que los métodos convencionales y estar menos sujetos a errores de manipulación:

- **Fermentación con *Schizosaccharomyces pombe*:** En este método³ se transforma cuantitativamente el ácido málico en etanol y dióxido de carbono por fermentación con la levadura *Schizosaccharomyces pombe*:

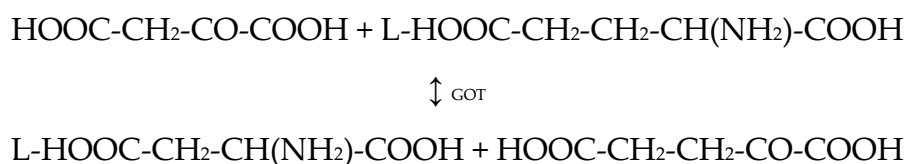


La cantidad de ácido málico se obtiene determinando la acidez total antes y después de la fermentación con *Schizosaccharomyces pombe*.

- **Reacción con L-malato deshidrogenasa:** En este método^{4,5} se utiliza el enzima L-malato deshidrogenasa (L-MDH) para catalizar la reacción de apertura común entre el ácido málico y el dinucleótido nicotinamida adenina (NAD⁺), formándose oxalacetato y la forma reducida del dinucleótido (NADH):



Aunque cambia la forma de detectar el NADH formado: espectroscópica o electroquímicamente. El equilibrio de esta reacción se encuentra muy desplazado hacia la izquierda en condiciones termodinámicas estándar⁶ ($\Delta G^0 = 29.7 \text{ KJ mol}^{-1}$). Para favorecer dicho equilibrio existen dos posibilidades: (1) fijando el ácido oxalacético con hidracina en disolución alcalina o (2) utilizando una reacción acoplada^{7,8} de oxalacetato y L-glutamato en presencia de glutamato-oxalacetato transaminasa (GOT) para dar L-aspartato y α -cetoglutarato:



El alcance de la reacción se mide espectroscópicamente por el aumento de la absorbancia a 340 nm debido a la formación del NADH. Con todo ello, los resultados se deben interpretar con precauciones, ya que está demostrado que el enzima L-MDH no es totalmente específico.

En cuanto a las propiedades espectroscópicas del NADH, se emplean mayoritariamente las de absorción molecular^{4,9}, sin desdeñar las luminiscentes^{10,11}. Las propiedades electroquímicas del NADH pasan por considerar su actuación como agente reductor en una segunda reacción enzimática^{8,12}.

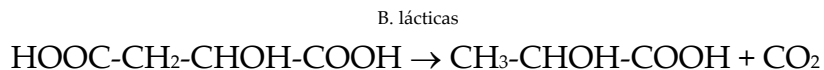
IV.BII.3. *Fermentación maloláctica del vino*

La disminución de la acidez total en vinos ricos en ácido málico ha constituido desde comienzos del siglo XX, uno de los procesos biológicos más estudiados en enología.

Mientras en el vino exista un contenido de ácido málico superior a 0.4 g L⁻¹, apenas existe riesgo de que las bacterias perjudiciales transformen los azúcares residuales en ácido acético. Sin embargo, en la situación contraria, este problema puede resultar acuciante, y es crucial evitarlo mediante la adición controlada de SO₂(aq), proceso que también detiene la FML, la cual resulta de interés para obtener **un vino de calidad**. El momento preciso de la adición es crítico, por lo que se pone de manifiesto la necesidad de controlar intensamente los parámetros de la FML.

Después de la fermentación alcohólica, ocurren otras transformaciones biológicas que determinan el acabado de un vino. La más importante de estas transformaciones se denomina **fermentación maloláctica**. Se puede definir como *un*

proceso bioquímico que se produce por la acción de las bacterias lácticas, cuya reacción global es la transformación del ácido málico en ácido láctico:



Con ella se produce un afinamiento del vino, siendo más pulido y más “mantecoso”. Por otro lado, el vino se tornará más estable después de la FML. En la Figura 31 se representan las vías metabólicas que pueden estar implicadas en dicha transformación¹³ así como los correspondientes enzimas. Mediante las bacterias lácticas, la **descarboxilación** del ácido málico en láctico transcurre mediante una reacción directa catalizada por el enzima maloláctica.

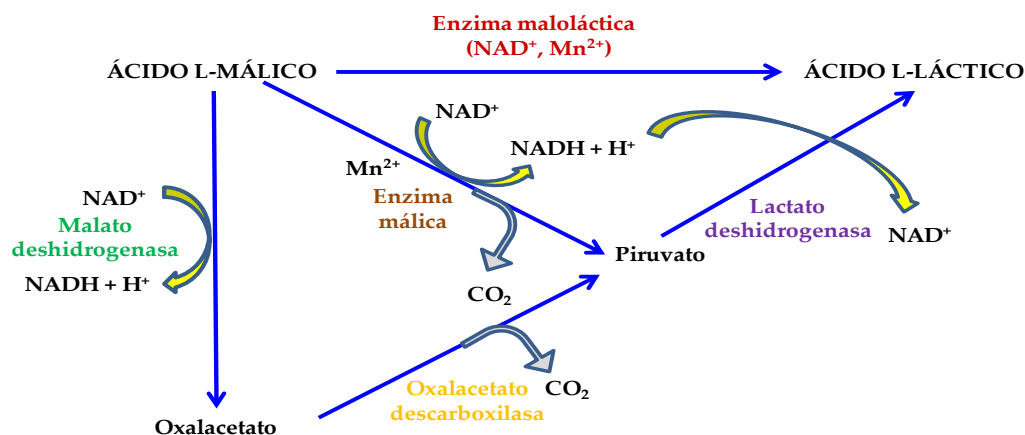


Fig. 31. Posibles rutas metabólicas del ácido L-málico.

Se pueden encontrar bacterias lácticas en los hollejos, hojas y sarmientos, o incluso, en el equipamiento dentro de la bodega; también pueden adquirirse cultivos artificiales. Las especies encontradas en el mosto¹³ son muy numerosas y pertenecen a los géneros: *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* y *Oenococcus*.

La FML puede producirse en un período de unas semanas o prolongarse durante varios meses, dependiendo de muchos factores. Algunos de ellos, se describen en el siguiente apartado.

IV.BII.3.1. Factores que influyen en la FML

Una vez que los factores externos a la bodega hayan sido tenidos en consideración (técnicas de cultivo de vid, variedades de uva, factores biológicos, etc.), la FML puede verse influenciada y, por tanto, controlada dentro de la bodega por los siguientes factores¹⁴:

- ✿ **El pH del vino:** Tanto pHs bajos como altos inhiben el crecimiento de las bacterias lácticas, y por lo tanto, la FML; especialmente cuando están por debajo de 3.0 o por encima de 4.5.
- ✿ **Temperatura:** Las bacterias lácticas crecen y se desarrollan mejor con temperaturas cálidas (20 °C y superiores), temperaturas más frías (por debajo de 15 °C) provocarían que la FML se detuviese.
- ✿ **Dióxido de azufre:** Las bacterias lácticas son muy sensibles a este compuesto. Por ello, su adición previene la FML. Como el SO₂ es volátil, su disminución puede provocar el desencadenamiento de la FML.
- ✿ **Etanol:** Un contenido elevado de alcohol previene la FML, pues éste destruye las bacterias lácticas. Por ello, si se inoculan bacterias para realizar la FML pronto, se suele llevar a cabo justo después de que haya comenzado la fermentación alcohólica, ya que los niveles de alcohol son todavía relativamente bajos, las temperaturas son altas y el SO₂ se ha evaporado.

- ✿ **Micronutrientes:** Es evidente que las bacterias lácticas necesitan suministro de alimentos. Las levaduras muertas (lías) representan una fuente importante de nutrientes. Debido a ello, el removido de las lías era originalmente llevado a cabo para contribuir al comienzo de la FML, aunque actualmente posea otras funciones que son más importantes que causar la FML.
- ✿ **Otros factores influyentes** son el nivel de oxígeno disuelto, ácidos orgánicos, taninos y otros polifenoles, levaduras y tipología de éstas, envejecimiento en barrica, así como factores técnicos tales como: la vinificación a temperatura controlada, desfangado, escurrido, tiempo de maceración, remontado, trasegado, clarificación y filtrado, etc.

IV.BII.3.2. Efectos de la FML sobre el tipo de vinos

La realización de la FML¹³ origina un nuevo perfil sensorial del vino, manifestado particularmente en mejoras gustativas, cambios aromáticos y sensibles modificaciones del color.

Los **efectos más importantes** de la FML, según la tipología de los vinos, son:

- **Tintos:** Los vinos tintos son normalmente más estructurados, ácidos y tánicos que los blancos, y generalmente, necesitan ser suavizados. El uso de compuestos sulfatados y nitrógeno permite prevenir que estos vinos sufran la FML, manteniéndolos lo más frescos posibles para su consumo inmediato.
- **Blancos:** Son afrutados, frescos, ligeramente ácidos y ligeros para consumo joven, por lo que se impide que pasen por la FML. Los vinos envejecidos o

fermentados en barrica, que precisan de un estilo más graso, complejo y de taninos más suaves, deben ser sometidos a la FML.

- **Espumosos:** Son elaborados mediante el método tradicional y soportan una fermentación en botella con levaduras anaerobias, desprendiéndose CO₂ en el interior de la botella, por lo que generalmente se previenen de soportar la FML, ya que brindarán aromas y sabores más frescos en vinos jóvenes.
- **Generosos:** Son vinos encabezados con alcohol, por lo que son inmunes a que ocurra la FML. Pero algunos tipos de vinos generosos hacen la FML antes de ser encabezados, para suavizarlos y que los taninos se integren.

IV.BII.4. Bibliografía del bloque II

1. Zoecklein, B. W.; Fugelsang, K. C.; Gump, B. H.; Nury, F. S., *Análisis y producción de vino*. Acribia: **2000**.
2. Amerine, M. A.; Ough, C. S., *Análisis de vinos y mostos*. Acribia: **1976**.
3. Peynaud, E.; Lafonlaf, S., Study of a simple method of quantitative determination of malic acid applied to wines using *Schizosaccharomyces pombe*. *Annales De Technologie Agricole* **1965**, 14 (1), 49-52.
4. Lima, J.; Lopes, T.; Rangel, A., Enzymatic determination of L(+) lactic and L(-) malic acids in wines by flow-injection spectrophotometry. *Analytica Chimica Acta* **1998**, 366 (1-3), 187-191.
5. Maines, A.; Prodromidis, M. I.; Tzouwara-Karayanni, S. M.; Karayannis, M. I.; Ashworth, D.; Vadgama, P., Reagentless enzyme electrode for malate based on

- modified polymeric membranes. *Analytica Chimica Acta* **2000**, 408 (1-2), 217-224.
6. Lehninger, A.; Nelson, D.; Cox, M., *Principios de Bioquímica*. 2^o ed.; Omega: **1993**.
 7. Messia, M. C.; Compagnone, D.; Esti, M.; Palleschi, G., A bienzyme electrode probe for malate. *Analytical Chemistry* **1996**, 68 (2), 360-365.
 8. Prodromidis, M. I.; TzouwaraKarayanni, S. M.; Karayannis, M. I.; Vadgama, P.; Maines, A., Amperometric determination of L-malic acid in a flow injection analysis manifold using packed-bed enzyme reactors. *Analyst* **1996**, 121 (4), 435-439.
 9. Li, C. I.; Lin, Y. H.; Shih, C. L.; Tsaur, J. P.; Chau, L. K., Sol-gel encapsulation of lactate dehydrogenase for optical sensing of L-lactate. *Biosensors & Bioelectronics* **2002**, 17 (4), 323-330.
 10. Williams, A. K.; Hupp, J. T., Sol-gel encapsulated alcohol dehydrogenase as a versatile, environmentally stabilized sensor for alcohols and aldehydes. *Journal of the American Chemical Society* **1998**, 120 (18), 4366-4371.
 11. Tsukatani, T.; Matsumoto, K., Quantification of L-tartrate in wine by stopped-flow injection analysis using immobilized D-malate dehydrogenase and fluorescence detection. *Analytical Sciences* **2000**, 16 (3), 265-268.
 12. Janarthanan, C.; Mottola, H. A., Enzymatic determinations with rotating bioreactors: Determination of glutamate in food products. *Analytica Chimica Acta* **1998**, 369 (1-2), 147-155.

13. Moreno-Arribas, M. V., La fermentación maloláctica y su repercusión en la calidad del vino. *Tecnología del vino: Tratamientos y equipos para viticultura y enología* **2003**, *14*, 52-57.
14. Fernández, P. M., Estudio de la fermentación maloláctica en vinos: Su naturaleza y factores que intervienen en su desarrollo. *Alimentación, equipos y tecnología* **1991**, *10* (2), 117-124.

IV.BII.5. Objetivo del bloque II

El objetivo principal de este bloque experimental es el diseño y desarrollo de una fase sensora mediante la tecnología sol-gel que permita la determinación de ácido málico en vino. Los parámetros experimentales, tanto de la preparación de la fase sensora como de la disolución que contiene el ácido málico serán investigados. Además, se estudiará la capacidad de regeneración de la misma. Una vez optimizada, se evaluarán las características analíticas (linealidad, estabilidad, reproducibilidad,...) y las posibles interferencias que pudieran afectar a la determinación de ácido málico. Finalmente, la fase sensora se aplicará a la determinación del contenido de ácido málico en diferentes tipos de vinos naturales.

El trabajo de investigación de este bloque experimental ha sido llevado a cabo en el área de Química Analítica del Departamento de Química de la Universidad de La Rioja.

IV.BII.6. *Capítulo del bloque II*

Este bloque experimental se ha concretado en el siguiente trabajo y capítulo:

Capítulo 3: Fluorescent sensing layer for the determination of L-malic acid in wine. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2007, 387 (6), 2297-2305.

IV.BII.7. Capítulo 3: *Fluorescent sensing layer for the determination of L-malic acid in wine*

Fluorescent sensing layer for the determination of L-malic acid in wine

Félix Gallarta, Francisco Javier Sainz, Cecilia Sáenz*

Department of Chemistry, Laboratory of Analytical Chemistry, University of La Rioja, Madre de Dios 51, 26006 Logroño, Spain

Abstract An enzymatic method for determining L-malic acid in wine based on a L-malate sensing layer with nicotinamide adenine dinucleotide (NAD⁺), L-malate dehydrogenase (L-MDH) and diaphorase (DI) immobilized by sol-gel technology was constructed and evaluated. The sol-gel glass was prepared with tetramethoxysilane (TMOS), water and HCl. L-MDH catalyzes the reaction between L-malate and NAD⁺, producing NADH, whose fluorescence ($\lambda_{\text{exc}}= 340 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}}= 430 \text{ nm}$) could be directly related to the amount of L-malate. NADH is converted to NAD⁺ by using hexacyanoferrate(III) as oxidant in presence of DI. Some parameters affecting sol-gel encapsulation and pH of enzymatic reaction were studied. The sensing layer has a dynamic range from 0.1 g/L to 1.0 g/L of L-malate and has a long-term storage stability of 25 days. It presents an acceptable reproducibility [$s_r(\%) \approx 10$] and six regenerations. The content of L-malic acid was determined in different types of wine and polyvinylpyrrolidone (PVPP) was used as bleaching agent with red wines. The results obtained in wine samples by the sensing layer are comparable to those obtained from a reference method based on UV-VIS Molecular Absorption Spectrometry, if the matrix effect is corrected.

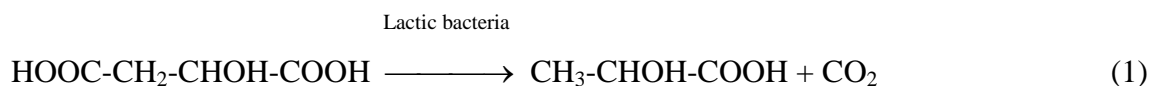
Keywords Sensing layer; L-malate dehydrogenase; Sol-gel; L-malate; Wines

* Corresponding author. Tel.: +34 941299633; fax: +34 941299621.

E-mail address: cecilia.saenz@dq.unirioja.es (Cecilia Sáenz).

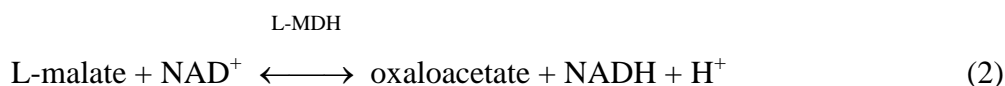
Introduction

L-malic acid is widely distributed in small amounts in many natural foods, especially fruits and vegetables [1]. It contributes to the flavour and taste of fresh fruit, fruit juices [2] and other drinks; and it is an indicator of wine maturation during the fermentation process. Consequently, malic acid is frequently determined in enological laboratories by thin layer chromatography (TLC), as it strongly influences the quality of the wines [3, 4]. During malolactic fermentation, malic acid is converted into lactic acid (1) by lactic bacteria and the wine becomes mellow with a refined bouquet. This fermentation can be controlled and it is necessary for the production of good-quality red wines, although it should be avoided in the case of certain dry white wines.

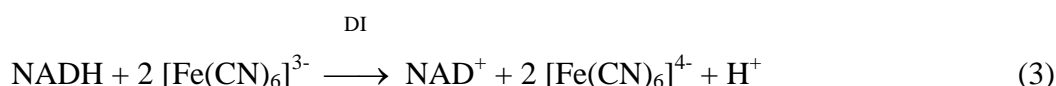


Malic acid in wines has been determined by gas chromatography [5], liquid chromatography [6, 7], ion chromatography [8], capillary isotachopheresis [9], mass spectrometry [10] and Fourier transform infrared spectrometry (FTIR) [11]. These methods have long analysis times, extensive sample preparation and expensive instrumentation. Due to these disadvantages, its determination is frequently performed by enzymatic methods [12, 13] because enzymes are good in terms of selectivity and sensitivity.

Enzymatic biosensors [14-16] have been developed in order to minimize these disadvantages, automate these determinations and simplify the analytical procedure. They present specificity of reaction, no consumption of immobilized enzymes and reagents, limited sample perturbation, good rate of reaction in optimal conditions and ease of miniaturization. As a result, this type of sensors has attracted great interest in the last decade. The enzymatic mechanism [16] in the sensing layer uses the biochemical reaction (2) of malate recognition by means of the L-malate dehydrogenase enzyme (L-MDH). L-malate dehydrogenase reversibly catalyzes this equilibrium [17], which strongly favours the formation of L-malate. Displacement of the equilibrium towards the right was assisted by increasing the pH. Usually, the detection of NADH is used as analytical signal.

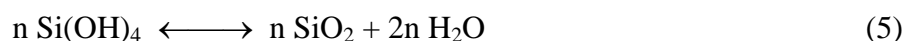
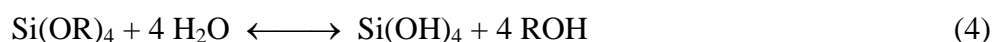


A second reaction (3) regenerates the oxidized form of the NAD^+ cofactor through the hexacyanoferrate(III) oxidant catalyzed by the diaphorase enzyme (DI).



The type of enzyme immobilization [18] is an important aspect of sensor construction. Physical immobilization is used to retain biomolecules because it is a very simple process and these conserve their physical and chemical properties. In this study, the immobilization of the biomolecules was achieved by encapsulation in a silica sol-gel matrix [19]. Sol-gel derived glasses have received considerable attention for the manufacture of chemical and biochemical sensors [19-24] because the encapsulated molecules retain their chemical stability and functional activity. The porous nature of the sol-gel glass allows the diffusion of the analyte molecules into the gel where the reaction takes place. The reaction was detected by measuring the fluorescence [21, 22] of NADH formed in the gel.

The sol-gel glasses are obtained by hydrolysis (4) and condensation (5) at room temperature of tetraalkoxysilanes [$\text{Si}(\text{OR})_4$, precursor] in hydroalcoholic solutions.



The following steps, gelation and aging, make a porous and optically transparent glass. During the gelation process, enzymes and other reagents are added to the hydroalcoholic solution to obtain enzyme-reagents-doped sol-gel glass. A large number of factors [25] affect the resulting sol-gel characteristics. Of these factors, two are the most important: formation pH of sol-gel and water/precursor ratio. Other less important factors are temperature, solvent, surfactants, etc. The entrapment of a reagent in a sol-gel glass is an attractive immobilization method, because it is carried out at room temperature and due to its simplicity, good stability, optical transparency and possibility for entrapping a wide variety of reagents at high concentrations in different geometrical forms. The disadvantages of this method are large

response times, reagent losses by lixiviation and continuous condensation during aging which reduces the diffusion of analytes across the sol-gel. This process has been used to immobilize enzymes (dehydrogenases [21, 22], oxidase [23], peroxidase [26]), dyes [24, 27] and metallic ions [28, 29].

This paper describes an optical malate sensing layer with co-immobilized MDH/NAD⁺/DI biomolecules, which were encapsulated in a sol-gel glass. A fluorimetric procedure was used to monitor the formation of NADH (2). The regeneration of NAD⁺ was achieved by hexacyanoferrate(III) oxidant (3). The sensing layer was applied to determine L-malic acid in wines.

Experimental

Chemicals

All chemicals were of analytical reagent grade. Tetramethoxysilane (TMOS) was purchased from Merck (Schuchardt, Germany). Hydrazine sulphate was purchased from Merck (Darmstadt, Germany). L-malate dehydrogenase (oxaloacetate decarboxylating, L-MDH, EC 1.1.1.37 from pig heart, 12.5 mg protein/mL, 484 units/mg protein), β -nicotinamide adenine dinucleotide (β -NAD⁺, from yeast, 99 %), diaphorase (DI, EC 1.8.1.4, from *Clostridium kluveri*, 5.2 units/mg solid), gelatine (Type B, from bovine skin, 225 bloom) were obtained from Sigma (Steinheim, Germany). Polyvinylpyrrolidone (PVPP) was obtained from Sigma (St Louis, MO, USA). L-malic acid was purchased from Fluka (Buchs SG, Switzerland). Ethylenediamine-tetraacetic acid disodium salt di-hydrate was obtained from Farmitalia Carlo Erba (Milano, Italy). Crystallized tartaric acid, disodium hydrogen phosphate, potassium hexacyanoferrate(III), potassium di-hydrogen tartrate and sodium sulphite were purchased from Probus (Badalona, Spain). Active coal, glycine, potassium di-hydrogen phosphate, sodium carbonate, sodium hydrogen carbonate and potassium citrate hepta-hydrate were obtained from Panreac (Barcelona, Spain). All other chemicals used were of reagent grade and obtained from Panreac.

Reagents and buffers

All reagents were used without further purification and aqueous solutions were prepared using purified water obtained from standard Milli-Q system (Millipore, Molsheim, France). Buffers and bulk solutions of malate, hexacyanoferrate(III), etc., were prepared weekly. Solutions containing biomolecules, such as enzymes or cofactor, were prepared daily.

Instrumentation

All fluorescent measurements were made with a LS 50B Perkin Elmer luminescence spectrophotometer equipped with a front surface accessory (Perkin Elmer, Beaconsfield, England). All absorbance measurements were performed with U-2001 UV-VIS Hitachi spectrophotometer (Hitachi, San Jose, USA). The 101-QS and 100-QS suprasil quartz cuvettes (light path= 10.0 mm) for measuring fluorescence and absorbance in solution, respectively, were purchased from Hellma (Hellma, Jamaica, NY). Sonication process was achieved using a Selecta ultrasounds bath (J.P. Selecta S.A., Abrera, Spain).

Characterization of analytical reaction in solution

The analytical reaction was studied by observing two important parameters that influence its development: type of solution and pH. 1.0 mM NAD^+ solution in 0.025 M phosphate buffer (pH 7.0) was combined at 50 % (V/V) with different solutions (buffered or not buffered, at different pH) containing 1.0 g/L malic acid and then 15 μL (22.5 units/mL) of L-MDH were added. Before and after enzyme addition, fluorescence was measured at excitation and emission wavelengths of 340 and 450 nm, respectively. The same procedure was carried out with 1.0 g/L malate solutions in 0.1 M glycine buffer at different pH (from 6.0 to 13.0).

The sol-gel process

Sol-gel preparation A two-step sol-gel process [26] was used to encapsulate L-MDH, DI and NAD^+ , that were physically entrapped in the growing gel network by polymerization of TMOS. Gels were prepared by making a sol precursor solution containing TMOS (235 μL), water (88 μL) and 0.10 mM HCl (57 μL). The sol solution was sonicated for 30 minutes at 0 °C to facilitate the hydrolysis. The buffered enzymatic solution was prepared by mixing L-

MDH (99 μL , 598.9 units), DI (1.50 mg, 7.8 units) and 1.5 mM NAD^+ in 0.025 M phosphate buffer at pH 7.0 (555 μL). The sol precursor solution (312 μL) and the buffered enzymatic solution (640 μL) were vigorously mixed for a few seconds. This total volume was placed into a half polystyrene cuvette (DispolabKartell 1937 PS Microcuvettes, 10 mm light path) that had been cut through the middle of the grooved sides. The half cuvette was horizontally positioned and its open lateral side was covered with a “Parafilm” barrier to avoid loss of the liquid. Gelation occurs on the ultrasonic bath at 0 °C for approximately 5-10 minutes. The half cuvette was kept horizontally at room temperature in a flask closed with “Parafilm” and aged for 5-6 days. Finally, a film of sol-gel (42 x 10 x 2.5 mm^3) joined to the half cuvette, henceforth called sensing layer, was used to determine the concentration of malate (Fig. 1).

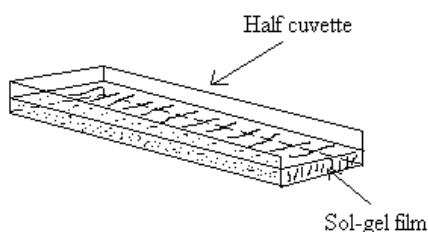


Fig. 1 Schematic diagram of the different parts of the sensing layer

Fluorescence measurements The fluorescence of the sensing layer was measured using the solid accessory of the luminescence spectrophotometer. The fluorimetric properties of NADH ($\lambda_{\text{exc}} = 340 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 430 \text{ nm}$) were obtained with 5 nm excitation and emission slits after the immersion in appropriate solution.

Reaction procedure The “Parafilm” barrier was discarded when the aging step had completed. The sensing layer was washed with water to remove the solvent which had condensed on the surface and was introduced in the blank solution (0.1 M glycine buffer solution at pH 11.0). The sensing layer was washed with water before measuring its fluorescent intensity and was introduced in different malate solutions. During the uselessness and conservation time, the sensing layer was kept in a closed bottle at room temperature.

Regeneration procedure After the measurement of the reaction with malate, the sensing layer was introduced in 1.0 mM potassium hexacyanoferrate(III) solution in 0.025 M phosphate buffer at pH 7.0. The procedure was identical to that described in section 2.5.3.

Calibration methods The external calibration was made from standard solutions of malate (0.1-2.0 g/L) prepared from a mixture (1:1) of synthetic wine and 0.1 M glycine buffer at pH 11.0. Synthetic wine consisted in a solution of malic acid, 12 % (V/V) of ethanol in water and a small amount of tartaric acid to obtain a value of $\text{pH} \approx 3.5$. The blank solution was prepared from a mixture (1:1) of synthetic wine without malic acid and 0.1 M glycine buffer at pH 11.0. Several amounts of malic acid (0 to 0.5 g/L) were spiked to a mixture of wine at pH 11.0 and glycine buffer (pH= 11.0) for obtaining standard-addition calibration. Youden calibration was carried out to detect the presence of matrix effect, increasing volumes of the wine to be analyzed.

Sample treatment All the wines were adjusted at pH 11.0 with 5 M NaOH using a Crison pHmeter (Crison, Alella, Spain). Red wines produced some darkness in the sensing layer, hence a discolouration treatment was applied to them prior to the reaction procedure. The treatment solution was a mixture of red wine at pH 11.0 and 0.1 M glycine buffer at pH 11.0 to which 0.5 g of different bleaching agents as active coal, gelatine or polyvinylpolypyrrolidone (PVPP) were added. The stirring time was 30 seconds and the solution was left for a few seconds before being filtered with N° 40 Whatman filter-paper (Whatman, Maidstone, UK). This discolouration process, except for active coal, was repeated twice to obtain a rather colourless solution, that was used as analysis sample.

Reference procedure

The reference method [30] is based on the measurement of NADH absorbance by fixing oxaloacetate with hydrazine in alkaline solution. The hydrazine-glycine buffer solution was prepared by dissolving glycine (37.5 g), hydrazine sulphate (26.0 g) and EDTA disodium salt di-hydrate (1.0 g) in 250 mL of 2.0 M NaOH solution. The pH of this solution was adjusted to 9.5 with the same NaOH solution and the volume was completed to 500 mL with water. 2.0 mL of buffer solution, 1.0 mL of previously diluted (100-1000 times) wine and 1.0 mL of 10.0 g/L NAD^+ solution, were mixed and the volume was completed to 10 mL with water.

After measuring the absorbance of this solution at 340 nm, 10 μ L (15 units/mL) of L-MDH suspension were added and the mixture was heated at 35-40 $^{\circ}$ C for 30 minutes. After cooling at room temperature for 5 minutes, the absorbance was read at 340 nm. Concentrations of standards ranged from 0 to 15 mg/L.

Results and discussion

Study of analytical reaction in solution

L-MDH uses NAD^+ as cofactor to catalyze the reaction (2). The equilibrium position of this reaction can be controlled in either direction by proper adjustment of solution conditions. At 25 $^{\circ}$ C and pH 7.0, the low equilibrium constant of the reaction favours the substrate side. However, by increasing the pH, oxaloacetate is the favoured product.

While NAD^+ does not show absorption above 300 nm, NADH absorbs approximately at 340 nm and fluoresces approximately at 450 nm. Several parameters were studied in order to optimize the enzymatic reaction conditions in solution, namely type of solution and pH.

Type of solution The used solutions were 3.2×10^{-4} M HCl (pH 3.5), 0.025 M di-hydrogen tartrate buffer (pH 3.5), 0.025 M hydrogen citrate buffer (pH 3.8), 0.025 M phosphate buffer (pH 7.0), 0.025 M hydrogen carbonate buffer (pH 7.0), 0.025 M carbonate buffer (pH 10.0) and 0.01 M NaOH (pH 12.0). The best results were obtained at pH 10.0 because L-MDH operates correctly in alkaline buffer solutions.

Solution pH Glycine aminoacid was used as reaction medium due to its amphoteric properties and because it formed stable buffer solutions. 0.1 M glycine buffer solutions at pH 6.0, 8.0, 10.0, 11.0, 12.0 and 13.0 were used. Fig. 2 shows the fluorescent intensities of NADH for a 0.1 M glycine buffer solution at different pH. The emission maximum was observed at pH 11.0, so this pH was considered optimal for the enzymatic reaction.

Fig. 2 Effect of glycine buffer pH on NADH fluorescence for the enzymatic reaction

Optimization of sol-gel encapsulation

The biomolecules were entrapped by sol-gel technology and the parameters influencing encapsulation were optimized. The objective was to prepare homogeneous sensing layers to obtain reproducible fluorescent measurements at any point of the film. Furthermore, the film must have a minimum thickness for providing it with a good consistence, due to the main problem detected was the formation of fissures in the sensing layers. Therefore, the optimization study was carried out with the following parameters in sol-gel formation.

Total mixture volume The first study focused on the total mixture volume placed on the polystyrene cuvette. For selection purposes, different volumes of sol precursor solution and buffered enzymatic solution were mixed by maintaining a constant water/precursor ratio (≈ 0.5), which is an important event in the sol-gel process. The volumes were 572 μL (188 + 384), 760 μL (248 + 512) and 952 μL (312 + 640). In accordance with the proposed objectives, the volumes of 572 and 760 μL were rejected because they did not provide a sufficient thickness of the film, so the selected volume was 952 μL for the preparation of sensing layers.

Hydrolysis and condensation This step controls the most important properties of sol-gel, such as pore size and physical hardness. The studied parameter was hydrolysis pH (1.0, 3.0, 5.0, 7.0, 9.0 and 11.0), fixing gelation pH at 7.0 and aging at room temperature. Four sensing layers were used for each test. The pH was obtained by adding the necessary volume of catalyst HCl or NaOH to the precursor dissolved in water. The sol-gel film was more

homogeneous at pH 5.0 and 7.0, although pH 5.0 was selected because their sensing layers presented the highest fluorescent signal. The sol-gel was obtained with small pore sizes to avoid the entry of large molecules and it was also stable physically [31].

Gelation The pH interval studied had to be compatible with the stability of the reagents. L-MDH is a stable enzyme at a pH near 7, but its working pH is optimal between 9 and 11. Hydrolysis pH was fixed at 5.0 and aging was achieved at room temperature. Buffer solutions were 0.025 M phosphate at pH 5.0, 7.0, 9.0 and 11.0. Gelation at pH 5.0 was discarded because the gel was formed very slowly and its posterior handling was difficult. For the other pHs, significant physical differences were not detected at first glance, so a study of fluorescent intensity was carried out after immersion of the sensing layer in 1.0 g/L malate solution at pH 11.0. A gelation pH of 7.0 provided the highest fluorescent intensity due to the stability of the enzyme in the medium (solution and storage).

Aging The culminating step of the sol-gel process was aging. Two procedures were studied at this stage: drying in open atmosphere or in a closed bottle. Drying in open atmosphere was performed for several days at room temperature. In these cases, the sensing layers diminished substantially their volume and even began to crack. Drying was carried out in a closed bottle to avoid solvent loss by evaporation. Five to six days were required to obtain an useable sensing layer, so this aging was the most suitable.

Reaction of the sensing layer

Spectral characterization The excitation and emission spectra of the sensing layer are shown in Fig. 3. Both maxima tally with the fluorimetric properties of NADH. The excitation maximum was not modified in relation to the NADH solution (340 nm), while the emission maximum was modified 20 nm (430 nm) with respect to that of the solution (450 nm). This modification was due to the different situation of NADH in both cases (aqueous solution and sensing layer), so other compounds of the sensing layer might give fluorescence and modify the original spectra of NADH.

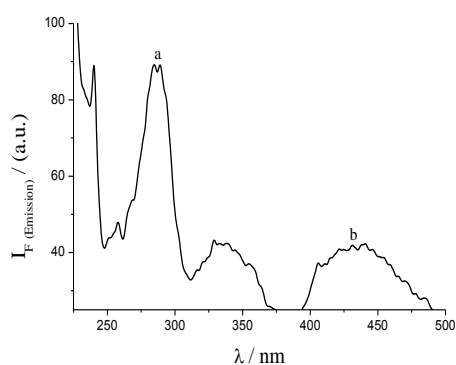


Fig. 3 Spectra of sol-gel sensing layer after the immersion in 1.0 g/L malate solution in glycine buffer at pH 11.0: **(a)** excitation and **(b)** emission

Analytical signal The spectrum of the NADH formed in the sensing layer was similar to that obtained following the reaction in solution (Fig. 4a). The fluorescence of the sensing layer was also observed after the immersion in glycine buffer (Fig. 4b), since it already produced fluorescence in solid state (Fig. 4c). The resulting difference between spectra intensities was much smaller when NAD^+ was encapsulated (20 a.u. compared to 60 a.u. in solution), but it was still sufficient for analytical purposes. The decrease of the variation in fluorescent intensity could be attributed to the existence of inactive reagent molecules, which had been damaged in the encapsulation process or were inaccessible to the analyte molecules.

Fig. 4 Fluorescent spectra of the sensing layer in: **(a)** 1.0 g/L malate solution, **(b)** 0.1 M glycine buffer at pH 11.0 and **(c)** solid state

Reaction time Fluorescent measurements were performed after immersion of the sensing layer for different times (from 0 to 20 minutes) in 1.0 g/L malate solution. Fluorescent intensity

increased with immersion time (0-12.5 minutes) until the signal stayed practically constant (12.5-20 minutes). This was due to the slow diffusion rate of malate molecules into the sol-gel. The optimum reaction time was considered as 12 minutes.

Regeneration of the sensing layer

Oxidant reagent Some experiments were carried out to regenerate NADH in the sensing layer by immersion in an oxidant solution. The reagents used [14, 16] were 1.0 mM hexacyanoferrate(III) and diaphorase enzyme (1 mg/mL, 5.2 units/mL) in 0.025 M phosphate buffer at pH 7.0. A significant decrease in fluorescent intensity was observed after the reaction with the oxidant reagent. A fluorescent intensity value similar to the previous reaction with the analyte was obtained again, when the sensing layer was immersed in malate solution.

Inclusion of diaphorase in the sol-gel After checking the regeneration in solution, diaphorase was added to the sensing layer for two reasons: to decrease its consumption and simplify the preparation of the oxidant solution. The variation of fluorescent intensity in successive regenerations was studied with different amounts of diaphorase added to the enzymatic solution during the preparation of the sensing layer (Table 1).

The sensing layers with 13.5 and 26.0 units were rejected due to their scarce reproducibility and small number of regenerations. The sensing layer with 4.2 units presented higher values than the sensing layer with 7.8 units; however, their values were less reproducible. According to this, the sensing layer with 7.8 units was selected due to its acceptable reproducibility.

Table 1 Variation of fluorescent intensity of the sensing layers with different amounts of added diaphorase

| Regeneration Number ^a | 4.2 units | 7.8 units | 13.5 units | 26.0 units |
|----------------------------------|-----------|-----------|------------|------------|
| 1 | 32.2 | 20.8 | 12.5 | 9.7 |
| 2 | 23.1 | 9.7 | 17.7 | 14.3 |
| 3 | 13.8 | 10.6 | 6.4 | 9.5 |
| 4 | 13.4 | 11.5 | - | - |
| 5 | 12.9 | 9.9 | - | - |
| 6 | 10.5 | 9.3 | - | - |

^aReaction in 1.0 g/L malate solution; regeneration in 1.0 mM potassium hexacyanoferrate(III)

Dashes indicate that incorrect values were obtained due to the damage of those sensing layers

Analytical signal The spectra observed before and after the regeneration were qualitatively similar to those shown in Fig. 4a and 4b, respectively. The difference obtained between the intensities of the spectra was very similar to that of the analytical reaction, but it decreased as the number of regenerations increased. This diminution can be explained by the presence of inaccessible molecules of NADH for hexacyanoferrate(III) or by the gradual “poisoning” of diaphorase.

Regeneration time It was studied using the same procedure described in section 3.3.3. Fluorescent intensity decreased gradually with immersion time (0-7.5 minutes) until it remained almost constant although immersion time of the sensing layer increased (7.5-20 minutes). The optimum regeneration time was 8 minutes.

Analytical characteristics of the sensing layer

Linear range The variation in the fluorescent intensity (ΔI_F), which is the difference between the intensity in malate solution and the intensity in hexacyanoferrate(III) solution, was measured by external calibration. Fig. 5 shows ΔI_F versus malate concentration.

Fig. 5 Variation in fluorescent intensity (ΔI_F) versus malate concentration

Linear behavior was not detected in the complete interval of studied concentrations, but a dynamic behavior was observed between 0.1 g/L (7.45×10^{-4} M) and 1.0 g/L (7.45×10^{-3} M) of malate, so graphical or mathematical ($\Delta I_F = 0.23 + 22.6 \times [\text{Malate}] - 13.3 \times [\text{Malate}]^2$; $r^2 = 0.989$) interpolation can be achieved. Standard deviations of intercept and coefficients for $[\text{Malate}]$ and $[\text{Malate}]^2$ obtained from 4 calibration curves are, respectively, 0.07, 0.7 and 0.5. Detection limit is 0.009 g/L and quantification limit is 0.029 g/L, considering the slope of the curve in $[\text{Malate}] = 0$ g/L.

Reproducibility It was studied according to the following criteria: same position of the sensing layer in the luminescence spectrophotometer, different zones of the same sensing layer, different sensing layers and regeneration of the same sensing layer. Table 2 shows the results obtained for each criterion.

The placement of the sensing layer in the same position inside the support of the solid accessory displayed good repeatability. However, in the other cases, reproducibility was not so good if it is compared to that obtained in solution, although it was considered acceptable for testing the evolution of malic acid in wine.

Table 2 Study of the reproducibility of the sensing layer immersed in 1.0 g/L malate solution

| Criterion | I_F^a or ΔI_F^b / (a.u.) | s^c / (a.u.) | s_r^d (%) | N^e |
|---|------------------------------------|----------------|-------------|-------|
| Same position | 42.6 | 1.2 | 2.8 | 3 |
| Different zones (3): high, medium, low | 41.2 | 5.6 | 13.6 | 9 |
| Different sensing layers (4) | 40.5 | 5.4 | 13.3 | 12 |
| Regeneration of sensing layer (5) (ΔI_F) | 9.4 | 0.9 | 9.6 | 15 |

^aAverage fluorescent intensity^bAverage variation in fluorescent intensity^cStandard deviation^dPercentage relative standard deviation^eTotal number of measurements

Lifetime and number of regenerations Lifetime was studied with new sensing layers kept in optimal storage conditions. The problems encountered were the fracture of the sensing layer and the loss of L-MDH activity. Lifetime was estimated in 25 days. Number of regenerations was determined by the times the signal recovered its initial value (Fig. 6).

Fig. 6 Number of regenerations in the sensing layer

The upper value is the result of reaction in 1.0 g/L malate and the lower value is the result of regeneration in hexacyanoferrate(III). There were 6 regenerations in total: 5 regenerations were approximately equal and the first was different. For this reason, the first variation was deemed to be the activation step of the sensing layer. This could be explained by the fact that there was no competition between analytical and regeneration reactions. However, this competition happened in successive regenerations, favouring the analytical reaction in all the cases. The other variations were rather similar, so the sensing layer offered a good response for the concentration of malate. The values obtained from subsequent regenerations were incorrect and were therefore eliminated. A possible cause was the saturation of its pores after successive immersions in several solutions, prompting the fracture of the sensing layer by superficial and short fissures. Other possible cause was the leaching of NAD^+ because of its small size.

Application to wines

Before application to natural wines, the behaviour of the sensing layer in synthetic wine was studied. The fluorescent intensities in synthetic wine were slightly lower than in glycine buffer at pH 11.0. The representation of the results had the same form as the external calibration curve in glycine buffer and it could interpolate from 0.1 to 1.0 g/L of malate. The synthetic wine solutions were used as standards for calibrating the sensing layer.

Several wines were analyzed using sensing layers. The white wines were prepared in 2003 and 2005. The young red wines came from three different parts of La Rioja (“Alta”, “Baja” and “Alavesa”) and were collected from the tanks of wine cellars (years 2003 and 2004). One of the young red wines was produced in 2004 and its malolactic fermentation had not taken place yet. The maturing red wine came from La Rioja “Alta” (year 2000). The solutions used were a mixture of wine at pH 11.0 and 0.1 M glycine buffer at pH 11.0 in different proportions, with a 1/2-1/20 dilution of wine.

Red wine solutions produced a colour change in sensing layers, prompting a negative variation in fluorescent intensity. To eliminate this problem, a discolouration treatment was applied to red wine solutions before their analysis. The bleaching agents studied were active coal, gelatine and polyvinylpolypyrrolidone (PVPP). Active coal was rejected because it eliminated certain amount of malate. Gelatine and PVPP achieved the discolouration of red

wine solutions, without decreasing malate concentration. Finally, PVPP was selected as bleaching agent.

Malate content in wines was determined by the proposed and reference methods, in order to validate the sensing layer. Table 3 shows the comparison between the results obtained for malate content with the two methods used. The determinations of malate concentration with the proposed method were obtained in excess (≈ 0.15 g/L) in all the wines, probably due to some interferences. The statistical comparison of both methods shows that their results are significantly different, because at a statistical level of 95%, the significance value is less than 0.05. Standard-addition calibrations were obtained by spiking 0, 0.1, 0.2 and 0.5 g/L malic acid to several wines. For example, the addition to a white wine diluted 5 times provided the following mathematical equation: $\Delta I_F = 5.49 + 29.0 \times [\text{Malate}] - 26.3 \times [\text{Malate}]^2$, $r^2 = 0.995$. Standard deviations of intercept and coefficients for [Malate] and $[\text{Malate}]^2$ obtained from 4 calibration curves are, respectively, 0.54, 0.5 and 0.7. The statistical comparison of the slopes in $[\text{Malate}] = 0$ g/L for external and standard-addition calibrations, indicates that they are significantly different, due to the presence of unidentified positive interferences. In the absence of error, the plot of one set of data against the second should have a slope of exactly unity and an intercept of zero; when the statistical test is made, the confidence interval of intercept does not include the zero. Finally, Youden calibrations were established with different dilutions of wines: 1/20, 1/10, 1/5 and 1/2. As an example, for a white wine the average equation of 4 calibration curves is $\Delta I_F = 0.54 + 27.8 \times \text{Dilution} - 24.6 \times \text{Dilution}^2$; $r^2 = 0.994$). Standard deviations of intercept and coefficients for Dilution and Dilution^2 are, respectively, 0.09, 0.7 and 1.0. The intercept of Youden calibration (0.54) is not included within the confidence interval ($\alpha = 5\%$) of intercept of external calibration (0.23 ± 0.10), so there was a constant bias due to matrix effect. Youden blank, 0.31, combined with standard-addition calibration and external calibration is used to calculate corrected malate concentration (Table 3).

The following step was to identify the existence of interferences in the wine. The interferences studied were ethanol, because of its abundance, and sulphur dioxide, due to its reductor capacity. No significant results were obtained to find out if these substances interfered in the fluorescent signal, so it did not exclude that other compounds interfered in the method.

Table 3 Determination of L-malate (g/L) in wines and comparison with the reference method

| Wine | Sensing layer | | UV-VIS MAS ^a |
|----------------------|----------------------|-------------------------------|-------------------------|
| | External Calibration | Standard-addition calibration | External Calibration |
| White | | | |
| 2003 | 1.00 | - | 0.92 |
| 2005 | 0.97 | 0.80 | 0.78 |
| Red | | | |
| Rioja "Alavesa" 2003 | 0.16 | - | n.d. ^b |
| Rioja "Alta" 2003 | 0.45 | - | 0.32 |
| Rioja "Alta" 2004 | 0.39 | 0.25 | 0.21 |
| Rioja "Baja" 2003 | 0.35 | - | 0.22 |
| Maturing 2000 | 0.31 / 0.30 | - / 0.26 | 0.23 / 0.24 |
| Unfermented 2004 | 3.50 | - | 3.22 |

^aUV-VIS Molecular Absorption Spectrometry

^bNot detected

The detected concentrations were found within the usual range of malate concentration in Spanish wines. In the white and unfermented red wines, malate content was very high because malolactic fermentation had not taken place yet. However, in the other wines malate content was low because malolactic fermentation had already taken place.

Conclusion

The enzymatic reaction between malate and NAD^+ , catalyzed by L-malate dehydrogenase enzyme in alkaline medium, was sufficiently selective to determine malate and rather

sensitive if the NADH formed was detected spectrofluorimetrically. The regeneration of NAD^+ was possible through the use of diaphorase enzyme and hexacyanoferrate(III). L-malate dehydrogenase and diaphorase enzymes and NAD^+ cofactor were encapsulated in silica films via the sol-gel process, in which the sensing layer was regenerated up to six times.

The linearity of the calibration curve was short, so the interpolation was carried out inside the dynamic range, which approached to 1.0 g/L of malate. Although the reproducibility of the determination [$s_r(\%) \approx 10$] was not comparable to that of other instrumental techniques, it was sufficient for testing the evolution of the malic acid concentration during malolactic fermentation. This method determined malic acid content in different types of wine. Wine pH was increased to pH 11 in order to favour the enzymatic reaction. The sensing layer darkened with red wines, therefore a discolouration treatment with polyvinylpolypyrrolidone was used. A matrix effect was observed because Youden blank is greater than zero, so the combination of standard-addition and Youden calibrations is recommended as quantification method.

The proposed methodology for determining malic acid in wine is presented as an alternative to thin layer chromatography, which is the most used technique in enological laboratories.

Acknowledgements The Rotary Club of La Rioja-David Moreno Cellars-University of La Rioja is thanked for their partial financial support (III Award of Vitiviniculture Research in 2002). European Fund of Regional Development is also thanked for providing the main instrumentation used.

References

1. Furia TE (1972) (ed) Handbook of Food Additives, 2nd edn. CRC Press, Cleveland
2. Pomeranz Y, Meloan CE (1994) (eds) Food Analysis. Theory and Practice, 3rd edn. Chapman & Hall, New York
3. Delcourt F, Taillandier P, Vidal F, Strehaiano P (1995) Appl Microbiol Biotechnol 43:321-324
4. Pretorius IS (2000) Yeast 16:675-729

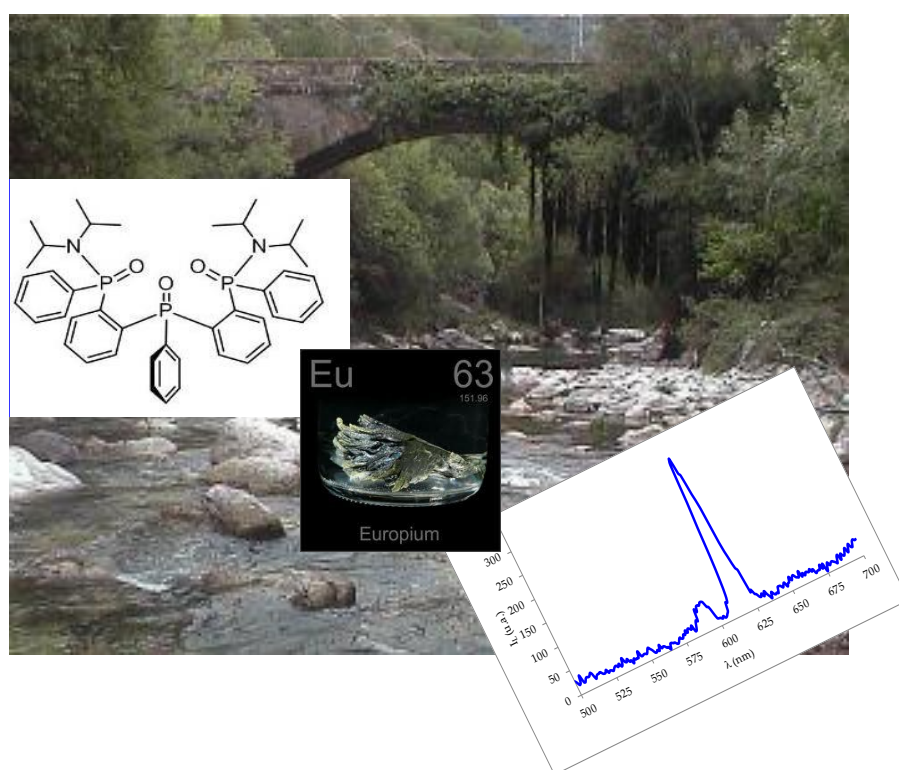
5. Silva FO, Ferraz V (2004) *Food Chem* 88:609-612
6. Palma M, Barroso CG (2002) *Anal Chim Acta* 458:119-130
7. Chinnici F, Spinabelli U, Riponi C, Amati A (2005) *J Food Compos Anal* 18:121-130
8. Kupina SA, Pohl CA, Gannotti JL (1991) *Am J Enol Vitic* 42:1-5
9. Blanty P, Kvasnicka F, Kenndler E (1996) *J Chromatogr A* 737:255-262
10. Jamin E, González J, Remaud G, Naulet N, Martín GG (1997) *J Agric Food Chem* 45:3961-3967
11. LeThanh H, Lendl B (2000) *Anal Chim Acta* 422:63-69
12. Segundo MA, Rangel AOSS (2003) *Anal Chim Acta* 499:99-106
13. Tsukatani T, Matsumoto K (2005) *Talanta* 65:396-401
14. Gué AM, Tap H, Gros P, Maury F (2002) *Sens Actuators B* 82:227-232
15. Lupu A, Compagnone D, Palleschi G (2004) *Anal Chim Acta* 513:67-72
16. Gros P, Comtat M (2004) *Biosens Bioelectron* 20:204-210
17. Lehninger A, Nelson D, Cox M (1993) *Principles of Biochemistry*, 2nd edn. Worth Publishers Inc, New York
18. Pérez C (1996) *Sensores ópticos*. Universitat de Valencia, Valencia
19. Blyth DJ, Poynter SJ, Russell DA (1996) *Analyst* 121:1975-1978
20. Wang J, Pamidi PVA (1997) *Anal Chem* 69:4490-4494
21. Williams AK, Hupp JT (1998) *J Am Chem Soc* 120:4366-4371
22. Li CI, Lin YH, Shih CL, Tsaur JP, Chau LK (2002) *Biosens Bioelectron* 17:323-330
23. Couto CM, Araújo AN, Montenegro MC, Rohwedder J, Raimundo I, Pasquini C (2002) *Talanta* 56:997-1003
24. Ding JY, Shih PY, Yin CK (2004) *Mater Chem Phys* 84:263-272
25. Butler TM, MacCraith BD, McDonagh C (1998) *J Non-Cryst Solids* 224:249-258
26. Pastor I, Esquembre R, Micol V, Mallavia R, Mateo CR (2004) *Anal Biochem* 334:335-343
27. Abbas H, Tiwary KP, Singh LSS, Zulfequar M, Zaidi ZH, Husain M (2005) *J Lumin* 114:162-166
28. Yang P, Lü MK, Song CF, Xu D, Yuan DR, Gu F (2002) *Mater Sci Eng B* 90:99-102
29. García C, Galliano P, Céré S (2003) *Mater Lett* 57:1810-1814
30. Ough CS, Amerine MA (1987) *Methods for Analysis of Musts and Wines*. Wiley-Interscience, New York

31. Xi Y, Liangying Z, Sasa W (1995) Sens Actuators B 24-25:347-352

IV.BII.8. Resumen de resultados del bloque II

Se ha desarrollado una fase sensora para la determinación de ácido L-málico en vinos. La reacción enzimática entre L-malato y NAD^+ , catalizada por el enzima L-MDH en medio básico, fue suficientemente selectiva para determinar malato y especialmente sensible para detectar fluorimétricamente el NADH formado en esta fase. La regeneración de la misma se llevó a cabo mediante el uso del enzima diaforasa y hexacianoferrato(III). Las condiciones de reacción así como los diversos parámetros que influyen en el proceso sol-gel fueron optimizados. El tratamiento previo con polivinilpirrolidona fue utilizado para el análisis de vinos tintos. Los resultados obtenidos con la fase sensora, que determina el contenido de ácido málico en los vinos, son comparables a los obtenidos con un método de referencia, corrigiendo el efecto matriz de las muestras.

El intervalo dinámico de la fase sensora estuvo comprendido entre 0.1 g L^{-1} y 1.0 g L^{-1} de malato, permitiendo 6 regeneraciones y mostrando un tiempo de vida de 25 días y una reproducibilidad aceptable [$s_r(\%) \sim 10$]. Los tiempos de reacción y regeneración fueron 12 y 8 minutos, respectivamente. El ajuste de los vinos a pH 11 fue necesario para determinar el ácido málico.



BLOQUE III

DESARROLLO DE FASES SENSORAS BASADAS EN COMPLEJOS LUMINISCENTES PARA LA DETECCIÓN DE EUROPIO(III) EN AGUA

IV.BIII. DESARROLLO DE FASES SENSORAS BASADAS EN COMPLEJOS LUMINISCENTES PARA LA DETECCIÓN DE EUROPIO(III) EN AGUA

IV.BIII.1. *Europio. Introducción y generalidades*

El europio fue descubierto espectroscópicamente por el químico francés Eugène-Antole Dermalçay, aunque en 1891 Lecoq de Boisbaudran ya mencionó este elemento¹. En el año 1896 Dermalçay sospechaba que muestras de samario estaban contaminadas con un elemento desconocido. En 1901 fue capaz de obtener europio con un alto grado de pureza.

El europio (Eu) es un elemento metálico que pertenece al grupo de las tierras raras. Este **lantánido** se encuentra en la naturaleza en sus dos formas isotópicas más estables: Eu 153 (52%) y Eu 151 (48%). Este elemento está presente esencialmente en minerales como la monacita, la xenotima y la bastnasita (procedentes de China, Brasil, India, Rusia y EEUU) representando 0.5 ppm de la corteza terrestre² (ocupa el lugar 50 en abundancia entre los elementos de la corteza terrestre). Otras formas isotópicas (Eu 150, 152, 154, 155) se obtienen a partir de procesos de fisión nuclear de uranio o plutonio. Estos isótopos se desexcitan con emisiones peligrosas de radiaciones β y γ con una vida media entre 5 y 34 años.

El europio es un **metal plateado**, químicamente inestable, que tiene una gran facilidad para oxidarse a los estados de oxidación (II y III) en condiciones atmosféricas normales². Adicionalmente, es el elemento menos denso y más volátil del grupo de las tierras raras. Su reactividad química es muy similar a la del calcio, se oxida con el oxígeno atmosférico para dar Eu_2O_3 y en agua se obtiene el

correspondiente hidróxido $\text{Eu}(\text{OH})_3$. El europio(II) es poco estable y tiene tendencia a oxidarse a **europio(III)**, siendo éste el ion metálico más estable para europio.

Aunque es, cuantitativamente, uno de los lantánidos menos utilizado, sus principales aplicaciones se pueden encontrar en la industria atómica (barras de control y veneno nuclear), en la fabricación de láseres y catalizadores, como material abrasivo para el pulimiento de cristales, como componente de televisores, lámparas fluorescentes, LEDs, cristales, etc.; y en la industria petrolera^{3,4}.

Diversos estudios de toxicidad de lantánidos llevados a cabo en animales han demostrado que estos elementos provocan alteraciones en la reproducción y en el sistema nervioso, así como daños importantes en el hígado y bazo producidos por su progresiva acumulación en los mismos⁵. Además, los lantánidos pueden causar embolias pulmonares en los seres humanos, o incluso cáncer cuando se producen exposiciones a largo plazo de sus gases o partículas en el entorno de trabajo.

Según la Agencia de Protección Medioambiental estadounidense (US EPA) no existe **ninguna legislación vigente** sobre los valores máximos de estos elementos en agua. Sin embargo, la US EPA ha establecido un valor límite de nivel de contaminante máximo (MCLG) de 0 mg L^{-1} y una técnica de tratamiento (TT) de 4 milirems por año para los radionucleidos emisores de radiaciones β y γ presentes en aguas de consumo humano⁶.

IV.BIII.2. *Luminiscencia sensibilizada de lantánidos*

La luminiscencia sensibilizada de lantánidos⁷ es una técnica de detección muy conocida, que entre sus múltiples aplicaciones se emplea para la **determinación traza de iones lantánidos**^{8,9}.

Esta técnica ofrece unas importantes ventajas como son: un gran desplazamiento de Stokes entre la absorción del ligando y la emisión del ión lantánido, unos elevados tiempos de vida de luminiscencia y unos espectros de emisión con bandas muy estrechas que dependen del estado de coordinación del ión lantánido (naturaleza del medio). Además, la respuesta varía linealmente con la concentración del complejo, en varios órdenes de magnitud, lo que resulta muy interesante para determinar bajas concentraciones de iones lantánidos.

Los lantánidos son los 14 elementos que siguen al lantano en la tabla periódica. Presentan rendimientos cuánticos de fluorescencia (Φ_F) muy bajos (0.001-0.01) y tienen como propiedad el relleno electrónico progresivo del subnivel 4f. Esta **configuración electrónica del nivel 4f** juega un papel importante en la transferencia de energía de estos elementos, especialmente cuando están formando complejos con ligandos.

En la Figura 32 se muestra el diagrama de Jablonski simplificado durante la sensibilización de la luminiscencia de lantánidos a través del ligando coordinado al ión metálico. El ligando absorbe energía y se excita al estado singlete (S_1). Desde este estado hay dos posibilidades: (1) el ligando vuelve de S_1 a S_0 mediante una transición radiante (fluorescencia) o (2) mediante un cruzamiento de sistemas (ISC) se traslada a un estado triplete excitado (T_1). Una vez en el estado triplete excitado, el ligando sigue un proceso de transferencia de energía intramolecular (ET) (no radiante) a un estado excitado del ión lantánido, y finalmente, el ión lantánido se traslada a su estado fundamental emitiendo radiación electromagnética. Además, se podría observar una retrotransferencia de energía (BET) cuando los niveles de energía entre el estado triplete del ligando y el estado 5D excitado del lantánido están muy próximos, así como una transferencia de energía desde el estado 5D excitado del

lantánido hacia el estado excitado de las moléculas de H₂O coordinadas al centro metálico.

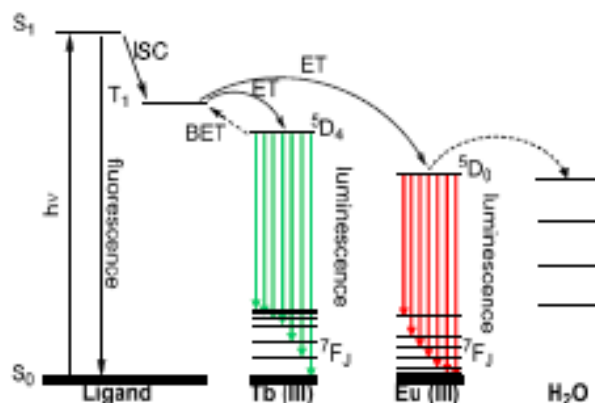


Fig. 32. Diagrama de Jablonski simplificado de la luminiscencia sensibilizada de lantánidos.

Los **picos de emisión luminiscente** corresponden a las transiciones permitidas del ión lantánido. Dentro de este grupo, europio y terbio son los lantánidos que presentan las sensibilidades más elevadas a través de sus transiciones “hipersensibles”, $^5D_0 \rightarrow ^7F_2$ (612 nm) para Eu^{3+} y $^5D_4 \rightarrow ^7F_5$ (545 nm) para Tb^{3+} , respectivamente.

La **intensidad luminiscente del ión lantánido** depende de dos factores. Primero, la eficacia de la transferencia de energía depende de la diferencia entre el estado triplete del ligando y el estado resonante del ión lantánido. La energía del estado triplete debe ser similar, pero mayor que la del nivel resonante. Segundo, la probabilidad de la desactivación no radiante del nivel resonante debe ser más baja que la probabilidad de la transición radiante.

La intensidad de luminiscencia sensibilizada¹⁰ está influenciada por factores como son:

- ✿ **Ligandos con grupos donores de electrones:** Se forman quelatos estables con ligandos que poseen grupos donores de electrones cargados negativamente. Los grupos donores fuertes pueden ser, por ejemplo, los grupos carboxilato. Los grupos donores débiles (que contienen N u O neutros) sólo enlazan cuando están en ligandos multidentados (que contienen al menos 1 ó 2 grupos donores con átomos de oxígeno cargados negativamente). En el caso de no completarse la esfera de coordinación del ión lantánido con el ligando, el H₂O puede ocupar dichos sitios libres produciendo una atenuación (quenching) de la luminiscencia. Este efecto negativo se previene usando un segundo ligando que elimine las moléculas de H₂O de la esfera de coordinación del ión.
- ✿ **Agentes sinérgicos:** Son sustancias que aumentan o potencian la luminiscencia sensibilizada. Pueden utilizarse entre otros: TOPO (óxido de tri-n-octilfosfina), EDTA (ácido etilendiaminotetraacético), DPG (difeníl guanidina) y BA (benzoilacetona).
- ✿ **Surfactantes:** La presencia de un surfactante en el sistema puede evitar el quenching, por coordinación del ión lantánido con moléculas de H₂O y protege el quelato contra procesos no radiantes. Algunos surfactantes usados son: Triton X-100 (no iónico), SDS (dodecil sulfato sódico) (aniónico) y CTMAB (bromuro de cetiltrimetilamonio) (catiónico).
- ✿ **pH:** La intensidad luminiscente del ión lantánido se ve favorecida a pHs neutros o alcalinos, ya que a estos valores de pH se favorece la ionización de las moléculas, permitiendo la formación de fuertes quelatos. A pHs muy alcalinos se produce la precipitación de hidróxidos de lantánido.

- ✿ **Co-luminiscencia:** La co-luminiscencia es el resultado de un gran aumento de excitación del ión lantánido mediante absorción de luz por quelatos de iones no emisivos, como son Y(III) y Gd(III). Esto envuelve una transferencia de energía de luminiscencia sensibilizada inter-quelato y su eficiencia puede incrementarse fuertemente empleando un surfactante.
- ✿ **Átomos pesados:** Los átomos pesados pueden aumentar el acoplamiento spin-orbital y, por tanto, la probabilidad del cruce de sistemas.
- ✿ **Temperatura:** La temperatura disminuye o aumenta la luminiscencia dependiendo del tipo de energía de transferencia. En los mecanismos de transferencia de energía intermolecular, la temperatura incrementa las colisiones entre el ligando y el ion lantánido, favoreciendo el proceso de transferencia de energía. Sin embargo, en los mecanismos de transferencia de energía intramolecular, la señal decrece con el aumento de la temperatura.

IV.BIII.3. Complejos luminiscentes de europio. Características ópticas

Los cationes Eu(II) o Eu(III), como tales, presentan una luminiscencia débil¹¹. Una forma de activarlos es mediante la inserción en compuestos inorgánicos o por la formación de compuestos con ligandos orgánicos, que permitan una transferencia de energía hacia el metal y una ruptura de la simetría, favoreciendo así, el aumento del poder de emisión¹². El proceso de transferencia de energía se explica a través del fenómeno de la **luminiscencia sensibilizada de lantánidos**.

En el caso de Eu(II), la banda de emisión predominante corresponde a una transición $4f^6$ ($^5D_1 \rightarrow ^4F_7$), centrada en 448 nm y que es muy sensible al entorno de coordinación del centro metálico¹³. Actualmente, el mecanismo de transferencia de

energía de los ligandos al catión europio(II), todavía no ha sido explicado claramente.

En los complejos de europio(III), la transferencia de energía tiene lugar desde los estados triplete T_n del ligando hacia los niveles de energía 5D_n del átomo de europio¹⁴ (véase Figura 33).

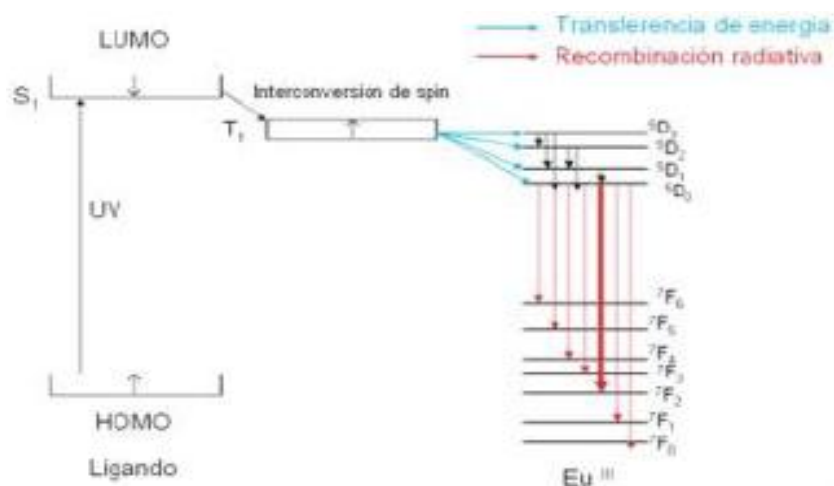


Fig. 33. Mecanismo de luminiscencia de europio(III).

Una condición necesaria para este fenómeno es que la energía de los estados T_n sea superior a la de los niveles 5D_n . La desexcitación radiativa se produce desde el nivel 5D_0 hacia los niveles 7F_n . Las **transiciones permitidas** para el ión europio(III)¹⁵ son: $^5D_0 \rightarrow ^7F_0$ (578-580 nm), $^5D_0 \rightarrow ^7F_1$ (585-600 nm), $^5D_0 \rightarrow ^7F_2$ (610-630 nm), $^5D_0 \rightarrow ^7F_3$ (645-660 nm) y $^5D_0 \rightarrow ^7F_4$ (680-705 nm). El espectro de emisión de europio(III) se visualiza en la Figura 34¹⁶. La transición más intensa comúnmente observada es la $^5D_0 \rightarrow ^7F_2$ con una longitud de onda de 612 nm.

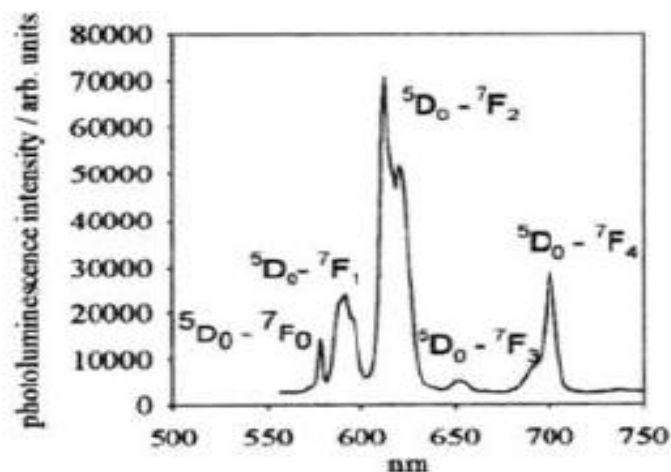


Fig. 34. Espectro de emisión de europio(III).

El **rendimiento cuántico** de los complejos de europio(III) depende esencialmente de dos factores: la proporción de interconversión a los estados tripletes del ligando y la diferencia de energía entre los T_n del ligando y los 5D_n del europio. Para obtener una **transferencia eficiente** se necesita un gap de 3000 cm^{-1} (33 nm, 0.37 eV)¹⁷. La particularidad de la emisión de los complejos de europio es la pequeña anchura de las bandas obtenidas, de 10 a 15 nm solamente, mientras que las bandas de las moléculas orgánicas cubren zonas que comprenden una anchura de 200 a 250 nm.

IV.BIII.4. Bibliografía del bloque III

1. Partington, J. R., *A history of Chemistry*. MacMillan: London, 1970.
2. Argonne National Laboratory. Europium. *Human Health Fact Sheet*, August 2005, 1-2.

3. Gschneidner, K. A.; Eyring, L., *Handbook on the Physics and Chemistry of the Rare Earths*. Vol. 1. North Holland Publishing Company: Amsterdam, **1979**.
4. Sastri, V. S.; Bunzli, J. C. G.; Rao, V. R.; Rayudu, G. V. S.; Perumareddi, J. R., *Modern Aspects of Rare Earths and their Complexes*. Elsevier: Amsterdam, **2003**.
5. Hampel, C. A.; Book, R., *The Encyclopedia of Chemical Elements*. Reinhold Book Corporation: New York, **1968**.
6. US EPA, EPA 816-F-09-0004, May **2009**. List of Contaminants & their MCLs. <http://water.epa.gov/drink/contaminants/index.cfm>.
7. Thibon, A.; Pierre, V., Principles of responsive lanthanide-based luminescent probes for cellular imaging. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2009**, 394 (1), 107-120.
8. Yang, W.; Mo, Z. L.; Teng, X. L.; Chen, M.; Gao, J. Z.; Yuan, L.; Kang, J. W.; Ou, Q. Y., Determination of trace europium based on new ternary fluorimetric enhancement system of europium(III) with thenoyltrifluoroacetone and trisalicylicamido triethylamine. *Analyst* **1998**, 123 (8), 1745-1748.
9. Jiang, W.; Ma, Y.; Zhao, W.; Feng, Y.; Wang, N.; Si, Z., Determination of trace europium by use of the new fluorescence system europium–sparfloxacin–1,10-phenanthroline–sodium dodecyl sulfate. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2003**, 377 (4), 681-684.
10. Bohoyo Gil, D. Tesis Doctoral: *Nuevos metodos de determinacion de antibioticos y otros principios activos en alimentos, formulaciones zoosanitarias y fluidos biologicos*. Universidad de Extremadura, Badajoz, **2005**.

11. Stein, G.; Wurzburg, E., Energy gap law in the solvent isotope effect on radiationless transitions of rare earth ions. *The Journal of Chemical Physics* **1975**, *62* (1), 208-213.
12. Jiang, X.; Jen, A. K. Y.; Huang, D.; Phelan, G. D.; Londergan, T. M.; Dalton, L. R., The effect of ligand conjugation length on europium complex performance in light-emitting diodes. *Synthetic Metals* **2001**, *125* (3), 331-336.
13. Aceves, R.; Perez-Salas, R.; Pal, U., Cathodoluminescence and optically active regions of intrinsic and induced defects in Eu²⁺-doped KCl crystals. *Physica Status Solidi B* **2002**, *233* (2), 364-372.
14. Briz, A.; De la Fuente, M.; Bautista, L.; Aubouy, L.; Paz, A.; Garcia, O.; De la Varga, M.; Tzvetkova, M.; Parra, J., Europio: Naturaleza, luminiscencia y aplicaciones. *Anales de Quimica* **2006**, *102* (4), 40-45.
15. Richardson, F. S., Terbium(III) and europium(III) ions as luminescent probes and stains for biomolecular systems. *Chemical Reviews* **1982**, *82* (5), 541-552.
16. Wakefield, G.; Keron, H. A.; Dobson, P. J.; Hutchison, J. L., Synthesis and properties of sub-50-nm europium oxide nanoparticles. *Journal of Colloid and Interface Science* **1999**, *215* (1), 179-182.
17. Shi, M.; Li, F. Y.; Yi, T.; Zhang, D. Q.; Hu, H. M.; Huang, C. H., Tuning the triplet energy levels of pyrazolone ligands to match the (5)D(0) level of europium(III). *Inorganic Chemistry* **2005**, *44* (24), 8929-8936.

IV.BIII.5. *Objetivos del bloque III*

Los objetivos a desarrollar en este bloque experimental son:

1. Diseñar y desarrollar nuevas fases sensoras ópticas para la determinación de iones europio(III) en muestras acuosas. Para ello, será necesario sintetizar nuevos ligandos que formen complejos altamente luminiscentes con europio(III), siendo estos complejos los responsables de la señal óptica requerida. Tanto la síntesis de los nuevos ligandos como su caracterización estructural se realizarán mediante la colaboración con el Departamento de Química Orgánica de la Universidad de Almería. Además, se obtendrán las características espectroscópicas e intrínsecas de los complejos luminiscentes en disolución y se evaluará el efecto de los diversos parámetros químicos.

Posteriormente, se desarrollarán fases sensoras ópticas, basadas en membranas de inclusión polimérica, mediante la inmovilización de estos ligandos en las mismas. También se evaluarán diversas técnicas de deposición, así como los parámetros químicos e instrumentales. Finalmente, se llevará a cabo la caracterización analítica y el estudio de la selectividad de las fases sensoras para la determinación de iones europio(III) en agua.

2. Desarrollar una fase sensora óptica para la detección de europio(III) en medio acuoso mediante un dispositivo de fibra óptica. A partir de los resultados obtenidos, se desarrollará un sensor óptico tipo optodo mediante la deposición de membranas de inclusión polimérica sobre fibra óptica. Para ello, se utilizará la técnica de deposición de *dip coating* y se evaluarán los diferentes tipos de fibras ópticas y las diversas variables que afectan a la fase sensora. Se diseñará un montaje experimental para realizar las mediciones de la fase sensora y se estudiará la reutilización del dispositivo de fibra óptica

empleado. Finalmente, se realizarán sendas curvas de calibración, en estado seco y en disolución, con la fase sensora para la detección de iones europio(III) en agua.

El trabajo de investigación de este capítulo se ha llevado a cabo durante una estancia en el Departamento de Ingeniería Eléctrica y Electrónica de la Universidad Pública de Navarra.

IV.BIII.6. Capítulos del bloque III

En este bloque experimental se han llevado a cabo los trabajos que se resumen en los siguientes capítulos:

Capítulo 4: Development of polymeric sensing films based on a tridentate bis(phosphinic amide)-phosphine oxide for determining Europium(III) in water. *Dalton Transactions (2012) en prensa*
DOI:10.1039/C2DT30257H

Capítulo 5: A novel tridentate bis(phosphinic acid)-phosphine oxide based Europium(III)-selective Nafion membrane luminescent sensor.
Enviado a Analytica Chimica Acta.

Capítulo 6: A novel luminescent optical fibre probe based on immobilized tridentate bis(phosphinic amide)-phosphine oxide for Europium(III) ion aqueous detection in situ. *Enviado a Sensors and Actuators B: Chemical.*

IV.BIII.7. Capítulo 4: *Development of polymeric sensing films based on a tridentate bis(phosphinic amide)-phosphine oxide for determining Europium(III) in water*

Development of polymeric sensing films based on a tridentate bis(phosphinic amide)-phosphine oxide for determining Europium(III) in water†

F. J. Sainz-Gonzalo,^a M. Casimiro,^b C. Popovici,^b A. Rodríguez-Diéguez,^c J. F. Fernández-Sánchez,^{*a} I. Fernández,^{*b} F. L. Ortiz,^{*b} A. Fernández-Gutiérrez^a

A novel europium(III) membrane luminescence sensor based on a tridentate bis(phosphinic amide)-phosphine oxide $\text{PhPO}(\text{C}_6\text{H}_4\text{POPhN}(\text{CH}(\text{CH}_3)_2)_2)_2$ (**1**) is described. The new luminescent complex $[\text{Eu}(\text{1})_2]\text{Cl}_3$ **2** formed between europium(III) and ligand **1** which has a 1:2 stoichiometry, has been evaluated in solution. It has excellent spectroscopic and chemical characteristics for developing sensing films. All the parameters (polymer, plasticizer, ligand and ionic additive) which can affect the sensitivity and selectivity of the membrane sensor and instrumental conditions have been carefully optimized. The best sensing response ($\lambda_{\text{exc}} = 229.04$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 616.02$ nm) was observed for 33.4:65.1:1.5 (% w/w) PVC:DOS:**1**. The sensing film shows good response time (10 min) and a very good selectivity toward europium(III) with respect to other lanthanides(III) ions such as La, Sm, Tb and Yb. The newly-developed sensing film has a linear range from 1.6×10^{-7} to 5.0×10^{-6} mol L⁻¹ for Eu ions with a very low detection limit (4.8×10^{-8} mol L⁻¹) and good sensitivity (9.41×10^{-7} a.u./mol L⁻¹) to europium. Complexes $[\text{Eu}(\text{1})_2]\text{Cl}_3$ (**2**) and $[\text{Eu}(\text{1})]\text{Cl}_3$ (**4**) were isolated by mixing ligand **1** with $\text{Eu}(\text{Cl}_3) \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ in acetonitrile at room temperature in ligand to metal molar ratios of 1:2 and 1:1, respectively. The 1:1 derivative is the product of thermodynamic control when a molar ratio of ligand to europium salt of 1:1 is used. The new compounds have been characterized in both solid (IR, MS-TOF, elemental analysis, TGA and X-ray diffraction) and solution (multinuclear magnetic resonance) forms. In both europium complexes, the ligand acts as a tridentate chelate. TG studies demonstrated that neither complexes **2** or **4** possess any coordinated water molecule directly bound to the lanthanide metal which corroborates the X-ray structure. The investigation of the solution behaviour of the Y(III) complexes with PGSE NMR diffusion measurements showed that average structures with 1:1 and 1:2 stoichiometries are retained in acetonitrile solutions.

Introduction

The rare earth elements (REEs) are widely distributed in the earth's crust at very low concentrations being the focus of increasing interest in the last years due to their applications as important components in laser, phosphors, coloured glasses, magnetic bubble memory films, synthesis of single molecule magnets, fibre optics, refractive index lenses, high-intensity lighting, superconductors, ceramics and catalysts. In addition, they have been also used in refining, metallurgic and nuclear industries, agriculture, medicine and natural sciences.¹

Diverse REE toxicity tests have been carried out in animals. They have revealed that REEs provoke alterations in the reproductive and nervous system and that they can cause liver and spleen damage.² For these and other reasons, there has been increased interest in the determination of REEs in the last decade.³

Europium is a prominent and reactive member of the rare earth family whose determination is necessary due to its applications in many different fields.⁴

The most used analytical methods for europium(III) determination in water samples are: spectrophotometry, fluorescence,^{5a} inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES),^{5b} inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS),^{5c} multiple square wave voltammetry (MSWV)^{5d} and chelation ion chromatography (CIC) with absorbance detection.^{5e} All of these methods require expensive instrumentation, long analytical times and sample pretreatments, consequently they are not suitable for the analysis of large numbers of samples.

Due to this limitation, several europium-selective electrodes sensors have been recently developed; however, there are very few reports on these electrodes in the literature.^{6,7,8} They simplify the analytical process and enable the monitoring of specific species *in situ* and in real time. They are based on the immobilization of ligand species which complex with Eu(III) ions.

Zamani et al.^{6b} developed a potentiometric sensor based on an ion selective electrode using 4-(2-hydroxybenzylideneamino)-6-methyl-3-thioxo-3,4-dihydro-1,2,4-triazin-5(2H)-one (HMTDT) immobilized in PVC as a membrane carrier for the determination of europium(III) in water samples. They reported a detection limit of 7.8×10^{-7} mol L⁻¹ and good selectivity for a wide variety of metal ions, improving the characteristics of previously reported europium(III) ion selective sensors.⁷

More recently, Ganjali et al.^{7c} evaluated 4*E*-4-(2-phenylviazenyl)-2-((*E*)-(2-aminoethylimino)methyl) phenol (PMP) as a neutral ion carrier in the construction of an europium(III) PVC-based membrane sensor. It exhibited a near-Nernstian response of 18.8 ± 0.2 mV/decade of europium activity in the range of 4.0×10^{-7} - 1.0×10^{-2} mol L⁻¹ with a detection limit of 1.5×10^{-7} mol L⁻¹ and selectivity coefficients in the range of 7.5×10^{-6} - 2.4×10^{-4} .

Optical sensors have generally demonstrated several advantages against electrochemical ones.⁹ In particular, the optical determination of the europium(III) ion has shown higher sensitivity and selectivity than electrochemical determination.^{7d,10} An optical chemosensor capable of detection at very low concentration levels (6.2×10^{-8} M) has been reported,^{7d} demonstrating the effectiveness of novel luminescence sensing probes for the determination of this ion.

Trivalent lanthanide ions are weak luminescent species in water due to their low molar absorptivities and poor quantum yields.¹¹ However, the lanthanides present a rich photophysical and coordination chemistry for the formation of luminescent complexes.¹² These complexes show a large Stokes shift, long luminescent lifetimes and emission spectra with very narrow bands. The disadvantage of their weak light absorption is solved by the grafting of an antenna¹³ onto the ligand complexing the lanthanide ion. The antenna absorbs energy from UV-visible radiation and transfers it to lanthanide ion that emits electromagnetic radiation in the visible region. These particular characteristics make them attractive for multiple applications, such as chiral NMR shift reagents and magnetic resonance imaging contrast agents,¹⁴ as luminescent labels for biomedical analysis,¹⁵ mild reagents and catalysts in organic synthesis,¹⁶ and as molecular magnetic materials.¹⁷

Molecules derived from phosphinic moieties can be considered as potential sensitizing ligands, which commonly possess a conjugated π -electron system and multiple coordination modes, being in this way good activators of europium(III) ion luminescence and good candidates to form stable complexes. These complexes absorb energy at the characteristic wavelength of the ligand and emit radiation at the characteristic wavelengths of the europium(III) ion. These observed characteristic line-type bands at 594, 618, 660 and 704 nm correspond to the transitions of the europium(III) ion ($^5D_0 \rightarrow ^7F_1$, $^5D_0 \rightarrow ^7F_2$, $^5D_0 \rightarrow ^7F_3$, $^5D_0 \rightarrow ^7F_4$, respectively).¹⁸ The $^5D_0 \rightarrow ^7F_2$ transition was selected to determine the europium(III) concentration. Thus, the luminescence signal of the complex at this emission wavelength, is proportional to the europium(III) concentration in solution.

To obtain sensing films for detecting Eu(III) ions based on polymer inclusion membranes (PIMs),¹⁹ two components are necessary: 1) a luminescent Eu(III)-sensing probe; and 2) a solid support in which the ligand can be immobilized. PIMs offer numerous advantages such as effective reagent immobilization, simple preparation, versatility and good mechanical properties;²⁰ The sensitivity and selectivity of PIMs depend on their chemical composition: nature of the immobilized ligand, the nature of the plasticizers and the ionic additives used.²¹ In terms of solid supports, polyvinyl chloride (PVC) is one of the most commonly used bases for developing these films.

The lanthanide ions are oxophilic and therefore expected to interact strongly with polarized oxygen-bearing functional groups. All the lanthanide-based membrane sensors reported to date make use of systems with nitrogen, oxygen, or sulphur pendants.^{20a,21a,21c,22} It is well established that the phosphinoyl (P=O) group interacts with lanthanide cations more strongly than other functionalities.²³ As a consequence, simple phosphine oxides,²⁴ phosphonates,²⁵ and multifunctional ligands bearing PO moieties^{8,26} have been extensively investigated in f-block coordination.²⁷ Representative examples of mono-, bi-, tri-, and tetradentate molecules related to the title compound are given in Figure 1.

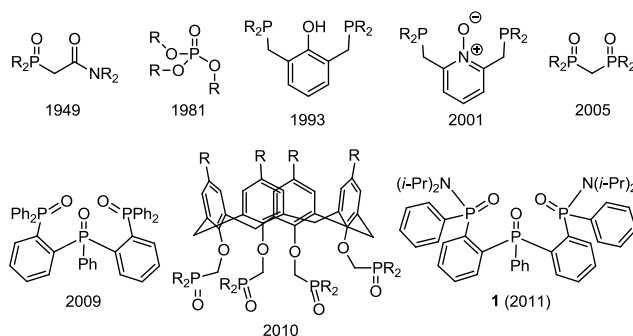


Fig. 1. Representative examples of phosphorous-based ligands for f-block coordination.

Ligands bearing several soft donors in the structure are expected to increase their stability and selectivity toward lanthanides.

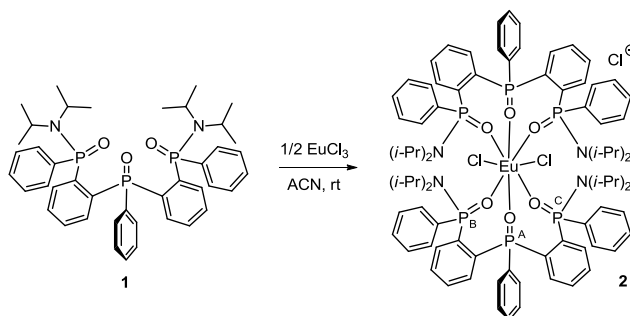
This suggests, ligand **1** represents an excellent candidate to behave as a good sensitizing agent for recognizing europium(III) ions. The synthesis of ligand **1** (see experimental section) has been described previously²⁸ and has been characterized by X-ray crystallography and NMR spectroscopy. Compound **1** is a *meso* compound containing two ortho-substituted phosphinic amide fragments bridged by a central phosphine oxide core providing an excellent pocket of three P=O groups suitable for coordination chemistry. In fact, ligand **1** has already shown its coordination abilities to yttrium(III) nitrate providing complexes of 1:1 and 1:2 stoichiometries.²⁸

In this work a new luminescence Eu(III)-sensing probe was synthesized and characterized by spectrophotometry, luminescence spectrometry, X-ray crystallography and multinuclear mono- and bi-dimensional NMR together with PGSE diffusion NMR studies. In addition, ligand **1** was immobilized into a PVC liquid membrane to develop a highly selective and sensitive optical Eu(III)-sensing film. To our knowledge, this is the first time that a ligand-sensitized luminescence sensing film has been used for detecting europium(III) ions.

Results and discussion

Synthesis and solution NMR

The mononuclear complex [Eu(**1**)₂Cl₃] (**2**) was obtained as an analytically pure compound from the reaction of two equivalents of **1** with europium(III) chloride Eu(Cl)₃·(H₂O)₆ in acetonitrile (Scheme 1). The product is insoluble in diethyl ether and hexane and precipitates a few minutes after dropping any of these solvents into a concentrated solution of the aforementioned mixture. The solid can therefore be easily isolated by filtration. Similar to the formation of the yttrium complex [Y(**1**)₂(NO₃)₃] (**3**)²⁸ the synthesis of **2** proved to be diastereospecific, where only the product of *face-to-face* binding of the two tridentate ligands to the lanthanide was detected (see below).



Scheme 1. Synthesis of the complex [Eu(**1**)₂Cl₃] (**2**). The structure shown is consistent with the fragments observed by ESI-MS.

When different Eu(Cl)₃:**1** stoichiometries were assayed, e.g., 1:1, 1:3, 1:4,.., the ³¹P NMR spectra showed exclusive formation of complex **2**, or coexistence of **2** and the free ligand in agreement with a stable complex not prone to dissociate and/or aggregate (see diffusion NMR studies below). All attempts to obtain crystals of **2** suitable for X-ray analysis failed. The structure could be assigned based on spectrometric methods.

Electrospray mass spectrometry (ESI-MS), as a soft molecular detection technique, is a method of choice for elemental and structural information, since the degree of declustering and molecular fragmentation in the mass spectrometer interface region can be adjusted. There was no addition of inert salt to fix the ionic strength in order to prevent the formation of ionic aggregates that would scatter the signal. The ESI-TOF spectrum shows the formation of the [1:2] complex (**2**) due to the observation of the [M-Cl] peak at 1671.4 together with its specific isotopic distribution profile (Figure S1). The existence of this ion clearly demonstrates the incorporation of two ligand entities and two chlorine atoms directly bound to the metal. The elemental analysis of freshly prepared samples supports the proposed composition. The results were consistent for an europium metal bearing two ligand units and three chlorides.

Interaction of metal ions with the phosphoryl oxygen causes considerable changes in the PO stretching frequency, which is easily identified by its high intensity. The infrared spectrum of complex **2** (KBr disk) displays bands in the range 1100 – 1203 cm⁻¹ that can be assigned to these P=O stretching vibrations (Figure S2).²⁸ The shift of these absorptions to lower frequencies (*ca.* 20-50 cm⁻¹) with respect to the corresponding bands in the free ligand, support the binding to the europium cation. However, this region of the IR spectrum is complicated and does not allow the unequivocal identification of the coordination mode to the metal.

The ³¹P NMR spectrum of complex **2** consists of three broad signals with the same integral: a broad singlet for P_A (□_P +3.42 ppm, W_{1/2} 21 Hz) that resolves into a broad pseudo triplet (³J_{PP} ≈ 7.0 Hz, Figure S3)† upon resolution enhancement processing, a broad doublet for P_B (□_P -35.31 ppm, ³J_{PP} 8.6 Hz), and a broad singlet for P_C (□_P -86.4 ppm, W_{1/2} 22 Hz) (see Scheme 1). These chemical shifts are significantly scattered in contrast to the ones found for its diamagnetic yttrium analogue (**3**), i.e. □_P 42.0, 40.3 and 34.3 ppm, respectively. In fact, the isotropic shifts, □□_{iso},²⁹ which measures the interaction between unpaired spin on the central metal ion with the nuclear spins of ligand atoms, are respectively -38.6, -75.6 and -120.7 ppm.

The presence of only three signals in the spectrum indicates that the two ligands in **2** are in rapid exchange. This means that in solution the flexibility of the ligands produces an average structure with a plane of symmetry that may include the chlorides anions bound to the europium metal.

In general, the values of contact shifts detected by paramagnetic NMR depend on the extent of spin delocalization within the ligand framework and the character of the bonds between the metal ion and the ligating atoms. In paramagnetic complexes, two mechanisms - contact and pseudocontact interaction - are generally considered responsible for the NMR isotropic shift. With lanthanide ions such as Eu^{3+} the mechanism responsible for the isotropic shifts is generally attributed to a pseudocontact interaction.^{30,31} Although this interaction induces significant line broadening of the signals due to rapid relaxation, 1D and 2D NMR spectra of **2** were acquired.

The ^1H NMR spectrum of **2** exhibited averaged signals for the two ligand molecules incorporated in the complex. The whole set of signals recorded in CD_3CN at 25°C span from δ_{H} -0.88 to 9.88 ppm, which suggests that they are located in an almost diamagnetic region. The broadest signals correspond to the diastereotopic Me groups of one NiPr_2 group characterized by two signals significantly downfield shifted (δ_{H} 1.88 and 4.00 ppm). The second set of signals attributed to the other isopropyl group was not located, probably a consequence of rapid transverse relaxation. The same behaviour is observed in the ^{13}C NMR spectrum (Figure S4),[†] with the NiPr_2 fragment appearing at δ_{C} 23.9 and 26.9 ppm for the methyl carbons and δ_{C} 52.7 ppm for the methine group.

Isotropic shifts were calculated for all the protons of the ligand backbone showing which of the protons are most affected by the metal (Table S1).[†] Protons showing the largest paramagnetic shift are given in red in Figure 2. The protons which show larger δ_{iso} are collected in Figure 2 and reflect the preferred conformation in solution.

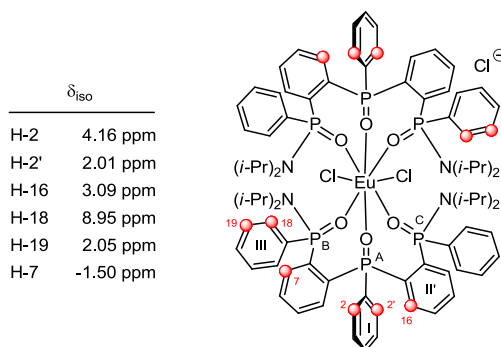


Fig 2. Selected ^1H isotropic shifts (δ_{iso}) for complex **2** at 300 MHz in CD_3CN at 25°C .

The proton spectrum consists of 22 signals which points to an effective C_{2v} symmetry of the complex in solution. This feature is confirmed by the ^{13}C spectrum, which shows 30 NMR peaks for the 42 carbon nuclei of the ligand backbone. There are some chemical equivalences located at the two phenyl rings linked to phosphorus A and C one of each showing equivalent *meta* and *ortho* carbons. Some of these are evident as indicated by 2-D exchange spectroscopy (Figure S5).[†]

The assignment of the ^{13}C NMR spectrum was accomplished in combination with DEPT-135 and 2D HMQC and HMBC experiments (Figure S6-S8).[†] The analysis of the ^1H , ^{31}P gHMQC spectrum optimized for the observation of phosphorus-proton long-range couplings allowed the assignment of the proton signals of the different *P*-phenyl rings (Figure 3).

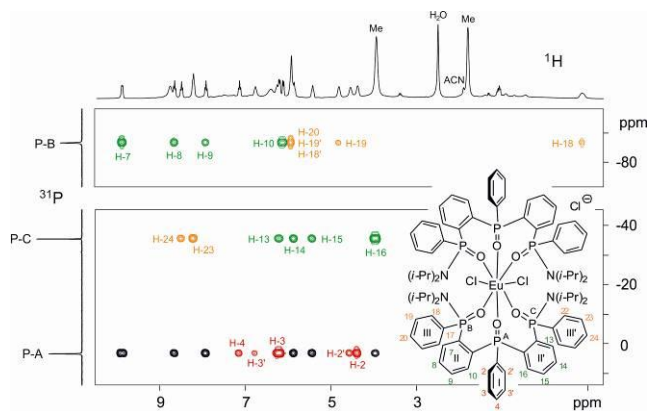


Fig 3. ^1H , ^{31}P gHMQC spectrum (300 MHz) of complex **2** in CD_3CN at 25°C .

From the 2D map one can establish several observations that supports our hypothesis: a) the phosphorus signal located at 3.42 ppm (P_A) gives 11 correlations, therefore defining the protons located at rings I, II and II' (see inset sketch in Figure 3);

b) the phosphorous signals P_B and P_C correlate with 7 and 6 protons, respectively, which is consistent with non-bridging phosphinic amide units; c) the four correlations common to P_A and P_B belong to protons of the phenyl ring II, whereas those shown by both P_A and P_C , correspond to ring II'; d) by defect, the remaining correlations are assigned to protons of ring III. Complementary proton information was obtained through the COSY spectrum (Figures 4).[†] The correlations observed allowed completion of the assignment of the protons of ring I, the unravelling of the whole spin system of ring II, identification of the methine signals of the $N(i\text{-Pr})_2$ moieties, and the assignment of the lowest frequency signal ($\square_{\text{H}} -0.88$ ppm) to H-18.

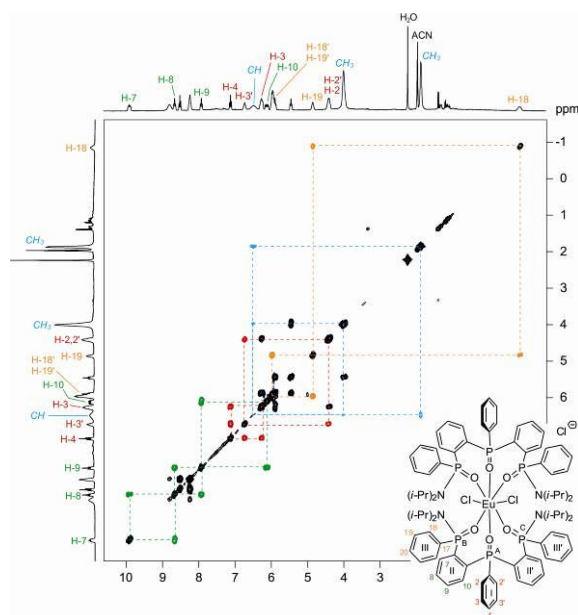


Fig 4. COSY-45 spectrum (300 MHz) of complex **2** in CD_3CN at 25 °C.

Pulsed gradient spin-echo (PGSE) NMR diffusion methods are now currently widely used,³² in particular when associated with ion pairing or molecular volumes.³³ PGSE measurements offer a novel view on the interaction of metal salt derived cations and anions in solution.³⁴ However very little diffusion data have been described when f-block metals are involved,³⁵ most probably due to difficulties of obtaining reliable diffusion constants D through NMR methods when rapid transverse relaxation is present. Furthermore, the measured solvent dependencies of D offer a hint as to what extent a solvent promotes ion pairing and/or aggregation which could induce significant changes in reactivity. It has been recognized that a variety of organic and inorganic salts dissolved in chloroform often lead to more than 95 % ion pairing, whereas the use of coordinating solvents such as methanol or acetonitrile affords much less or no ion pairing at all. As demonstrated in previous studies, it is assumed that up to 100 % ion pairing occurs if the cation and the anion reveal approximately identical D -values affording hydrodynamic radii r_{H} (via the Stokes-Einstein equation) which are substantially greater than those estimated by either crystallography or quantum chemical calculations. The calculated r_{H} values assume spherical shapes; hence, they do not represent the real shape of the molecules. Nevertheless their use is well established for comparisons, since they offer a rapid and easy method to recognize ion pairing and/or aggregation. To learn more about how lanthanide salts interact and to specifically determine whether there might be a preferred salt structure in the europium species described above, we measured ^1H PGSE as a function of concentration. Diffusion data of ligand **1** and its $\text{Y}(\text{NO}_3)_3$ 1:2 (**3**) complex have been previously described,²⁸ and will be included here for comparison. We decided to use acetonitrile solutions for these measurements, as it has been previously shown that for some dicationic ruthenium species that a surprising large amount of ion pairing can be found, which in fact has a considerable implication on the catalysis outcome.³⁶

From the measured D values for **1**, **2** and **3**, we estimated (via the Stokes-Einstein equation) the hydrodynamic radius r_{H} to be 5.8, 8.2 and 8.8 Å, respectively (Table 1). The results obtained for **2** are in reasonable agreement with the values derived from the crystallographic data of **3** (8.2 Å), given that solvent molecules and non-bonded nitrates included in the solid-state lattice cannot be excluded from the $r_{\text{X-ray}}$ calculation. The small fluctuation between **2** and **3** can be rationalised by taking into account the possible contributions of the chloride ions. They can be completely separated by solvent or at least partially paired regarding the cationic entity. Together with this, the exchange between free and bound chlorides cannot be excluded, which could represent a source of uncertainty.

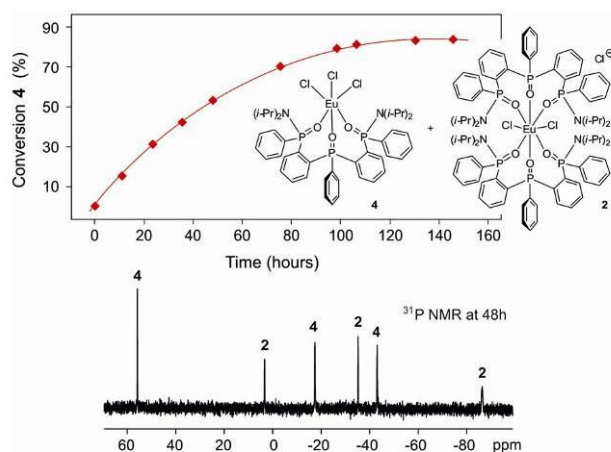
Table 1. D - [$10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$] and r_{H} -values for ligand **1**, europium (**2**) and yttrium (**3**) complexes at ambient temperature in acetonitrile solution.

| | Conc (mM) | [M] | $D^a \times 10^{10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ | $r_{\text{H}} (\text{\AA})^b$ | $r_{\text{X-ray}} (\text{\AA})^c$ |
|-----------------------|-----------|----------------------------------|---|-------------------------------|-----------------------------------|
| 2 | 60 | EuCl ₃ | 7.287 | 8.2 | |
| 2 | 30 | EuCl ₃ | 7.237 | 8.2 | |
| 2 | 10 | EuCl ₃ | 7.222 | 8.2 | |
| 4 | 10 | EuCl ₃ | 8.633 | 6.9 | 6.7 |
| 1 ^d | sat | | 10.138 | 5.8 | 5.9 |
| 3 ^d | 60 | Y(NO ₃) ₃ | 6.636 | 8.8 | 8.2 |
| CH ₃ CN | | | 34.210 ^d | 1.7 | |

^a Experimental error in D values is $\pm 2\%$. ^b The viscosity η used in the Stokes-Einstein equation is $0.363 \times 10^{-3} \text{ Kg m}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Value of η was taken from www.knovel.com. ^c Deduced from the X-ray structure by considering the volume of the crystallographic cell divided by Z . Note that this is only an estimate since both molecular structures contain several solvent molecules in the crystal lattice (see reference 28). ^d Average value considering the same signal in the three different samples based on **2**. ^d Data taken from reference 28.

Interestingly, a 2-fold and 6-fold dilution of complex **2** (down to 30 and 10 mM, respectively) did not produce any significant change on the D -value (or r_{H}) which strongly suggests that complex **2** is not prone to suffer dissociation in acetonitrile solution at relatively short periods of time.

When ligand **1** and EuCl₃ in ratio 1:1 were allowed to react at room temperature during long reaction times an interesting behaviour was observed. After 8 h of reaction, a new species began to appear (*ca.* 6 %) as evidenced by the ³¹P NMR spectrum. (Figure 5) At 36 h, two clear sets of signals were identified and assigned to the already known complex **2** (\square_{P} 3.42, -35.31 and -86.4 ppm) and a new species **4** (\square_{P} 55.76, -17.46 and -43.13 ppm).

**Fig 5.** ³¹P NMR spectrum (121 MHz) of complex **2** in acetonitrile at 25 °C after 48 h. General conditions: 80 scans accumulated.

³¹P NMR monitoring of this process showed that the group of signals attributed to complex **4** increased with time, which also produced the progressive diminution of the relative concentration of complex **2** (Figure 5). Similar behaviour has already been observed on the complexes formed when **1** and Y(NO₃)₃ react under different stoichiometries,²⁸ and in dota³⁷ and dotlike³⁸ macrocyclic ligands which showed two consecutive steps: fast formation of a di- or in some cases monoprotonated intermediate, which converts to the final 1:1 complex in a slow rate-determining step. The thermodynamic equilibrium was reached after *ca.* 120 hours with a ratio between **2** and **4** of 0.2:1.

Crystals of **4** could be grown by concentrating this mixture at -30 °C for several hours. Solid state structural characterization of the new species was achieved by single crystal X-ray diffraction, IR, combustion analysis and MS-TOF, all of them providing satisfactory results. The ESI-TOF spectra evidenced the 1:1 (metal: ligand) structure for complex **4** due the observation of the [M-Cl] peak at 947.1 together with its specific isotopic distribution profile. The Eu-based cluster is identified by the isotope pattern coming from ¹⁵¹Eu/¹⁵³Eu as indicated by the simulated distribution (Figure S1). The IR spectrum of complex **4** (KBr disk) displays bands in the range 1100 – 1203 cm⁻¹ that are again assigned to P=O stretching vibrations (Figure S2). Interestingly, the strongest band in this region shifted 15 cm⁻¹ to higher frequency with respect to the corresponding bands in the bicapped complex **2**, what supports a weaker binding to the europium cation.

The ^1H NMR spectrum of **4** showed 20 resonances that are significantly broader than those of **2**, which is indirect evidence of a faster paramagnetic relaxation. As for complex **2**, the *N*-isopropyl groups afforded two sets of signals: δ_{H} 2.02 and 2.65 ppm for the methyls and δ_{H} 3.25 ppm for the four methines. The analysis of the COSY spectrum allowed the assignment of most proton resonances (Figure 6).

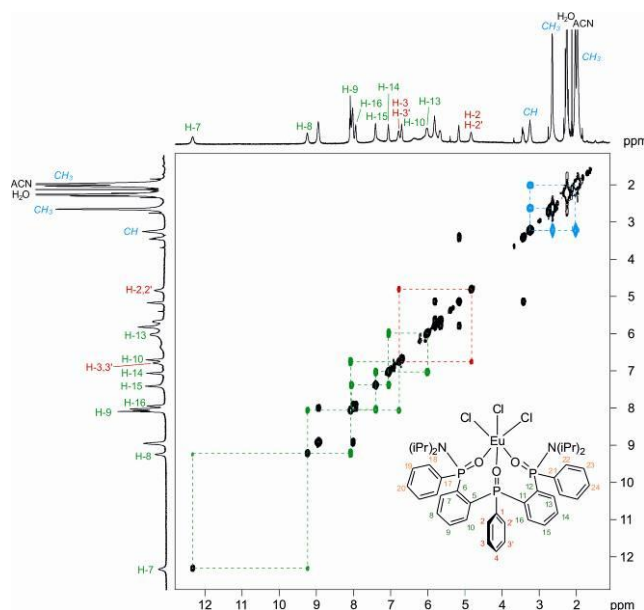


Fig 6. COSY-45 spectrum (300 MHz) of complex **4** in CD_3CN at 25 °C.

The monocapped complex (**4**) showed a similar behaviour in terms of isotropic shifts than the bicapped analogue (**2**), although several resonances couldn't be assigned due to overlapping issues (Table S2).† As in complex **2**, signals H-2, H-7, H-18 and H-19 showed the largest shifts compared to the yttrium complex **5** (chosen as diamagnetic reference), and demonstrate how these rings are twisted in solution towards the europium metal. It is interesting to note how the protons showing the higher isotropic shifts ($\delta_{\text{iso}} > 2$ ppm) are all involved in the metallacycle constructed through P_A and P_B (in bold in Figure 7). This ring is the most puckered of the two existing as will be shown in the solid-state discussion.

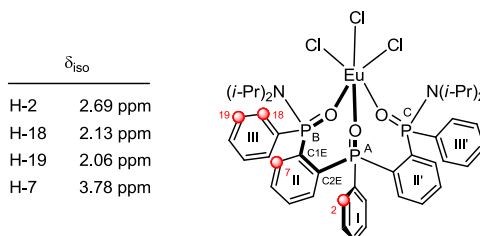


Fig 7. Selected ^1H isotropic shifts (δ_{iso}) for complex **4** at 300 MHz in CD_3CN at 25 °C.

Unfortunately, ^{13}C NMR and 2D heteronuclear correlations could not be measured. Probably, the very short relaxation times prevented the observation of any signal.

The X-ray structure was refined in the triclinic $P-1$ space group and showed a 1:1 stoichiometry and that the relative stereochemistry of the chiral phosphorus atoms was (R^*,S^*) (Figure 8). The complex **4** crystallizes with two acetonitrile molecules in the crystal lattice and, interestingly, no water and/or acetonitrile molecules were found coordinated to the europium atom constructing a six-coordinate environment. Crystallographic data and structural refinement details for **4** are summarized in Table 2.

Table 2. Crystallographic data and structural refinement details for **4**.

| Compound | 4 |
|---------------------------|--|
| Chemical formula | C ₄₆ H ₅₇ Cl ₃ EuN ₄ O ₃ P ₃ |
| M/gmol ⁻¹ | 1065.18 |
| T (K) | 103 |
| □/ Å | 0.71073 |
| Cryst syst | triclinic |
| Space group | <i>P</i> -1 |
| <i>a</i> / Å | 10.8547(8) |
| <i>b</i> / Å | 10.9159(8) |
| <i>c</i> / Å | 23.1074(16) |
| □/ deg | 83.8250(10) |
| □/ deg | 86.7060(10) |
| □/ deg | 63.3850(10) |
| <i>V</i> / Å ³ | 2433.5(3) |
| <i>Z</i> | 2 |
| □ (g cm ⁻³) | 1.454 |
| □ (mm ⁻¹) | 1.595 |
| Unique reflections | 12499 |
| R(<i>int</i>) | 0.0250 |
| GOF on F ² | 1.048 |
| R1 [I > 2σ(I)] | 0.039 |
| wR2 [I > 2σ(I)] | 0.093 |

The Eu(III) ion is coordinated to three oxygen atoms from the tridentate ligand **1** and three chloride anions in which the coordinated polyhedron of the europium atom exhibits a distorted octahedral geometry in a *facial* configuration (Figure 8b). The structural parameters can be compared with those of (Y(**1**)(NO₃)₃) (**5**).²⁸ The phosphorus atoms geometries are tetrahedral, with min/max bond angles variations of 105.2(2)-120.90(18) for P1, 105.21(18)-118.15(18) for P2 and 105.4(2)-115.42(19) for P3. The Eu-O(P) distances in **4** (2.326(3), 2.275(3) and 2.338(3) Å) are comparable to those observed in **5** (2.378(3), 2.250(3) and 2.233(3) Å), thus not affected by any *trans* effect caused by the chlorines atoms coordinated to the europium ion (Eu-Cl distances: 2.6262(11), 2.6493(11) and 2.6558(11) Å). As in **5**, the tripodal ligand is coordinated by the three phosphinoyl moieties with Eu-O-P angles of 136.38(17)°, 163.40(18)° and 157.65(19)° for P1, P2 and P3, respectively. As expected, metal coordination is accompanied by an appreciable increase of the P=O bond length (1.499(3), 1.492(3) and 1.507(3) Å for P1, P2 and P3, respectively) compared with the mean value of 1.482 Å reported for non-coordinated phosphinic amide analogues.³⁹ It should be noted that the EuO₃Cl₃ coordination sphere observed in **4** is infrequently found in Eu³⁺ complexes⁴⁰ where higher coordination numbers are usually preferred.

The *fac* configuration of the ligand implies the existence of two seven-membered metallacycles formed by binding the P=O groups to the Eu(III) ion. Inspection of the crystal structure data revealed that both metallacycles acquire an almost perpendicular disposition imposed by the tetrahedral configuration of P1 and the existing metal bite of the trident with a dihedral angle of 88.66°. In addition, as was already observed in its yttrium analogue **5**, it is worth noting that complex **4** had a parallel disposition of the phenyl ring bonded to P3 and the *ortho* substituted ring connected to P1 and P2 (distance between centroids of 3.371 Å). The mean least-squares planes defined by these aromatic rings have a dihedral angle of intersect at 4.52°. This significant alignment is also obvious in **5** (Figure S9), and agrees with a puckered metallacycle established through P1 and P2 with an angle P1-C2E-C1E-P2 of 25.7(6)° compared to the second metallacycle of 0.6(6)°. Complex **4** shows an arrangement of the tridentate ligand around the metal similar to **5** with bond angles in the ranges 73.66-81.04° for **4** and 76.08-80.81° for **5**, and indicates that the presence of chlorides or nitrate anions in the structure does not modify significantly the geometry of the complex.

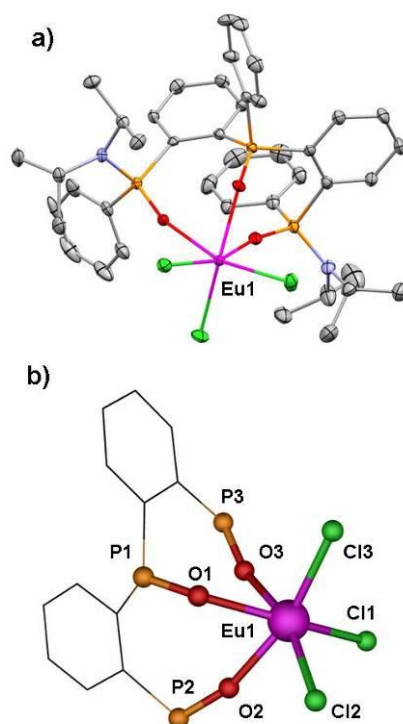


Fig 8. a) ORTEP view of **4**. Thermal ellipsoids are drawn at the 50% probability level. Crystallization acetonitrile molecules and hydrogen atoms have been omitted for clarity. b) A view of the metal environment and coordination mode of the ligand **1**.

Returning to the diffusion discussion, the hydrodynamic radius estimated for **4** (6.9 Å, Table 1), fits reasonably well with the radius calculated from the solid-state structure ($r_{\text{X-Ray}}$ 6.7 Å) and provides a strong evidence that the solid-state structure is retained in solution even in the presence of coordinating acetonitrile and/or water molecules.

The next section is divided in two parts. The solution luminescent study is discussed in first place followed by the implementation of **2** on solid phase membranes.

Solution luminescence

Luminescence properties. The formation of a luminescent complex between Eu(III) ion and ligand **1** was clearly observed. Fig 9a shows the excitation and emission spectra of the formed complex together with an almost non-existing excitation and emission bands for ligand **1** (grey colour in Figure 9a). The maximum excitation wavelength observed was 286 nm. The observed emission wavelengths were 594, 618, 660 and 704 nm, which correspond to the europium(III) characteristic transitions.¹⁸ The emission wavelength corresponding to the hypersensitive transition produced the highest relative luminescence intensity at 618 nm. An important characteristic of the luminescent complex is the capability of light absorption, which is described by the molar extinction coefficient (ϵ). The response of the absorbance vs complex **2** concentration showed a linear behaviour in the range of concentrations studied, characterized by a molar extinction coefficient of $1081 \text{ mol}^{-1} \text{ L cm}^{-1}$ at 286 nm.

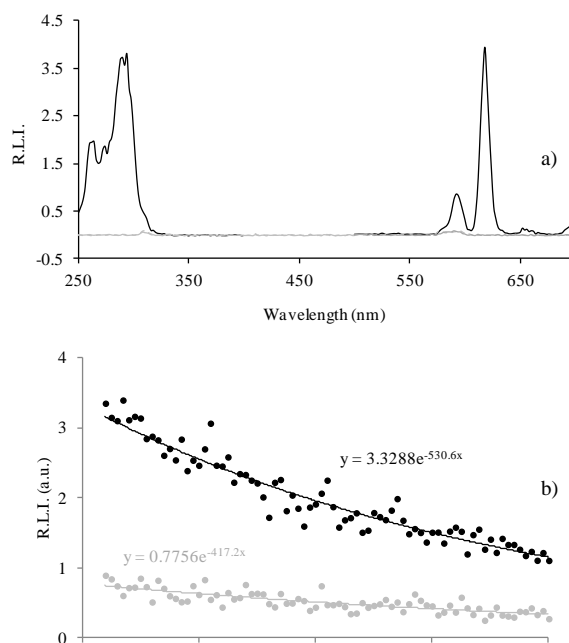
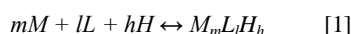


Fig.9. Luminescence characterization of **2** in solution; a) Luminescence spectra of **1**, **2** and Eu(III) salt and b) Luminescence decay in protonated (black line) and deuterated (grey line) solvents.

The stoichiometry of the complex formed between europium(III) and ligand **1** was studied via Joe-Jones method,⁴¹ unravelling a clear 1:2 stoichiometry complex, as indicated by NMR spectroscopy. It is important to mention that this study is performed immediately after mixing ligand **1** and $\text{EuCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, so that a kinetic situation is always reached (Figure S10).[†] Together with the metal:ligand ratio, another critical parameter for the appropriate characterization of any luminescent complex is the formation constant (β_{mlh}). Complex formation with organic ligands competes with hydrolysis, and the stability of Ln(III) complexes is typically evaluated in terms of the equilibrium constant established according to equations [1] and [2].⁴²



$$\square_{mlh} = [M_mL_lH_h] / [M]^m [L]^l [H]^h \quad [2]$$

The formation constant for complex **2** was calculated following reported methods⁴¹ which established a $\log \square_{120}$ value of 10.44 (25° C, pH 7.0, 75% EtOH (v/v) and 30 mmol L⁻¹ NaCl), comparable to other formation constant of reported europium complexes in solution.^{7d} However, complex **2** shows a pEu of 6.1, which is lower than other europium analogues.⁴³

The luminescence quantum yield of complex **2** was determined by the relative comparison procedure using *D*-tryptophan as standard.⁴⁴ The estimated relative luminescence quantum yield of complex **2** was $\Phi = 8\%$. The emission quantum yields of related phosphorous-based tridentate structures are in the range of 60-65% when bearing LVF (low vibrational frequency) structures.⁴⁵ For europium complexes bearing no LVF ligands, quantum yields comprising 2-12% are usually obtained.^{35b,46} The Φ results from a combination of energy transfers from the ligand chromophore and some non radiative deactivation pathways (possible back energy transfer from the metal to the chromophore) combined with some solvent oscillators from the inner coordination sphere. Fig. 8b shows the variation of the relative luminescence intensity versus time which has been used for determining the luminescence lifetime (τ) in both protonated and deuterated solvent. For each case, the decay profile was analysed as a single exponential component, indicative of a single emissive species with \square_H 1815 and \square_D 2385 \square s, respectively. The measured lifetimes can be utilised to deduce the inner-sphere coordination environment, in terms of the degree of lanthanide hydration, q .⁴⁷ This lifetime measurement indicates that the Eu(III) complex **2** do not contain inner-sphere water molecules ($q = 0.1$, uncertainty ± 0.2), pointing to the coordination of two tridentate ligands and chlorides enough to saturate the europium inner sphere.

In order to corroborate the lack of water molecules bound to the metal, TGA studies were carried out on the two europium complexes (Figure S11). The thermal decomposition of both complexes occurs in a multi-step process. The decomposition of complexes **2** and **4** proceeds with an endothermic peak in the temperature range 40-110 °C corresponding to lattice solvent

molecules. In the temperature range where the loss of coordinated water is expected to occur (*ca.* 115-200 °C), both complexes are stable. Above *ca.* 190 °C for **2** and *ca.* 230 °C for **4**, removal of chloride atoms from the chelates and decomposition of the tridentate ligand species began to be evident.

Effect of the media. It is known that the media affect the luminescence intensities of luminophores.^{44b} In order to obtain a deeper understanding, the effects of the addition of organic solvents such as ethanol, changes in ionic strength and changes in pH were evaluated. The absence of EtOH produced the precipitation of the ligand (**1**) in water solution, thus the tested percentages were 25, 50, 75 and 100% (v/v) (Figure S12).† The results indicate a relative luminescence intensity increment with higher loadings of ethanol. However, since a minimum amount of water is needed in order to determine Eu(III) ions in water samples, the selected ethanol percentage was 75% (v/v).

The effect of ionic strength (*I*) was studied by adding different concentrations of NaCl (0, 65, 125, 185 and 245 mmol L⁻¹) (Figure S13).† In overall, the ionic strength did not affect significantly the luminescent activity establishing a random NaCl concentration of 30 mmol L⁻¹.

The influence of pH on the luminescence intensity was studied over the range 3.0-11.0 (Figure S14).† The relative luminescence intensity remained approximately constant from pH 5.0 to 9.0, beyond which a drastic drop was observed. This drift at higher pH values could be caused by the formation of Eu(OH)₃ which is not soluble under these conditions. However, it is noteworthy that a significant increment of relative luminescence intensity was observed at pH below 5.0. Furthermore, the excitation and emission wavelengths at pH 5.0, were 286 nm and 618 nm respectively, whereas at pH 3.0 were 274 nm and 614nm, respectively. This hypsochromic shift could be ascribed to the formation of the corresponding diphosphoric acid PhPO(C₆H₄POPhOH)₂ (**6**), arising from the hydrolysis of the P-N bond, which is currently under study.⁴⁸ For this reason the working pH range was considered to be 5.0-9.0.

Sensing films luminescence

Luminescence characterization. It was observed that europium(III) ion showed very strong luminescence intensity for the PVC membrane based on ligand **1** principal line-type band (hypersensitive transition) among different lanthanides tested. This is most probably due to the selective interaction of the ligand and the europium(III) ion, and the fast exchange kinetics of the resulting complex. The excitation and emission spectra of the optimized membrane after europium(III) exposure are shown in Figure 10. As can be seen, the two observed emission peaks correspond to the characteristic line-type bands of europium(III) ion with regard to buffer emission signal. Only, the most intense line-type bands were observed and the emission maximum (616 nm) was almost not modified compared to the one observed in solution (618 nm).

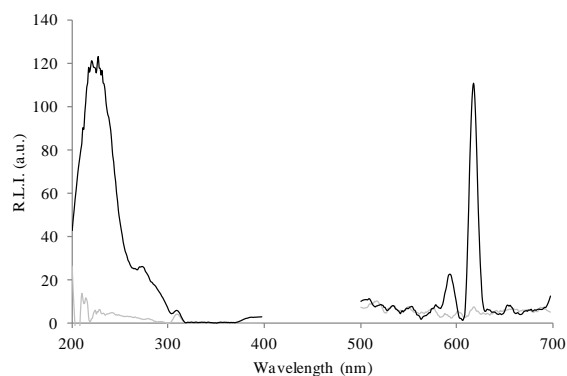


Fig 10. Luminescent spectral characterization of the optimized membrane sensor in absence (grey line) and in presence of europium(III) (black line).

In addition, a wide excitation band was observed with regard to buffer excitation signal. This band could be assigned to a combination of $n \rightarrow \pi^*$ and $\pi \rightarrow \pi^*$ transitions centred on the diphenylphosphinic amide and diphenylphosphine oxide units of **1**. The excitation maximum was shifted 57 nm (229.06 nm) with respect to that of solution (286.00 nm). This modification is probably due to the different environments of complex **2** in both aqueous solution and the liquid membrane, so other components of the membrane may affect the observed luminescence (see below). Regarding the temporal stability of the acquired signal, preliminary studies demonstrated that 10 min were necessary to obtain the maximum luminescence signal, as is usual with metal-based sensors.

Optimization of the sensing films. The plasticizer nature on the luminescent intensity of the membrane sensor was investigated. In its simplest form, it is a high-boiling organic solvent which, when added to a rigid substance, imparts flexibility. Different plasticizers (DOA, DOS, DOP and NPOE) were evaluated and their effect analyzed (Figure S15).† It

was observed that the esters plasticizers assayed DOA and DOS produced higher luminescence intensities compared to DOP and almost no signal was obtained with NPOE. Sebacate DOS (C10) derivatives usually possess better features such as volatility and low temperature flexibility than adipate DOA (C6), and therefore DOS was selected as the optimum plasticizer for the correct development of our sensing films. Five different percentages of DOS were tested i.e. 0, 20, 40, 65, and 90% (Figure S16).[†] It was observed that a percentage of 90% of plasticizer produced films with relatively bad mechanical properties that were very difficult to handle and that 65% provided the best reproducibility results, this percentage was chosen for further development of the final sensing membrane. The influence of ligand **1** and the percentage of the ionic additive on the membrane luminescence signal were investigated collectively by varying the concentrations of both ligand **1** and potassium tetrakis(4-chlorophenyl) borate (KTPCIPB) (both up to 3.5% (w/w)). KTPCIPB is an alkaline lipophilic salt, which is usually incorporated into membranes for electroneutrality reasons. The different compositions tested in this study and their luminescence intensities are shown in Table 3.

Table 3. Percentages of ligand **1** and the ionic additive used in the composition of the membranes.

| Membrane n° | Membrane composition (% w/w) | | | |
|-------------|------------------------------|--------|----------------------|------------------|
| | PVC ^a | Ligand | KTPCIPB ^b | DOS ^c |
| 1 | 31,4 | 3,5 | 0,0 | 65,1 |
| 2 | 30,2 | 3,5 | 1,2 | 65,1 |
| 3 | 29,7 | 3,5 | 1,8 | 65,1 |
| 4 | 27,9 | 3,5 | 3,5 | 65,1 |
| 5 | 31,6 | 2,5 | 0,8 | 65,1 |
| 6 | 31,2 | 2,5 | 1,3 | 65,1 |
| 7 | 29,9 | 2,5 | 2,5 | 65,1 |
| 8 | 32,7 | 1,5 | 0,8 | 65,1 |
| 9 | 32,4 | 1,5 | 1,0 | 65,1 |
| 10 | 31,9 | 1,5 | 1,5 | 65,1 |
| 11 | 32,4 | 2,5 | 0,0 | 65,1 |
| 12 | 33,4 | 1,5 | 0,0 | 65,1 |

^a Polyvinylchloride. ^b Potassium tetrakis(4-chlorophenyl) borate. ^c bis(2-ethylhexyl) sebacate.

A total of 12 membranes were evaluated according to their chemical composition (Figure S17).[†] No significant differences between them were observed, therefore it was deduced that ligand **1** concentration did not influence the membrane luminescence and that the addition of the ionic additive was not necessary since it did not produce a considerable enhancement of luminescence. The addition of KTPCIPB to the membrane composition was discarded which reduced the cost of membrane sensor fabrication. In agreement with the X-ray studies, it is assumed that what diffuses into the membrane is the contact ion pair EuCl_3 which agrees with the electroneutrality principle which governs the PIMs.

The pH dependence of the sensing films over the range 1.0-11.0 at $1.0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ of Eu(III) was evaluated (Figure S18).[†] Its dependence followed a distorted gaussian profile over the range of pH assayed. The maximum luminescence intensity was obtained at pH 5.0, which perfectly matched with the apparent pH measured in solution. Fast exchange kinetics are assumed to be produced inside the membrane at this pH. At $\text{pH} > 5.0$, a significant drift was observed, which could be ascribed to the formation of Eu(OH)_3 as mentioned before. At $\text{pH} < 5.0$, a gradual decrease on the luminescence intensity was observed, which was attributed to the gradual decomposition of complex **2**. The pH value of 5.0 was considered as the optimum for analyzing europium(III) ions in water samples, so the requirement for buffer solutions was mandatory in order to obtain satisfactory results. Different buffer solutions such as citrate, acetate, hydrogen phthalate and succinate, whose working pH range covered the optimum pH of 5.0, were analyzed. The buffer solutions were adjusted to pH 5.0 with concentrated HCl/NaOH. The luminescence intensities for these different buffer solutions are depicted in Fig 11.

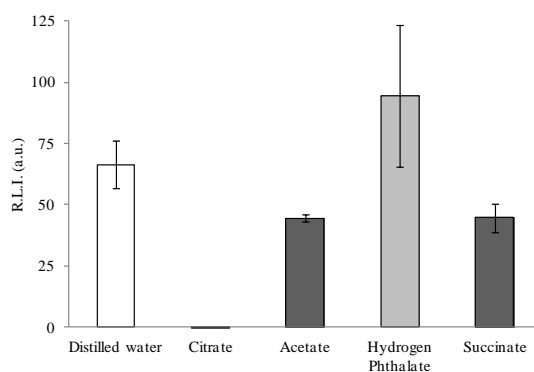


Fig 11. Luminescence signals of the optimized sensing membrane with different buffer solutions. $[\text{Eu}^{3+}] = 1.0 \times 10^{-6} \text{ M}$; $\text{pH} 5.0$; 0.1 M .

Luminescence signal was not observed in the membrane when using sodium citrate. It is well known that citrate acts as a strong coordinating agent for lanthanides,⁴⁹ thereby forming stable complexes with europium(III) ions in solution, and inhibiting their diffusion into the membrane.⁵⁰ Acetate and succinate slightly reduced the luminescence intensity, whereas the hydrogen phthalate buffer solution provided the maximum enhancement. A reasonable explanation for this behaviour is that the acetate and succinate anions partially complex europium, while the hydrogen phthalate did not bind at all which allowed the whole concentration of these ions to diffuse inside the membrane which consequently provided the most intense signal. Therefore, hydrogen phthalate solution at pH 5.0 was the buffer solution of choice to prepare europium(III) water samples for subsequent analysis.

The influence of the buffer concentration (ionic strength) on the sensing film was also tested at 0, 25, 50, 75 and 100 mmol L⁻¹ (Figure S19).† The luminescence signal was not affected by the ionic strength of these solutions providing larger errors in the measurements, so a minimum hydrogen phthalate buffer concentration of 25 mmol L⁻¹ was selected as the optimum.

Selectivity of the sensing film. Selective behavior is clearly one of the most important parameters of a sensing film. Four lanthanide(III) ions (lanthanum, samarium, terbium and ytterbium) were selected as interfering ions in order to check the selectivity of the sensing membrane. Fig. 12 shows the results of this study. Lanthanum, samarium and ytterbium(III) ions had lower signals than terbium(III) ion, which provided a negligible luminescence signal with regard to europium(III) ion signal. Therefore, it can be concluded that significant lanthanide interferences were not observed and the luminescent signals were additive for lanthanide(III) ions.

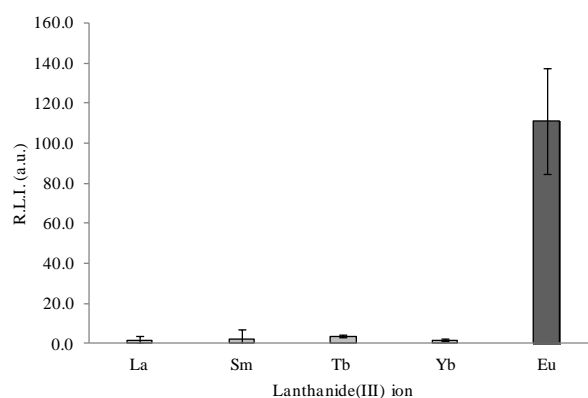


Fig 12. Luminescence responses of the optimized sensing membrane as a function of lanthanide(III) ion.

The luminescence intensities of sensing membranes at varying concentrations of europium(III) solutions are depicted in the ESI (Figure S20).† The results indicated a linear working concentration range from 1.6×10^{-7} to 5.0×10^{-6} mol L⁻¹, a detection limit (DL) of 4.8×10^{-8} mol L⁻¹ and a quantification limit (QL) of 1.6×10^{-7} mol L⁻¹. The sensitivity of the proposed sensing films is the highest which has been published so far. To the best of our knowledge, the lowest detection limit published in the literature^{7d} is one order of magnitude higher than the one reported herein.

Experimental

Instrumentation and apparatus

Aminco Bowman Series 2 Luminescence Spectrometer (Sim Aminco, Madison, USA) interfaced with a computer was used to perform the luminescent spectra and the relative luminescent intensity measurements in solution using 111-QS suprasil quartz cuvettes (light path= 10 x 10 mm), which were purchased from Hellma (Hellma, Jamaica, USA). Cary Eclipse Varian Fluorescence Spectrophotometer (Varian, Mulgrave, Australia) equipped with a front surface accessory was used to measure the luminescent spectra and relative luminescent intensities of the sensing films. AMicroPH2000 Crison pHmeter (Crison, Alella, Spain) was used to adjust the pH of the solutions.

WS-400B-6NPP/LITE Laurell spin coater (Laurell, North Wales, USA) was applied for the preparation of the polymeric inclusion membranes by spin coating technique. A G560E Vortex-Genie 2 mixer (Scientific Industries, Bohemia, USA) was used to obtain the polymeric solution. Solution sonication was achieved by an Ultrasons Selecta ultrasonic bath (JP Selecta, Abrera, Spain).

Thermogravimetric measurements were carried out on a TGA Q50 (TA Instruments). The experiments were performed in the temperature range from 20 to 350 °C at heating rates of 10 °C min⁻¹ on each sample. The average sample amount was 7 mg and the nitrogen flow rate was 50 mL min⁻¹.

¹H (300.13 MHz), ¹³C (75.47 MHz), and ³¹P (121.47 MHz) NMR spectra were recorded in CDCl₃ and CD₃CN, except otherwise stated, on a Bruker Avance DPX300 equipped with a QNP ¹H/¹³C/¹⁹F/³¹P probe. Chemical shifts are reported in

ppm with respect to tetramethylsilane for ^1H and ^{13}C using the solvent signal as reference and to external 85% H_3PO_4 for ^{31}P . Standard Bruker software was used for acquisition and processing routines. Elemental analyses were carried out with an Elementar Vario Micro cube system. Infrared spectra were recorded in a Mattson-Genesis II FTIR system. High resolution mass spectra were recorded on Agilent Technologies LC/MSD TOF and HP 1100 MSD equipment with electrospray ionization (ESI). Melting points were recorded on a Büchi B-540 capillary melting point apparatus and were uncorrected. Diffusion measurements were performed using the Stimulated Echo Pulse Sequence⁵¹ on a Bruker Avance 500 without spinning. The shape of the gradient pulse was rectangular, and its strength varied automatically in the course of the experiments. The calibration of the gradients was carried out via a diffusion measurement of HDO in D_2O , which afforded a slope of $2.022 \cdot 10^{-4}$. To check reproducibility, three different measurements with different diffusion parameters (\square and/or \square) were always carried out. The gradient strength was incremented in 8 % steps from 10 % to 98 %.

Crystal structure determination: Single crystals of **4** suitable for XRD were obtained by crystallisation from a concentrated acetonitrile solution of **4** at $-30\text{ }^\circ\text{C}$. The single crystals were covered with perfluoropolyalkyl ether oil and then mounted on top of a glass fibre. Subsequently, they were placed in the cold nitrogen stream of a low-temperature device to achieve solidification of the oil. Data collection for the X-ray structure determinations was performed with a Bruker Smart 1000 CCD diffractometer with $\text{MoK}\alpha$ ($\lambda = 0.71073\text{ \AA}$) radiation source and a low-temperature device. All calculations were performed with SHELXTL (v6.12) and SHELXL-97,^{52,53} and data were corrected for absorption using SADABS.⁵⁴ The structures were solved by direct methods⁵⁵ and refined with full-matrix least-squares calculations on *F*².⁵⁶ All non-hydrogen atoms were refined anisotropically. The contribution of the hydrogen atoms, in their calculated positions, was included in the refinement using a riding model. Upon convergence, the final Fourier difference map of the X-ray structures showed no significant peaks. Crystallographic data for the structure reported in this paper have been deposited with the Cambridge Crystallographic Data Centre as a supplementary publication n^o CCDC 855721. Copies of the data can be obtained free of charge on application to CCDC, 12 Union Road, Cambridge CB21EZ, UK (fax: (+44)1223-336-033; email: deposit@ccdc.cam.ac.uk).

Membrane preparation

The optimum membrane solution was prepared by mixing thoroughly in a closed vial 33.4% (w/w) of powdered PVC, 65.1% (w/w) of bis(2-ethylhexyl) sebacate and 1.5% (w/w) of ligand **1** (sensitizing agent) for 200 mg of total mass in 3.0 mL of THF. The obtained mixture was stirred continuously with the aforementioned mixer until its complete dissolution. A volume of 300 μL of the resulting solution was deposited on the glassy material and spin-coated at 700 rpm at room temperature until complete solvent evaporation. The transparent, ultrathin and homogeneous film obtained is called Polymeric Inclusion Membrane (PIM). Once the polymeric membrane was prepared, it was stored in a closed recipient at room temperature in the absence of light until its use.

The membranes were immersed in 20 mL of the blank solution during 10 min, dried with a nitrogen flow and measured. Subsequently, they were immersed in 20 mL of the standard solution of Eu(III) during 10 min, dried and measured. When not in use, the membranes were kept in a closed recipient at room temperature. Finally, the membranes already measured were eliminated.

Luminescence characterization

The luminescent measurements of complex $[\text{Eu}(\mathbf{1})_2]\text{Cl}_3$ (**2**) in solution were achieved at $\lambda_{\text{exc/em}} = 286/618\text{ nm}$, which corresponds with the maxima excitation and emission wavelengths of the formed complex **2**. A delay on measurement time was selected to avoid the fluorescence background. Table 4 lists the optimized instrumental variables for the measurements carried out in both solution and membrane.

Table 4. Optimized instrumental variables used for measuring in solution and membrane

| Variable | Optimum value (solution) | Optimum value (membrane) |
|-----------------------------------|--------------------------|--------------------------|
| $\lambda_{\text{exc/em}}$ (nm) | 286.00/618.00 | 229.06/616.02 |
| Slit width _{exc/em} (nm) | 8/8 | 5/5 |
| Detector voltage (V) | 800 | 650 |
| Total decay time (ms) | - | 20 |
| Delay time (μs) | 120 | 120 |
| Gate time (ms) | 0.150 | 5 |
| Number of flashes | - | 1 |

The complex **2** luminescence intensity in solution was considered as the difference between the luminescence intensity before and after the addition of the europium(III) solution. The variation of the relative luminescence intensity of complex **2** versus time is depicted in the ESI (Figure S21).[†] It shows that the complex **2** formation was instantaneous and the gradual decrease in intensity was due to its photochemical degradation. Thus, all the measurements were developed just after their preparation.

The molar extinction coefficient was calculated by an external calibration of complex **2** in solution mixing europium(III) salt $\text{EuCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ and ligand **1** solution in the adequate proportion. The reaction medium consisted of a mixture of ethanol/water (1:1). The relative luminescence quantum yield (Φ) of complex **2** was determined by the relative comparison procedure, using *D*-tryptophan in water as the standard.⁴⁴ Both the solution of *D*-tryptophan in water and the solution of complex **2** in ethanol/water mixture (1:1) were measured with the same instrumental conditions at 286 nm.

The luminescence measurements of the membranes were carried out at $\lambda_{\text{exc/em}} = 229/616$ nm, which corresponded with the maxima of excitation and emission wavelengths of complex **2** formed in solid phase (Table 4). The membrane was placed on the front surface accessory located in the sample compartment of the luminescence spectrophotometer. The membrane response was considered as the difference between the luminescence intensities of the membrane immersed in standard and blank solutions.⁵⁷ In both cases, all the experiments were carried out in triplicate to calculate the error. Hydration number, q , was obtained using equation [3] where τ_{H} and τ_{D} , respectively, refer to the measured luminescence decay lifetime (in milliseconds) in protonated or deuterated solvents, using $A = 1.2$ and $B = 0.25$ (estimated error ± 0.2 water molecules).⁴⁷

$$q = A (1/\tau_{\text{H}} - 1/\tau_{\text{D}} - B) \quad [3]$$

Synthesis of complex 2

To a suspension of **1** (30 mg, 0.042 mmol) in 0.75 mL MeCN, $\text{Eu}(\text{Cl})_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (7.6 mg, 0.021 mmol) was added. After 15 minutes of stirring the reaction was complete. Slow evaporation of the corresponding solution provided 29 mg (83% yield) of the desired complex of more than 97% purity.

(**2**): Mp 236-238 °C. IR (KBr disk): $\square_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ 3054 (w), 2973 (m), 1630 (m), 1437 (m), 1167 (s, st P=O), 1057 (w), 987 (m), 746 (s), 696 (s), 570 (s), 543 (s). ¹H NMR: -0.88 (H-18), 1.88 (CH(CH₃)₂), 3.93 (H-16), 4.00 (CH(CH₃)₂), 4.42 (H-2), 4.58 (H-2'), 4.85 (H-19), 5.45 (H-15), 5.89 (H-14), 5.96 (H-20, 19', 18'), 6.14 (d, ³J_{HH} 7.1 Hz, H-10), 6.23 (d, ³J_{HH} 8.2 Hz, H-13), 6.28 (H-3), 6.42 (CH(CH₃)₂), 6.79 (H-3'), 7.16 (t, ³J_{HH} 7.3 Hz, H-4), 7.93 (t, ³J_{HH} 7.3 Hz, H-9), 8.22 (H-23), 8.50 (t, ³J_{HH} 7.2 Hz, H-24), 8.66 (t, ³J_{HH} 7.3 Hz, H-8), 8.77 (H-22), 9.88 (d, ³J_{HH} 6.6 Hz, H-7). ¹³C NMR: 23.92 (d, ³J_{PC} 4.6 Hz, CH(CH₃)₂), 26.96 (s, CH(CH₃)₂), 52.66 (d, ²J_{PC} 6.2 Hz, CH(CH₃)₂), 103.92 (d, ¹J_{PC} 115.3 Hz, C-1), 121.80 (d, ¹J_{PC} 135.2 Hz, C-21), 123.61 (d, ¹J_{PC} 116.54 Hz, C-17), 125.69 (d, ³J_{PC} 14.1 Hz, C-19), 126.00 (d, ²J_{PC} 11.6 Hz, C-2'), 126.45 (d, ³J_{PC} 12.4 Hz, C-3'), 128.66 (d, ³J_{PC} 11.2 Hz, C-3), 129.62 (d, ²J_{PC} 14.1 Hz, C-18'), 130.02 (d, ³J_{PC} 13.7 Hz, C-23), 130.10 (C-18), 130.35 (dd, ³J_{PC} 12.8 Hz, ⁴J_{PC} 1.6 Hz, C-15), 130.93 (d, ⁴J_{PC} 2.5 Hz, C-20), 131.12 (d, ³J_{PC} 14.5 Hz, ⁴J_{PC} 2.5 Hz, C-14), 131.81 (C-2), 132.58 (d, ⁴J_{PC} 2.5 Hz, C-4), 133.52 (d, ³J_{PC} 13.1 Hz, ⁴J_{PC} 2.3 Hz, C-9), 133.95 (d, ⁴J_{PC} 2.5 Hz, C-24), 134.37 (d, ³J_{PC} 11.8 Hz, ⁴J_{PC} 2.3 Hz, C-8), 135.18 (d, ²J_{PC} 15.9 Hz, ³J_{PC} 10.5 Hz, C-16), 135.75 (d, ²J_{PC} 10.3 Hz, C-22), 136.80 (d, ²J_{PC} 15.5 Hz, ³J_{PC} 10.4 Hz, C-13), 137.25 (d, ²J_{PC} 14.3 Hz, ³J_{PC} 11.7 Hz, C-10), 137.53 (dd, ²J_{PC} 7.8 Hz, C-12), 139.26 (dd, ²J_{PC} 7.0 Hz, C-6), 138.92 (t, ²J_{PC} 9.7 Hz, C-7), 103.92 (d, ¹J_{PC} 106.5 Hz, ²J_{PC} 12.3 Hz, C-5). ³¹P NMR: -35.3 (d, ³J_{PP} 8.9 Hz, P-B), -86.1 (P-C), 3.4 (t, ³J_{PP} 6.7 Hz, P-A). MS-ESI, m/z: 1671.4813 (M-Cl) (17.1%). Analysis: Calcd. (%) for C₈₄H₁₀₂Cl₃EuN₄O₆P₆·(+5H₂O): C, 56.11; H, 6.28; N, 3.12. Found: C, 55.54; H, 6.26; N, 3.00.

Synthesis of complex 4

To a suspension of **1** (30 mg, 0.042 mmol) in 0.75 mL MeCN $\text{Eu}(\text{Cl})_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (15.2 mg, 0.042 mmol) was added. After 18 hours of stirring, a white solid precipitate which was filtered and washed with diethyl ether providing 24 mg (75% yield) of complex **4** as an air stable solid of more than 97% purity. Crystals suitable for X-ray diffraction analysis were obtained from an acetonitrile solution of **4** by storage at -30 °C for three days.

(**4**): Mp 269-271°C (dec.). IR (KBr disk): $\square_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ 3054 (w), 2974 (w), 1631 (m), 1437 (m), 1186 (s, st P=O), 1058 (w), 987 (m), 746 (s), 696 (s), 572 (s), 542 (s). ¹H NMR: 2.02 (CH(CH₃)₂), 2.64 (CH(CH₃)₂), 3.25 (CH(CH₃)₂), 3.43 (H-24), 4.84 (H-2), 5.17 (H-19), 5.67 (H-18), 5.83 (H-25), 6.03 (H-13), 6.70 (H-3), 6.78 (H-10), 7.06 (H-14), 7.41 (H-15), 7.94 (H-16), 8.02 (H-23), 8.09 (t, ³J_{HH} 7.5 Hz, H-9), 8.95 (H-22), 9.24 (H-8), 12.34 (H-7). Signals H4 and H-20 not located. ³¹P- NMR: -43.7 (P-B), -18.6 (P-C), 54.6 (P-A). MS-ESI, m/z: 947.1691 (M-Cl) (68%). Analysis: Calcd. (%) for C₄₂H₅₁Cl₃EuN₂O₃P₃: C, 51.31; H, 5.23; N, 2.85. Found: C, 51.67; H, 5.48; N, 2.50.

Conclusions

A new tridentate bis(phosphinic amide)-phosphine oxide $\text{PhPO}(\text{C}_6\text{H}_4\text{POPhN}(\text{CH}(\text{CH}_3)_2)_2)_2$ (**1**) was characterized to evaluate its potential for the development of an Eu(III)-sensing film. Complexes $[\text{Eu}(\text{I}_2)\text{Cl}_3]$ (**2**) and $[\text{Eu}(\text{I})\text{Cl}_3]$ (**4**) were isolated by mixing ligand **1** with $\text{Eu}(\text{Cl}_3) \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ in acetonitrile at room temperature in a ligand to metal molar ratio of 1:2 and 1:1, respectively. The 1:1 derivative is the product of thermodynamic control when a molar ratio of ligand to europium salt of 1:1 is used and large reaction times are employed. The new compounds were characterised in both the solid (IR, MS-TOF, elemental analysis, TGA and X-ray diffraction) and solution (multinuclear magnetic resonance). In both europium complexes, the ligand acts as a tridentate chelate. TGA studies illustrates that either **4** or **5** do not possess any coordinated water molecule directly bounded to the lanthanide metal confirming their luminescent lifetimes and X-ray structures. The

investigation of the solution behaviour of the Eu(III) complexes through multidimensional NMR and PGSE diffusion measurements showed that average structures in agreement with the 1:1 and 1:2 stoichiometries are retained in acetonitrile solutions.

The spectroscopic (large Stokes shift, long luminescence lifetime and emission spectrum with very narrow bands) and chemical (wide range pH and no influence of ionic strength) characteristics of the luminescent complex **2** in solution were excellent indicators for carrying out the immobilization of **1** into a solid support. The results presented here demonstrate that PVC:DOS:1 luminescence sensing films were developed for the determination of europium(III) ions in aqueous media. The nature and percentage of plasticizer as well as ligand **1** and ionic additive concentrations were investigated to optimize the chemical composition of the sensing film. Optimum membrane composition was 33.4:65.1:1.5 (% w/w) PVC:DOS:1. The response of the sensing film was strongly influenced by the working pH, so a previous pH adjustment is necessary for analyzing europium(III) water samples. Hydrogen phthalate buffer solution, whose concentration was 25 mmol L⁻¹, was used to obtain the maximum luminescence signal maintaining the optimum pH of 5.0. The sensing phase was highly selective for the determination of europium(III) ions. It showed a short response time (10 min) and a linear range from 1.6 x 10⁻⁷ to 5.0 x 10⁻⁶ mol L⁻¹ with a detection limit of 4.8 x 10⁻⁸ mol L⁻¹.

Extension of the present chemistry to other rare-earth elements is currently being done, and future work will be directed at tuning the ligand properties in order to increase the luminescent efficiency and to develop improved devices for detecting several gases as in pollution control and environmental monitoring.

Acknowledgements

This work was supported by Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa de la Junta de Andalucía (projects P07-FQM-2625 and 2738), Ministerio de Ciencia e Innovación (MICINN) and fondos FEDER (projects CTQ2008-117BQU and 1394BQU). We thank Dr. R. Romero for helpful discussions and technical assistance on ESI-TOF analysis.

References

- (a) K. A. Gschneidner and L. Eyring, *Handbook on the Physics and Chemistry of the Rare Earths*, vol. 1, North Holland Publishing Co., Amsterdam 1979. (b) V. S. Sastri, J. C. G. Bunzli, V. R. Rao, G. V. S. Rayudu and J. R. Perumareddi, *Modern Aspects of Rare Earths and their Complexes*, Elsevier, Amsterdam, 2003. (c) S. P. Fricker, *Chem. Soc. Rev.*, 2006, **35**, 524-533.
- (a) C. A. Hampel and R. Book, *The Encyclopedia of Chemical Elements*, Corporation, New York, 1968. (b) Y. Nakamura, Y. Tsumura, Y. Tonogai, T. Shibata and Y. Ito, *Fundam. Appl. Toxicol.*, 1997, **37**, 106. (c) H. Zhang, J. Feng, W. Zhu, C. Liu, S. Xu, P. Shao, D. Wu, W. Yang and J. Gu, *Biol. Trace Elem. Res.*, 2000, **73**, 1. (d) S. Brambilla, S. Valaperta, G. Graziani, and A. Montanelli, *Clin. Biochem.*, 2008, **41**, 1029. (e) S. Zaichick, V. Zaichick, V. Karandashev and S. Nosenko, *Metallomics*, 2011, **3**, 186.
- (a) B. Vijayalakshmy and T. P. Rao, *Fresenius J. Anal. Chem.*, 2001, **370**, 251. (b) W. Yongxing, W. Xiaorong and H. Zichun, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 2000, **64**, 611. (c) M. L. He, Y. Z. Wang, Z. R. Xu, M. L. Chen and W. A. Rambeck, *J. Anim. Physiol. Anim. Nutri.*, 2003, **87**, 229.
- Y. Suzuki, T. Suzuki and N. Furuta, *Anal. Sci.*, 2010, **26**, 929.
- (a) N. Arnaud and J. Georges, *Analyst*, 1997, **122**, 143. (b) C. Huang, Z. Jiang and B. Hu, *Talanta*, 2007, **73**, 274. (c) C. Karadas, D. Kara and A. Fisher, *Anal. Chim. Acta*, 2011, **689**, 184. (d) L. M. Moretto, J. Chevalet, G. A. Mazzocchin and P. Ugo, *J. Electroanal. Chem.*, 2001, **498**, 117. (e) C.-Y. Liu, N. M. Lee and T.-H. Wang, *Anal. Chim. Acta*, 1997, **337**, 173.
- (a) T. Grady, S. Maskula, D. Diamond, D. J. Mars, M. A. McKervey and P. O'Hagan, *Anal. Proc. Incl. Anal. Commun.*, **1995**, 32, 471. (b) H. A. Zamani, G. Rajabzadeh and M. R. Ganjali, *Bull. Chem. Soc. Japan*, 2007, **80**, 172.
- (a) M. R. Ganjali, M. Rahimi, B. Maddah, A. Moghimi and S. Borhany, *Anal. Sci.*, 2004, **20**, 1427. (b) M. R. Ganjali, P. Norouzi, A. Daftari, F. Farihod and M. Salavati-Niasari, *Sens. Actuators B*, 2007, **120**, 673. (c) M. R. Ganjali, N. Davarkhah, H. Ganjali, B. Larijani, P. Norouzi and M. Hossieni, *Int. J. Electrochem. Sci.*, 2009, **4**, 762. (d) M. R. Ganjali, M. Hosseini, M. Hariri, P. Norouzi, A. A. Khandar and A. Bakhtiari, *Mater. Sci. Eng. C*, 2010, **30**, 929.
- (a) S. Tyagi, S., H. Agarwal and S. Ikram, *Ind. J. Chem.*, **2010**, **49A**, 1325. (b) X. Ma, Z. Xu, H. Yuan, Y. He, D. Xiao and M. M. F. Choi, *Sens. Actuators B*, 2010, **147**, 152.
- (a) J. F. Fernandez-Sanchez, I. Fernandez, R. Steiger, R. Beer, R. Cannas and U. E. Spichiger-Keller, *Adv. Funct. Matter.*, 2007, **17**, 1188. (b) A. L. Medina-Castillo, J. F. Fernandez-Sanchez, A. Segura-Carretero and A. Fernandez-Gutierrez, *Biosens. Bioelectr.*, 2009, **25**, 442. (c) A. L. Medina-Castillo, G. Mistlberger, J. F. Fernandez-Sanchez, A. Segura-Carretero, I. Klimant and A. Fernandez-Gutierrez, *Macromolecules*, 2010, **43**, 55. (d) A. L. Medina-Castillo, J. F. Fernandez-Sanchez and A. Fernandez-Gutierrez, *Adv. Funct. Matter.*, 2011, **21**, 3488.
- (a) S. Chen, H. Zhao, X. Wang, X. Li and L. Jin, *Anal. Chim. Acta*, 2004, **506**, 25. (b) C. Guo, A. Lang, L. Wang and W. Jiang, *J. Lumin.*, 2010, **130**, 591.
- G. Stein and E. Wurzburg, *J. Chem. Phys.*, 1975, **62**, 208.
- (a) A. Thibon and V. Pierre, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2009, **394**, 107. (b) M. A. Katkova and M. N. Bochkarev, *Dalton Trans.*, 2010, **39**, 6599. (c) M. L. Cable, D. J. Levine, J. P. Kirby, P. James, H. B. Gray and A. Ponce, *Adv. Inorg. Chem.*, 2011, **63**, 1. (c) S. Shinoda and H. Tsukube, *Analyst*, 2011, **136**, 431.
- (a) J.-M. Lehn, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 1990, **29**, 1304. (b) L. Armelao, S. Quici, F. Barigelletti, G. Accorsi, G. Bottaro, M. Cavazzini and E. Tondello, *Coord. Chem. Rev.*, 2010, **254**, 487. (c) P. A. Tanner and C.-K. Duan, *Coord. Chem. Rev.*, 2010, **254**, 3026.
- V. W. W. Yam and K. K. W. Lo, *Coord. Chem. Rev.*, 1999, **184**, 157.
- (a) M. H. V. Werts, *Sci. Prog.*, 2005, **88**, 101. (b) J.-C. G. Bunzli, *J. Alloys Compd.*, 2006, **408-412**, 934.
- (a) K. Mikami, M. Terada and H. Matsuzawa, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2002, **41**, 3554. (b) H. C. Aspinall, *Chem. Rev.* 2002, **102**, 1807.

- ¹⁷ N. Ishikawa, M. Sugita, T. Ishikawa, S. Koshihara and Y. Kaizu, *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, **125**, 8694.
- ¹⁸ (a) F. S. Richardson, *Chem. Rev.*, 1982, **82**, 541. (b) Y. Zheng, Y. Zhou, J. Yu, Y. Yu, H. Zhang and W. P. Guillin, *J. Phys. D: Appl. Phys.*, 2004, **37**, 531.
- ¹⁹ F. E. Mercader-Trejo, E. Rodríguez de San Miguel and J. de Gyves, *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 2009, **84**, 1323.
- ²⁰ (a) M. R. Ganjali, P. Norouzi, T. Alizadeh, A. Tajarodi and Y. Hanifehpour, *Sens. Actuators B*, 2007, **120**, 487. (b) A. K. Singh, A. K. Jain and S. Mehtab, *Anal. Chim. Acta*, 2007, **597**, 322. (c) V. Gupta, A. Singh and B. Gupta, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2008, **390**, 2171. (d) A. K. Singh, A. K. Jain and J. Singh, *Electrochim. Acta*, 2009, **54**, 5640.
- ²¹ (a) H. A. Zamani, A. Imani, A. Arvinfar, F. Rahimi, M. R. Ganjali, F. Faridbod and S. Meghdadi, *Mater. Sci. Eng. C*, 2011, **31**, 588. (b) M. R. Ganjali, F. S. Mirmaghi, P. Norouzi and M. Adib, *Sens. Actuators B*, 2006, **115**, 374. (c) M. R. Ganjali, F. Faridbod, P. Norouzi and M. Adib, *Sens. Actuators B*, 2006, **120**, 119. (d) S. K. Menon, N. R. Modi, B. Patel and M. B. Patel, *Talanta*, 2011, **83**, 1329.
- ²² H. A. Zamani, M. S. Zabihi, M. Rohani, A. Zangeneh-Asadabadi, M. R. Ganjali, F. Faridbod and S. Meghdadi, *Mater. Sci. Eng. C*, 2011, **31**, 409.
- ²³ (a) T. M. Ward, I. W. Allcox and G. H. Wahl, Jr., *Tetrahedron Lett.*, 1971, **12**, 4421; (b) F. Berny, N. Muzet, L. Troxler, A. Dedieu and G. Wipff, *Inorg. Chem.*, 1999, **38**, 1244; (c) M. Baaden, F. Berny, C. Boehme, N. Muzet, R. Schurhammer and G. Wipff, *J. Alloys Comp.*, 2000, **303-304**, 104; (d) C. Boehme and G. Wipff, *Inorg. Chem.*, 2002, **41**, 727; (e) B. Coupeuz, C. Boehme and G. Wipff, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2002, **4**, 5716.
- ²⁴ For recent references see: (a) M. Bosson, W. Levason, T. Patel, M. C. Popham and M. Webster, *Polyhedron*, 2001, **20**, 2055. (b) J. Fawcett, A. W. G. Platt and D. R. Russell, *Polyhedron*, 2002, **21**, 287. (c) J.-C. Berthet, M. Nierlich and M. Ephritikhine, *Polyhedron*, 2003, **22**, 3475. (d) M. J. Glazier, W. Levason, M. L. Matthews, P. L. Thornton and M. Webster, *Inorg. Chim. Acta*, 2004, **357**, 1083. (e) A. P. Hunter, A. M. J. Lees and A. W. G. Platt, *Polyhedron*, 2007, **26**, 4865. (f) S. Mishra, *Coord. Chem. Rev.*, 2008, **252**, 1996. (g) A. Bowden, A. W. G. Platt, K. Singh and R. Townsend, *Inorg. Chim. Acta*, 2010, **363**, 243.
- ²⁵ J.-G. Mao, *Coord. Chem. Rev.*, 2007, **251**, 1493.
- ²⁶ For recent references see: (a) A. M. J. Lees and A. W. G. Platt, *Inorg. Chem.*, 2003, **42**, 4673. (b) A. M. J. Lees and A. W. G. Platt, *Polyhedron*, 2005, **24**, 427. (c) Z. Spichal, M. Necas and J. Pinkas, *Inorg. Chem.*, 2005, **44**, 5673. (d) D. O. Kirsanov, A. V. Legin, V. A. Babain and Y. G. Vlasov, *Russ. J. Appl. Chem.*, 2005, **78**, 568. (e) K. Matloka, A. K. Sah, M. W. Peters, P. Srinivasan, A. V. Gelis, M. Regalbuto and M. J. Scott, *Inorg. Chem.*, 2007, **46**, 10549. (f) Z. Spichal, V. Petricek, J. Pinkas and M. Necas, *Polyhedron*, 2008, **27**, 283. (g) M. A. Subhan, Y. Hasegawa, T. Suzuki, S. Kaizaki and Y. Shozo, *Inorg. Chim. Acta*, 2009, **362**, 136. (h) S. Pailloux, C. E. Shirima, A. D. Ray, E. N. Duesler, R. T. Paine, J. R. Klaehn, M. E. McIlwain and B. P. Hay, *Inorg. Chem.*, 2009, **42**, 3104.
- ²⁷ C. Silvestru and J. E. Drake, *Coord. Chem. Rev.*, 2001, **223**, 117.
- ²⁸ C. Popovici, I. Fernandez, P. Oña-Burgos, L. Rocés, S. García-Granda and F. López-Ortiz, *Dalton Trans.*, 2011, **40**, 6691.
- ²⁹ The isotropic shift is equal to the difference between the chemical shift of a given nucleus and position in the paramagnetic species in question and the chemical shift of the same locus in an appropriate diamagnetic reference compound. For this purpose we employ chemical shifts of complex $[Y(1)_2(NO_3)_3]$ (**3**) as diamagnetic reference. See for instance: J. Lisowski, J. L. Sessler and T. D. Mody, *Inorg. Chem.*, 1995, **34**, 4336.
- ³⁰ D. R. Eaton, *J. Amer. Chem. Soc.*, 1965, **87**, 3097. (b) J. K. M. Sanders and D. H. Williams, *J. Amer. Chem. Soc.*, 1971, **93**, 641.
- ³¹ Peters, J. A.; Huskens and J.; Raber, D. *J. Prog. NMR Spectrosc.*, 1996, **28**, 283.
- ³² (a) P. C. Griffiths, A. Paul and N. Hirst, *Chem. Soc. Rev.*, 2006, **35**, 134. (b) K. I. Momot and P. W. Kuchel, *Concepts Magn. Reson. A*, 2006, **28A**, 249. (c) W. S. Price, in *Modern Magnetic Resonance* ed. G. A. Webb, Springer Netherlands, 2006, pp. 109-115. (d) B. Antalek, *Concepts Magn. Reson. A*, 2007, **30A**, 219. (e) D. Li, I. Keresztes, R. Hopson and P. G. Williard, *Acc. Chem. Res.*, 2008, **42**, 270.
- ³³ (a) P. S. Pregosin, P. G. A. Kumar and I. Fernandez, *Chem. Rev.*, 2005, **105**, 2977. (b) P. S. Pregosin, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.*, 2006, **49**, 261.
- ³⁴ (a) A. Macchioni, G. Ciancaleoni, C. Zuccaccia and D. Zuccaccia, *Chem. Soc. Rev.*, 2008, **37**, 479; (b) G. Bellachioma, G. Ciancaleoni, C. Zuccaccia, D. Zuccaccia and A. Macchioni, *Coord. Chem. Rev.*, 2008, **252**, 2224. (c) P. S. Pregosin, *Pure Appl. Chem.*, 2009, **81**, 615.
- ³⁵ (a) L. S. Natrajan, P. L. Timmins, M. Lunn and S. L. Heath, *Inorg. Chem.*, 2007, **46**, 10877. (b) J. Hamacek, C. Besnard, T. Penhouet and P.-Y. Morgantini, *Chem. Eur. J.*, 2011, **17**, 6753.
- ³⁶ (a) I. Fernandez, R. Hermatschweiler, F. Breher, P. S. Pregosin, L. F. Veiros and M. J. Calhorda, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2006, **45**, 6386-6391. (b) I. Fernandez, P. S. Pregosin, A. Albinati and S. Rizzato, *Organometallics*, 2006, **25**, 4520.
- ³⁷ E. Toth, E. Brucher, I. Lazar and I. Toth, *Inorg. Chem.*, 1994, **33**, 4070.
- ³⁸ (a) E. Brucher and A. D. Sherry, *Inorg. Chem.*, 1990, **29**, 1555. (b) K. Kumar and M. F. Tweedle, *Inorg. Chem.*, 1993, **32**, 4193. (c) E. Balogh, R. Tripier, R. Ruloff and E. Toth, *Dalton Trans.*, 2005, 1058.
- ³⁹ Search of Cambridge Structural Database for PhR(NR₂)PO fragments: number of observations = 64; mean P–O bond length = 1.482 Å.
- ⁴⁰ (a) G. W. Rabe, G. P. A. Yap and A. L. Rheingold, *Inorg. Chim. Acta*, 1998, **2**, 309. (b) S. Surblé, C. Serre, F. Millange, F. Pelle and G. Férey, *Solid State Sci.*, 2005, **7**, 1074.
- ⁴¹ (a) J. H. Joe and A. L. Jones, *Ind. Eng. Chem. Anal. Ed.*, 1944, **16**, 111.
- ⁴² The terms *m*, *l* and *h* correspond to the number of metals, ligands and protons employed in complex formation and hydrolysis.
- ⁴³ E. G. Moore, A. P. S. Samuel and K. N. Raymond, *Acc. Chem. Res.*, 2009, **42**, 542.
- ⁴⁴ (a) The method has been reported in the literature and uses tryptophan ($QY_{ref} = 0.13$) as standard. (b) See for instance: J. R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Third Edition edn., Springer, New York, USA, 2006.
- ⁴⁵ (a) K. Miyata, Y. Hasegawa, Y. Kuramochi, T. Nakagawa, T. Yokoo and T. Kawai, *Eur. J. Inorg. Chem.*, 2009, 4777. (b) K. Nakamura, Y. Hasegawa, H. Kawai, N. Yasuda, N. Kanehisa, Y. Kai, T. Nagamura, S. Yanagida and Y. Wada, *J. Phys. Chem. A*, 2007, **111**, 3029.
- ⁴⁶ (a) A. Wada, M. Watanabe, Y. Yamanoi and H. Nishihara, *Chem. Commun.*, 2008, 1671. (b) N. N. Katia, A. Lecointre, M. Regueiro-Figueroa, C. Platas-Iglesias, L. J. Charbonniere, *Inorg. Chem.*, 2011, **50**, 1689.
- ⁴⁷ (a) S. Faulkner, A. Beeby, M. C. Carrie, A. Dadabhoy, A. Kenwright and P. G. Sammes, *Inorg. Chem.*, 2001, **4**, 187. (b) N. N. Katia, A. Lecointre, M. Regueiro-Figueroa, C. Platas-Iglesias and L. J. Charbonniere, *Inorg. Chem.*, 2011, **50**, 1689.
- ⁴⁸ F. J. Sainz-Gonzalo, C. Popovici, M. Casimiro, J. F. Fernández-Sánchez, I. Fernández and F. L. Ortiz, A. Fernández-Gutiérrez, unpublished results submitted to *Anal. Chim. Acta*.

- ⁴⁹ (a) A. Ohyoshi, E. Ohyoshi, H. Ono and S. Yamakawa, *J. Inorg. Nucl. Chem.*, 1972, **34**, 1955. (b) L. Spaulding and H. G. Brittain, *J. Lumin.*, 1983, **28**, 385. (c) S.-G. Liu, W. Liu, J.-L. Zuo, Y.-Z. Li, X.-Z. You, *Inorg. Chem. Commun.*, 2005, **8**, 328.
- ⁵⁰ A. Yegorova, E. Vityukova, S. Belyukova and A. Duerkop, *Microchem. J.*, 2006, **83**, 1.
- ⁵¹ a) P. Stilbs, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.*, 1987, **19**, 1; b) C. S. Johnson, Jr., *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.*, 1999, **34**, 203.
- ⁵² G. Sheldrick, *Acta Cryst., Sect. A*, 2008, **64**, 112.
- ⁵³ G. M. Sheldrick, in *SHELXTL*, Bruker AXS Inst. Inc., Madison, WI, v6.12 edn., 2000.
- ⁵⁴ Bruker Apex2, Bruker AXS Inc, Madison, Wisconsin, USA, 2004.
- ⁵⁵ A. Altomare, M. Cascarano, C. Giacovazzo, A. Guagliardi, M. C. Burla, G. Pilodori and M. Camalli, *J. Appl. Crystallogr.* 1994, **27**, 435.
- ⁵⁶ G. M. Sheldrick, *SHELX97*: Program for Crystal Structure Refinement, University of Göttingen, Germany, 1997.
- ⁵⁷ The blank solution contains the same chemical composition than the standard solution except the lanthanide(III) ion.

Electronic Supplementary Information

Development of polymeric sensing films based on a new tridentate bis(phosphinic amide)-phosphine oxide for determining Europium(III) in water

F. J. Sainz-Gonzalo,^a M. Casimiro,^b C. Popovici,^b A. Rodríguez-Diéguez,^c J. F. Fernández-Sánchez,^{*a} I. Fernández,^{*b} F. L. Ortiz,^{*b} A. Fernández-Gutiérrez^a

^a Department of Analytical Chemistry, Faculty of Sciences, University of Granada, Av. Fuentenueva s/n, 18071 Granada, Spain. Fax: +34 958243328; E-mail: jffernan@ugr.es

^b Laboratory of Organic Chemistry, University of Almería, Ctra. Sacramento s/n, 04120 Almería, Spain. Fax: +34 950 015481; Tel: +34 950 015648; E-mail: ifernan@ual.es

^c Department of Inorganic Chemistry, Faculty of Sciences, University of Granada, Av. Fuentenueva s/n, 18071 Granada, Spain. Fax: +34-958248526.

Contents:

- Figure S1. ESI-TOF mass spectra in the positive ion mode calculated and simulated of **2** and **4**.
- Figure S2. IR (KBr disk) spectra of **2** and **4**.
- Figure S3. ³¹P NMR (202.4 MHz) spectrum of **2** in CD₃CN at RT.
- Figure S4. ¹³C and DEPT-135 NMR (75.5 MHz) spectrum of **2** in CD₃CN at RT.
- Table S1. ¹H isotropic shifts (δ_{iso}) for complex **2** at 300 MHz in CD₃CN at 25 °C.
- Table S2. ¹H isotropic shifts (δ_{iso}) for complex **4** at 300 MHz in CD₃CN at 25 °C.
- Figure S5. ¹H EXSY NMR spectrum ($t_m = 500$ ms) of **2** in CD₃CN at RT.
- Figure S6. ¹H, ¹³C gHMQC NMR spectrum of **2** in CD₃CN at RT.
- Figure S7. ¹H, ¹³C gHMBC NMR spectrum of **2** in CD₃CN at RT.
- Figure S8. ¹H, ¹³C gHMQC and gHMBC NMR expansions of the NiPr₂ region for complex **2**.
- Figure S9. X-Ray structures overlay of [Eu(**1**)Cl₃] (**4**) and [Y(**1**)(NO₃)₃] (**5**).
- Figure S10. Response of the complex luminescence intensity versus Ligand:Eu³⁺ ratio and Eu³⁺:Ligand ratio.

- Figure S11. TGA spectrum for complex **2** at the heating rate of 10°C/min under nitrogen atmosphere.
- Figure S12. Luminescence intensity versus EtOH percentage in solution.
- Figure S13. Influence of NaCl concentration on the luminescence intensity in solution.
- Figure S14. The pH effect on the complex luminescence intensity in solution.
- Figure S15. The plasticizer effect on the luminescence signals of the membrane sensors.
- Figure S16. Luminescence intensities of the membrane sensors versus DOS plasticizer percentage.
- Figure S17. The joint effect of the ligand and ionic additive percentages on the luminescence responses of the membrane sensors.
- Figure S18. The pH effect on the luminescence signals of the europium sensors.
- Figure S19. Effect of the ionic strength on the luminescence signals of the membrane sensors.
- Figure S20. Calibration graph of europium(III) membrane sensors.
- Figure S21. Variation of the luminescence emission in solution versus time.

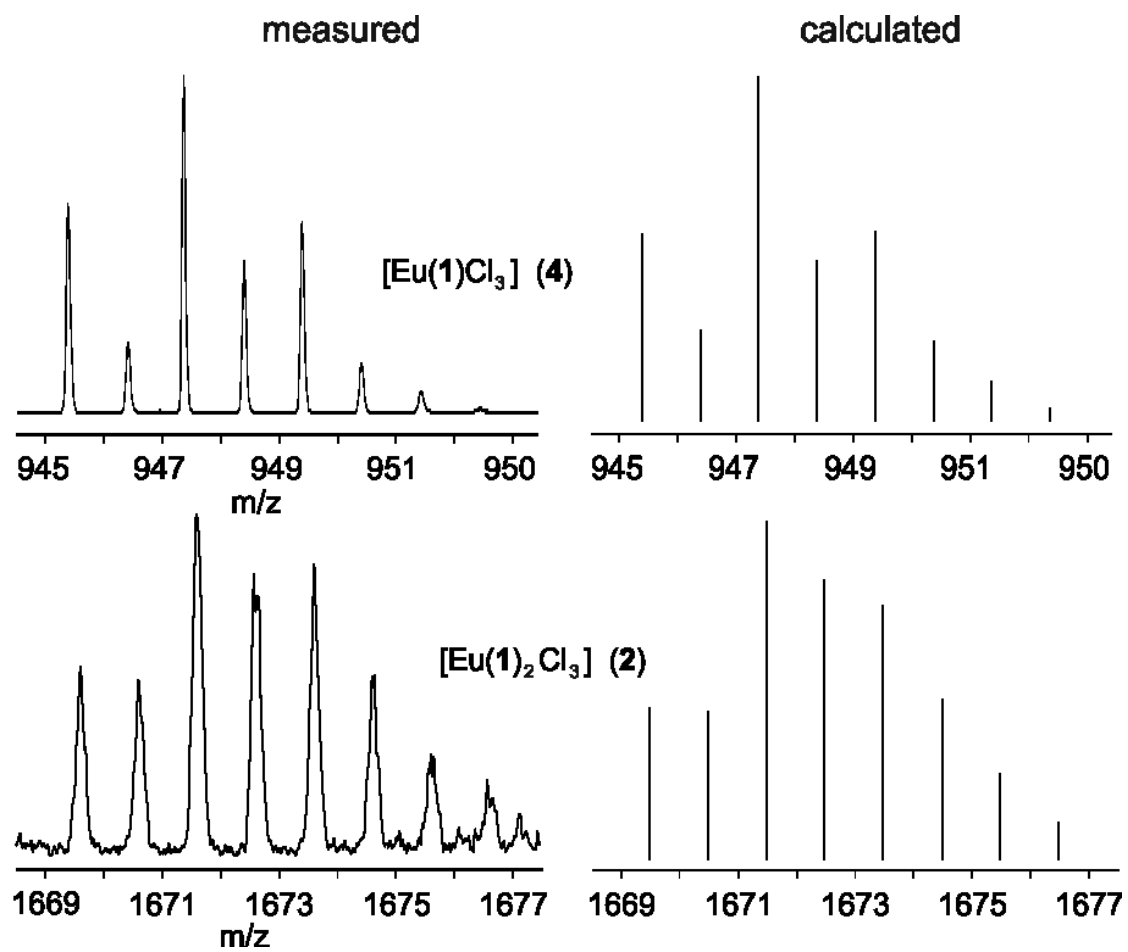


Figure S1. ESI-TOF mass spectra in the positive ion mode calculated and simulated of **2** and **4** in CD_3CN . Note that the optical range for TOF analyzers is below *ca.* 1500 and therefore a significant reduction in the signal/noise is observed.

[Eu(1)₂] (2)

[Eu(1)] (4)

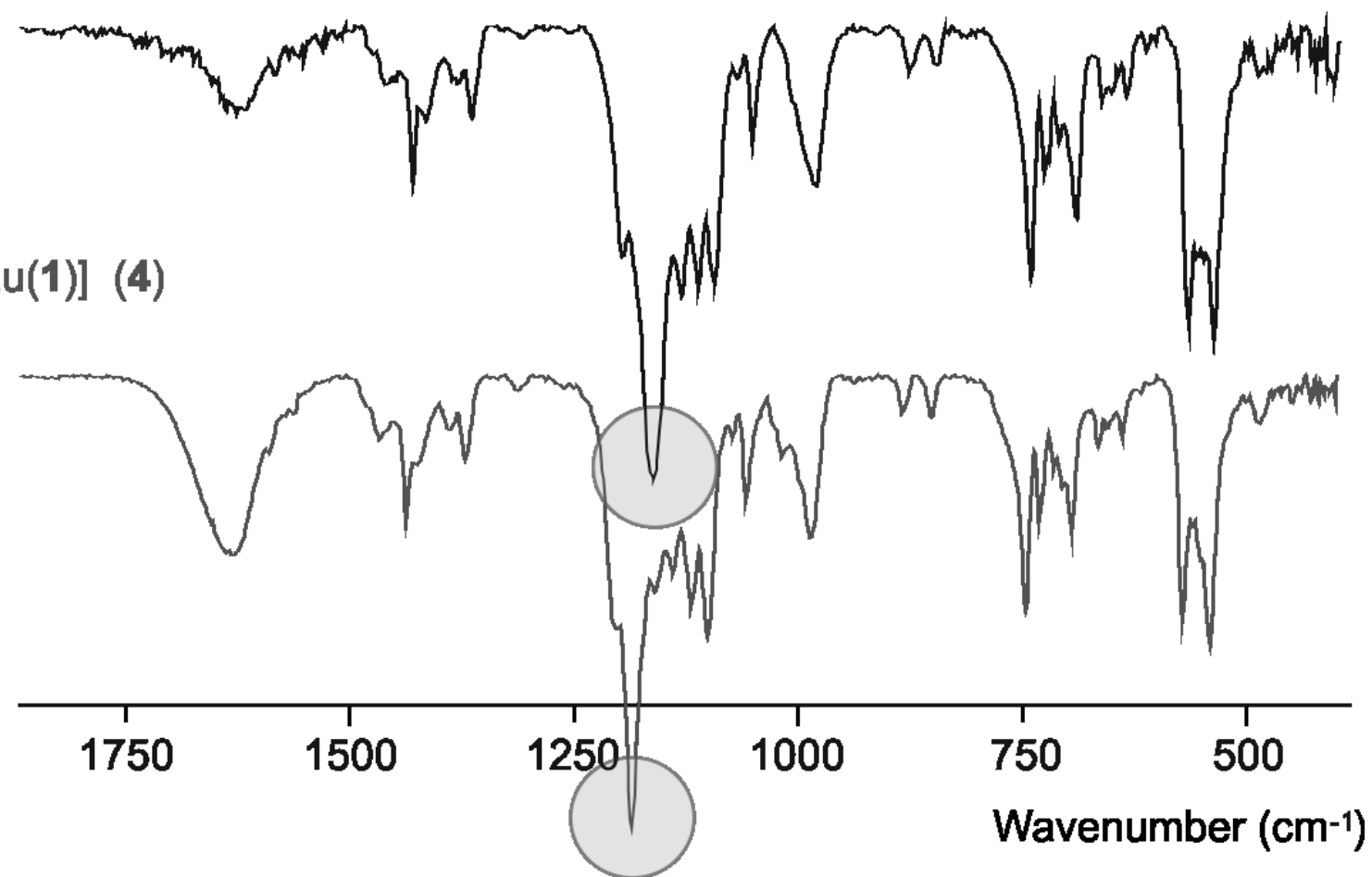


Figure S2. IR (KBr disk) spectra of **2** and **4**.

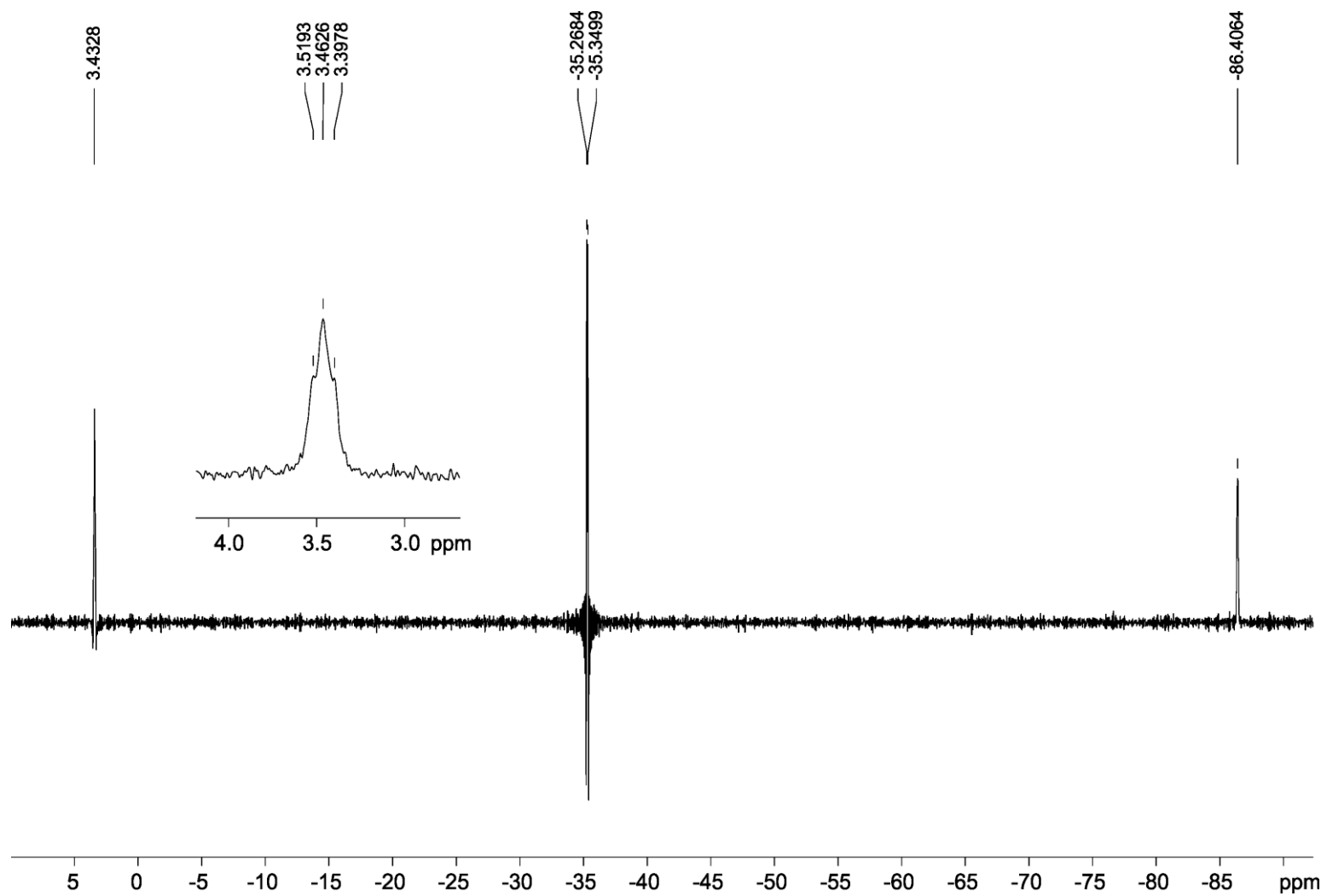


Figure S3. ^{31}P NMR (202.4 MHz) spectrum of **6** in CD_3CN at RT.

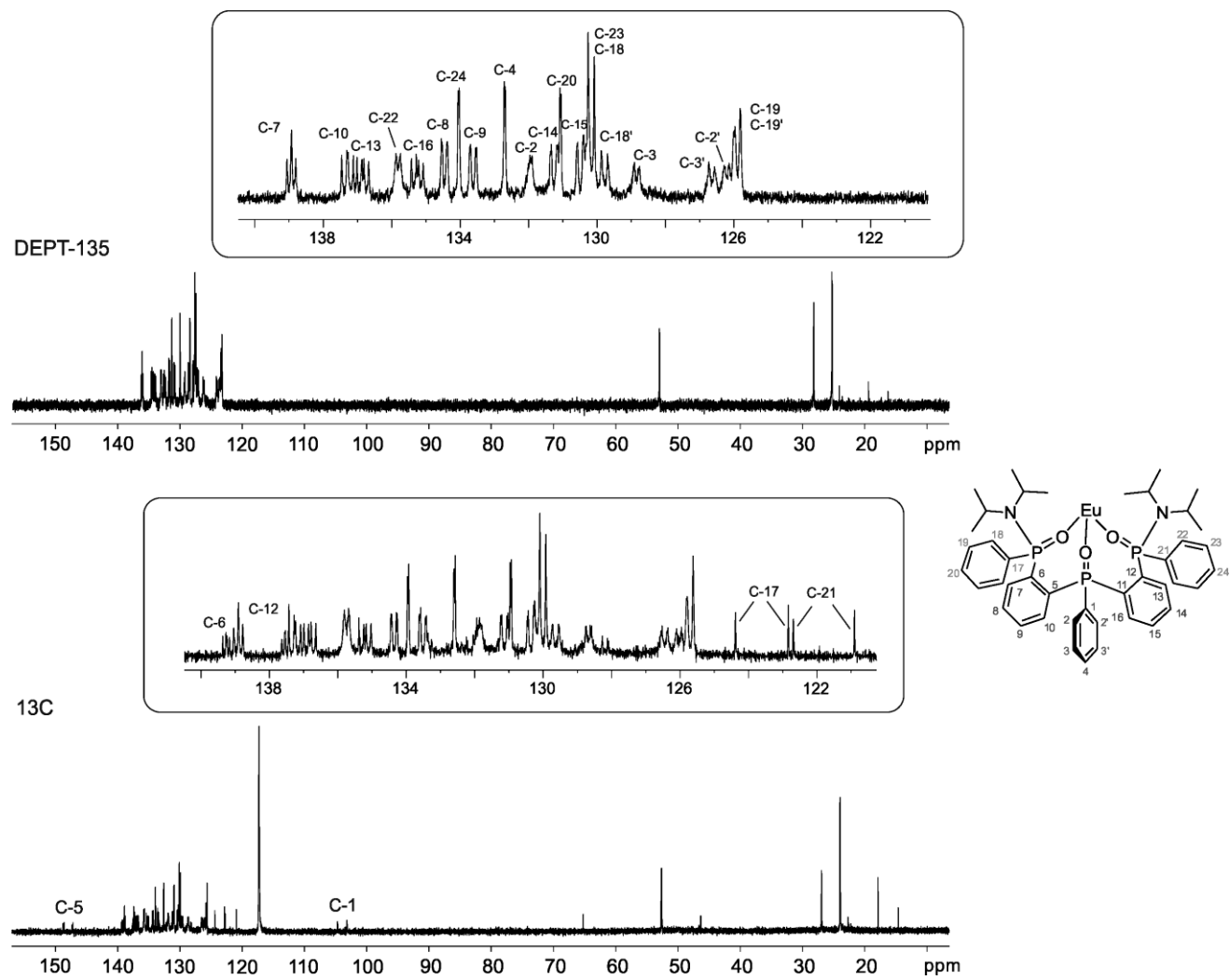


Figure S4. ^{13}C and DEPT-135 NMR (75.5 MHz) spectrum of **2** in CD_3CN at RT.

Table S1. ¹H isotropic shifts (δ_{iso}) for complex **2** at 300 MHz in CD₃CN at 25 °C.

| | | [Eu(1) ₂ Cl ₃] (2) | [Y(1) ₂ (NO ₃) ₃] (3) | δ_{iso} | |
|-----------|--|---|--|-----------------------|-------|
| Ring I | | H-2 | 4.42 | 8.58 | 4.16 |
| | | H-2' | 4.58 | 6.56 | 2.01 |
| | | H-3 | 6.28 | 7.90 | 1.62 |
| | | H-3' | 6.79 | 7.48 | 0.69 |
| | | H-4 | 7.16 | 7.85 | 0.69 |
| Ring II | | H-7 | 9.88 | 8.38 | -1.50 |
| | | H-8 | 8.66 | 7.98 | -0.68 |
| | | H-9 | 7.93 | 7.65 | -0.28 |
| Ring III | | H-10 | 6.14 | 7.00 | 0.86 |
| | | H-18 | -0.88 | 8.07 | 8.95 |
| | | H-18' | 5.96 | 7.13 | 1.17 |
| | | H-19 | 4.85 | 6.90 | 2.05 |
| | | H-19' | 5.96 | 7.13 | 1.17 |
| Ring II' | | H-20 | 5.96 | 7.13 | 1.17 |
| | | H-13 | 6.23 | 6.48 | 0.25 |
| | | H-14 | 5.89 | 6.88 | 0.99 |
| | | H-15 | 5.45 | 6.98 | 1.53 |
| Ring III' | | H-16 | 3.93 | 7.02 | 3.09 |
| | | H-22 | 8.77 | 8.20 | -0.57 |
| | | H-22' | 8.77 | 8.20 | -0.57 |
| | | H-23 | 8.22 | 7.79 | -0.43 |
| | | H-23' | 8.22 | 7.79 | -0.43 |
| | | H-24 | 8.50 | 7.79 | -0.71 |

Table S2. ^1H isotropic shifts (δ_{iso}) for complex **4** at 300 MHz in CD_3CN at 25 $^\circ\text{C}$.

| | | | [Eu(1) ₂ Cl ₃] (4) | [Y(1) ₂ (NO ₃) ₃] (5) | δ_{iso} |
|-----------|--|-------|---|--|-----------------------|
| Ring I | | H-2 | 4.84 | 7.53 | 2.69 |
| | | H-2' | | | |
| | | H-3 | 6.70 | 7.10 | 0.4 |
| | | H-3' | | | |
| | | H-4 | | | |
| Ring II | | H-7 | 12.34 | 8.56 | 3.78 |
| | | H-8 | 9.24 | 8.04 | 1.2 |
| | | H-9 | 8.09 | 7.37 | 0.72 |
| | | H-10 | 6.78 | 6.47 | 0.31 |
| Ring III | | H-18 | 5.67 | 7.80 | 2.13 |
| | | H-18' | | | |
| | | H-19 | 5.17 | 7.23 | 2.06 |
| | | H-19' | | | |
| | | H-20 | | 7.80 | |
| Ring II' | | H-13 | 6.03 | 6.34 | 0.31 |
| | | H-14 | 7.06 | 6.34 | 0.72 |
| | | H-15 | 7.41 | 6.70 | 0.71 |
| | | H-16 | 7.94 | 7.07 | 0.87 |
| Ring III' | | H-22 | 8.95 | 8.32 | 0.63 |
| | | H-22' | | | |
| | | H-23 | 8.02 | 7.80 | 0.22 |
| | | H-23' | | | |
| | | H-24 | 3.43 | | |

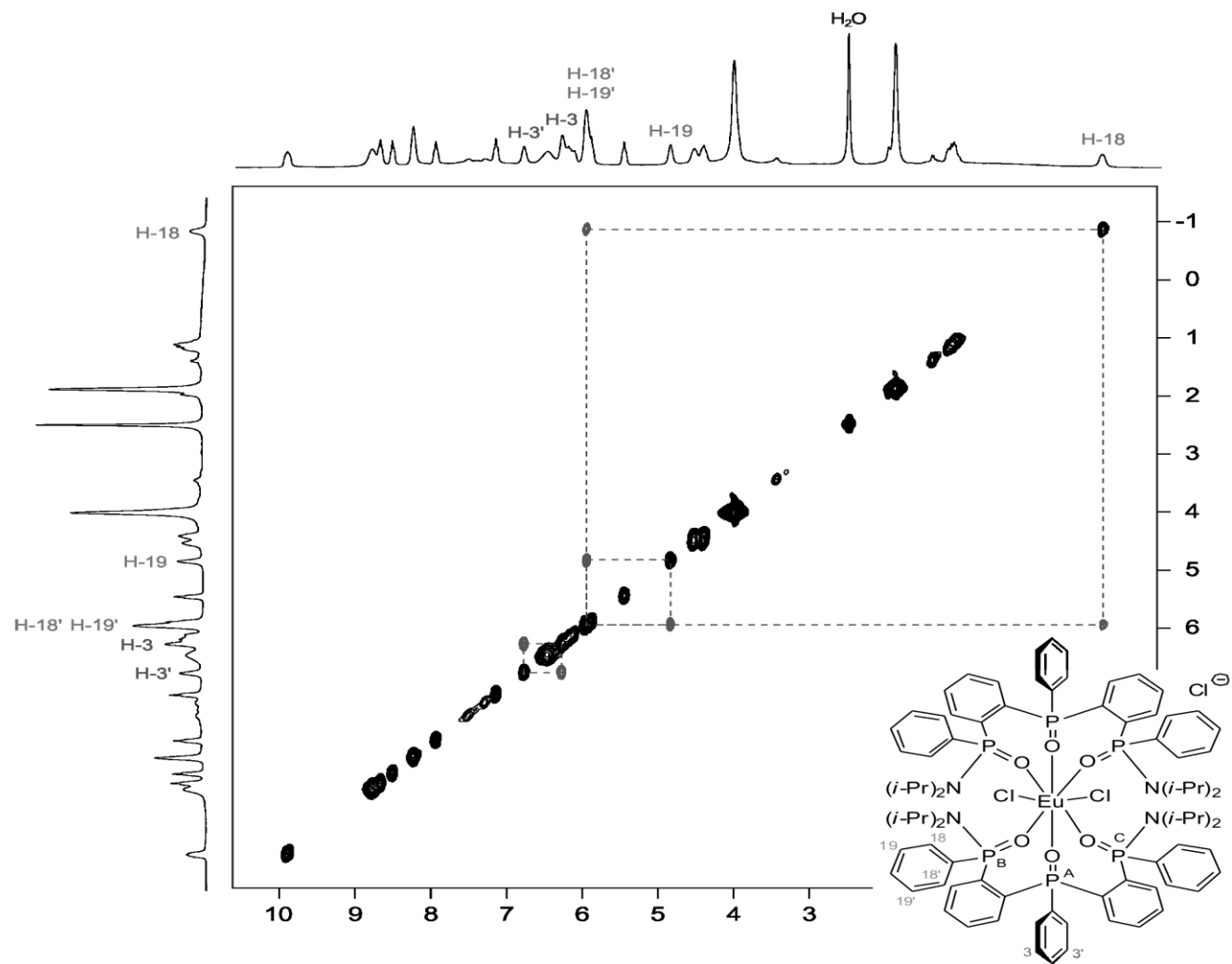


Figure S5. ^1H EXSY NMR spectrum ($t_m = 500$ ms) of **2** in CD_3CN at RT.

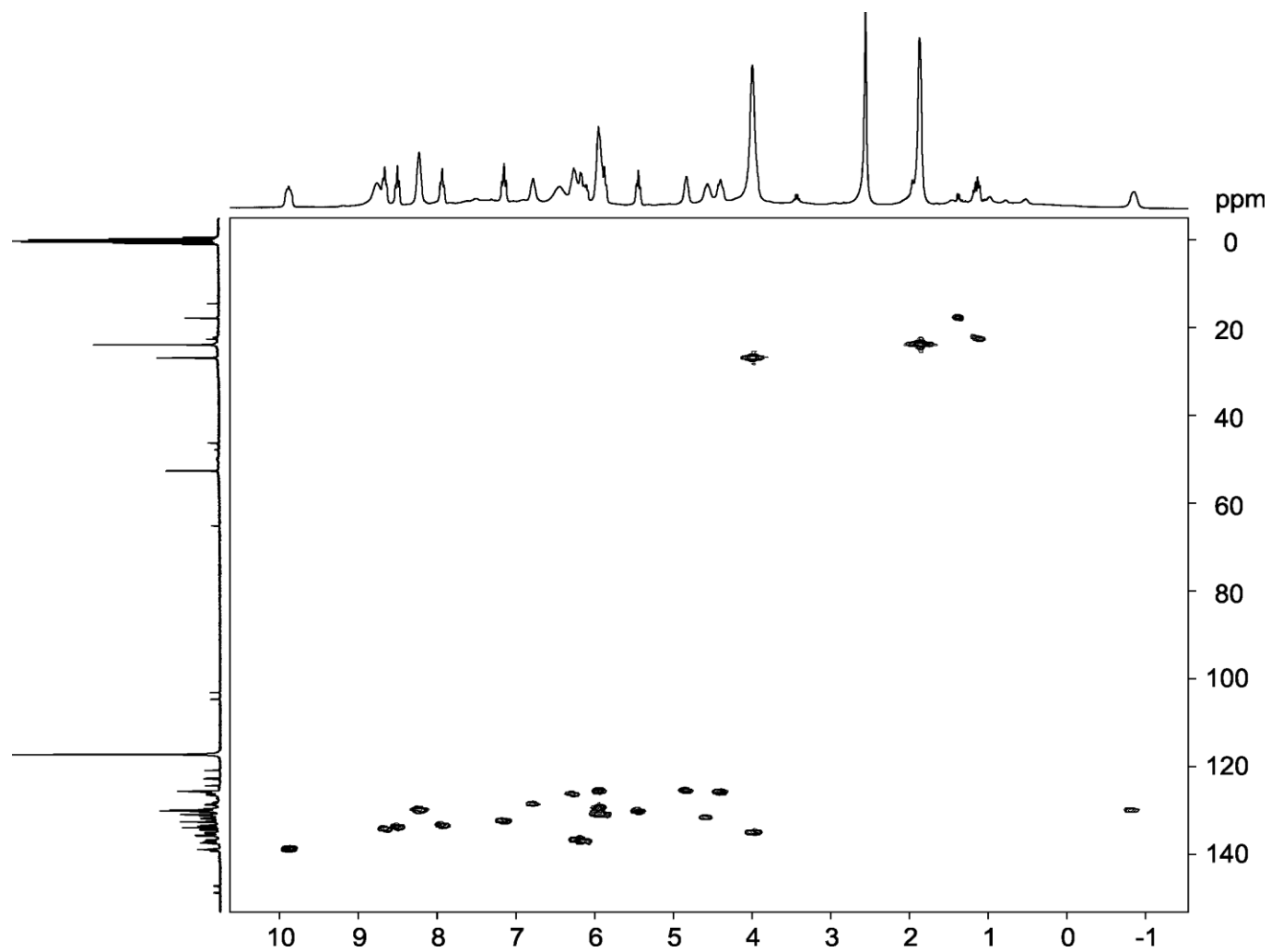


Figure S6. ^1H , ^{13}C gHMQC NMR spectrum of **2** in CD_3CN at RT.

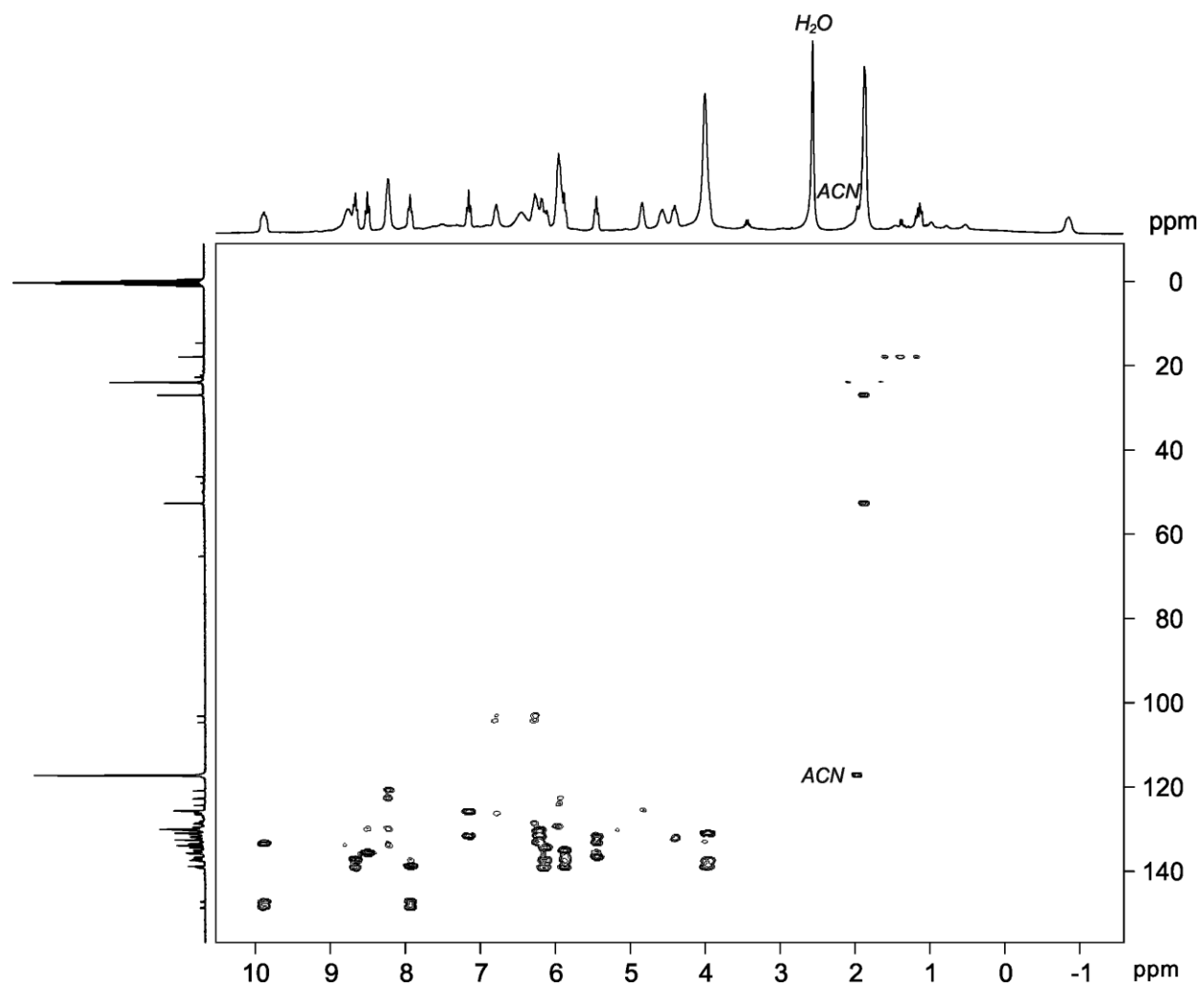


Figure S7. ^1H , ^{13}C gHMBC NMR spectrum of **2** in CD_3CN at RT.

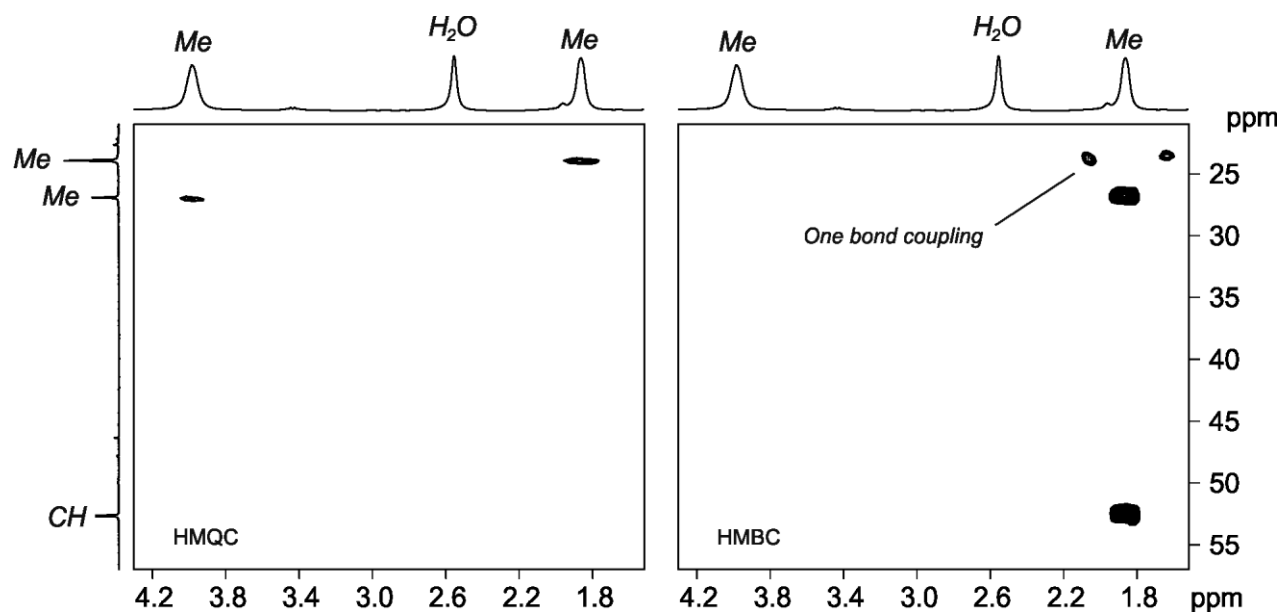


Figure S8. ^1H , ^{13}C gHMQC and gHMBC NMR expansions of the NiPr_2 region for complex **2** in CD_3CN at RT.

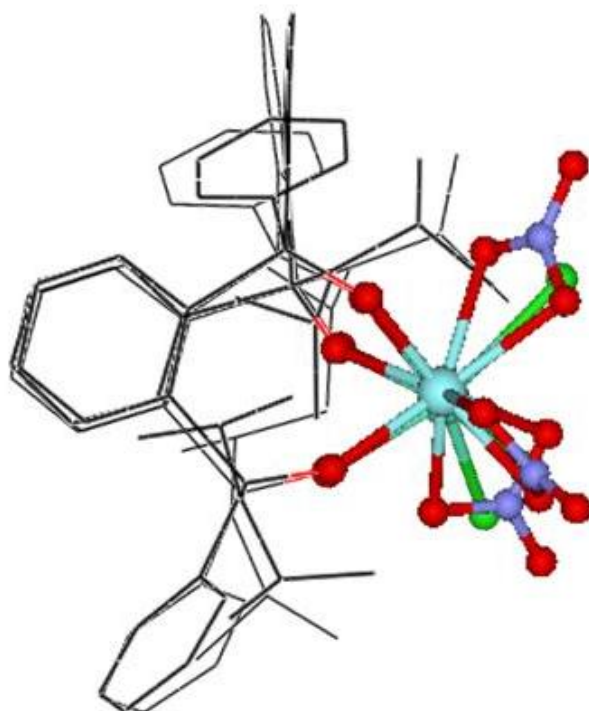


Figure S9. X-ray structures overlay for $[\text{Eu}(\mathbf{1})\text{Cl}_3]$ (**4**) and $[\text{Y}(\mathbf{1})(\text{NO}_3)_3]$ (**5**). For complex **5** only one conformation out of the two existing in the asymmetric unit is shown.

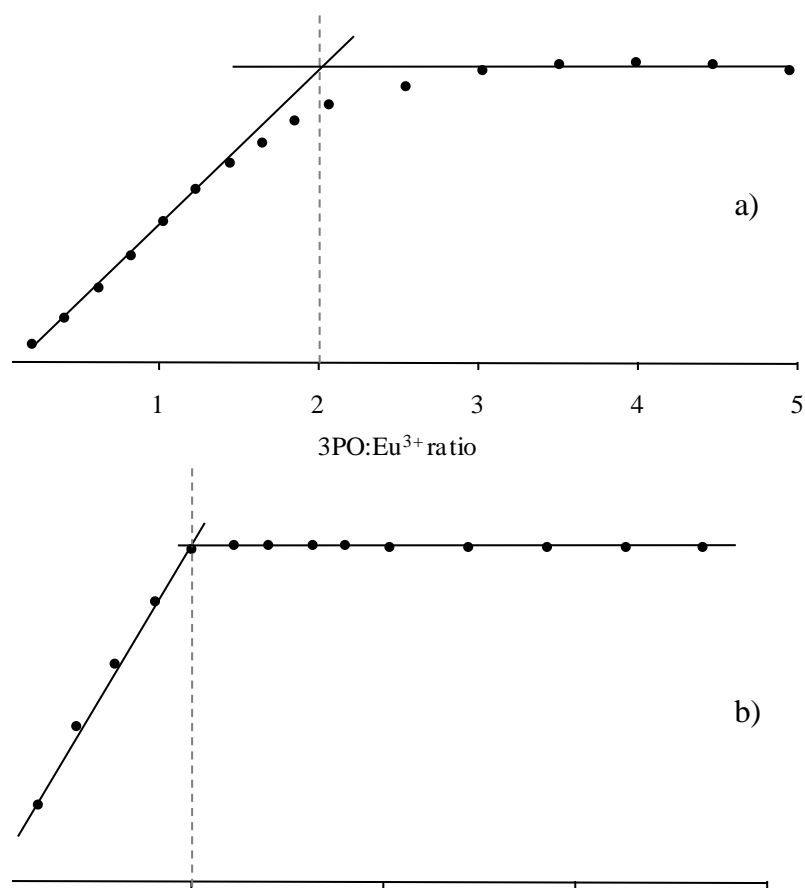


Figure S10. Response of the complex luminescence intensity versus a) Ligand:Eu³⁺ ratio ([Eu³⁺]= 8.0 x 10⁻⁶ M, 75% EtOH, v/v, [NaCl]= 31 mM and pH=7.0); and b) Eu³⁺:Ligand ratio ([Ligand]= 8.3 x 10⁻⁶ M, 75% EtOH, v/v; [NaCl]= 31 mM and pH=7.0).

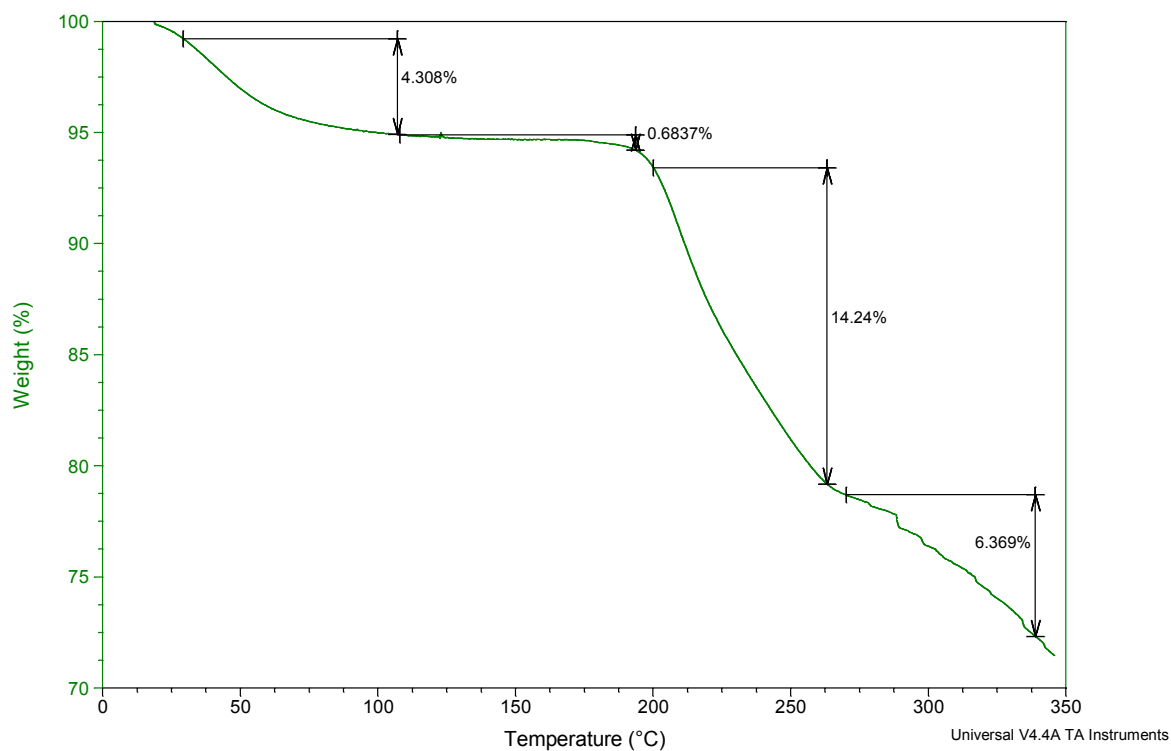


Figure S11. TGA spectrum for complex **2** at the heating rate of 10°C/min under nitrogen atmosphere.

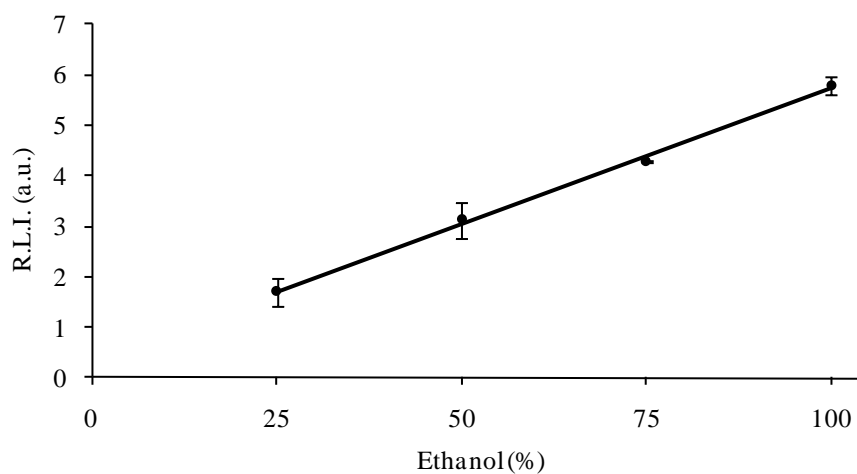


Figure S12. Luminescence intensity versus EtOH percentage in solution. $[\text{Eu}^{3+}] = [\text{Ligand}] = 9.6 \times 10^{-5} \text{ M}$.

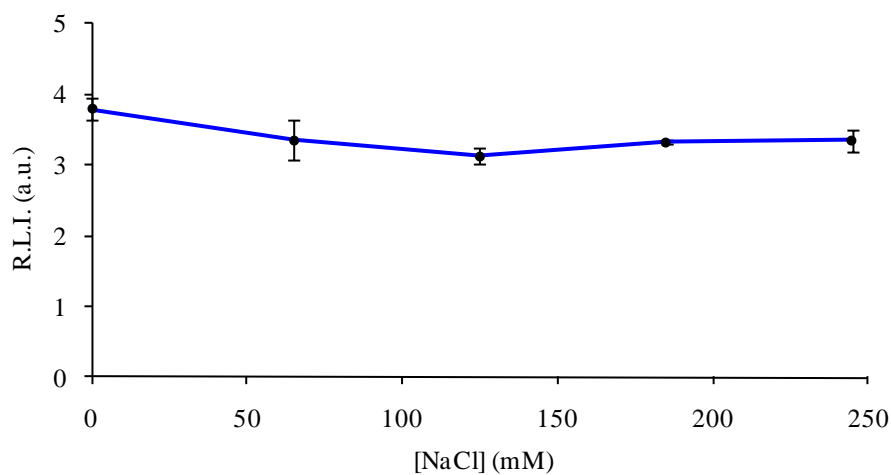


Figure S13. Influence of NaCl concentration on the luminescence intensity in solution. $[\text{Eu}^{3+}] = [\text{Ligand}] = 9.6 \times 10^{-5} \text{ M}$ (75% EtOH, v/v).

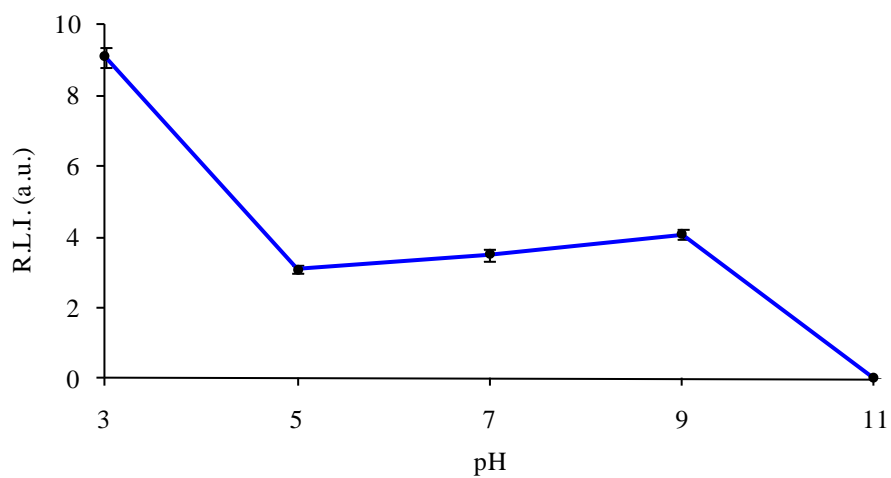


Figure S14. The pH effect on the complex luminescence intensity in solution. $[\text{Eu}^{3+}] = [\text{Ligand}] = 9.6 \times 10^{-5} \text{ M}$ (75% EtOH, v/v; $[\text{NaCl}] = 31 \text{ mM}$).

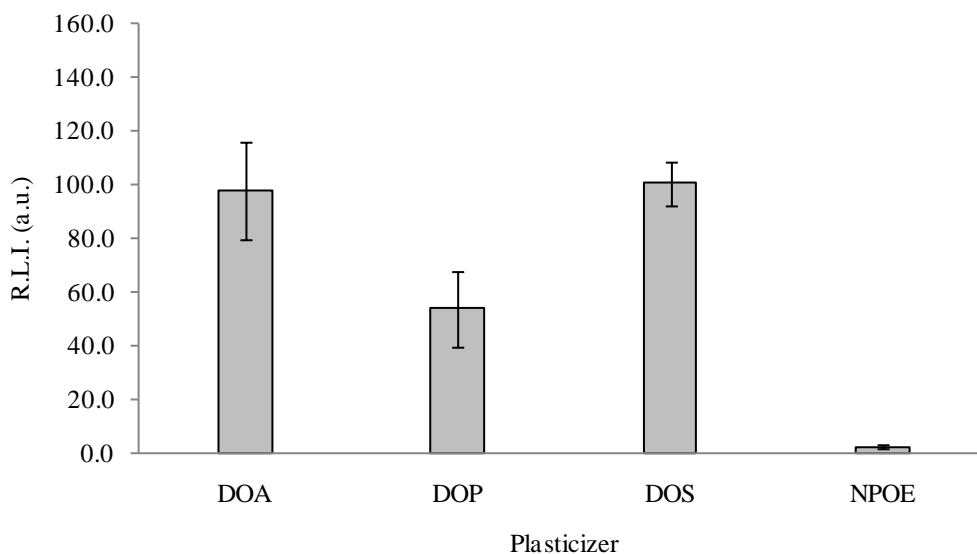


Figure S15. The plasticizer effect on the luminescence signals of the membrane sensors. *DOA* bis(2-ethylhexyl) adipate, *DOP* dioctyl phthalate, *DOS* bis(2-ethylhexyl) sebacate and *NPOE* 2-nitrophenyloctyl ether. Membrane composition: PVC:Plasticizer:Ligand:KTpClPB as 32.8:64.7:1.5:1.0 (% , w/w). $[\text{Eu}^{3+}] = 1.0 \times 10^{-6}$ M in distilled water.

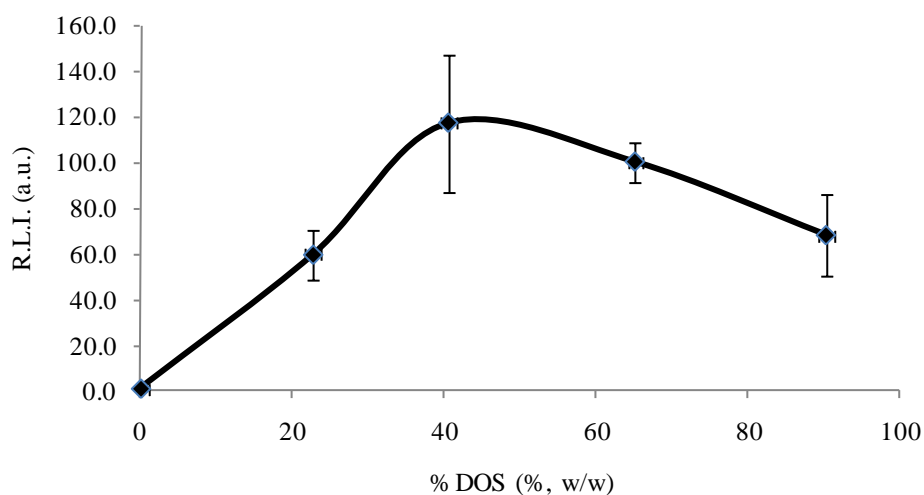


Figure S16. Luminescence intensities of the membrane sensors versus DOS plasticizer percentage. *DOS* bis(2-ethylhexyl) sebacate. Membrane composition: PVC:DOS:Ligand:KTpClPB as 7.5-97.5:0-90.0:1.5:1.0 (% , w/w). $[\text{Eu}^{3+}] = 1.0 \times 10^{-6}$ M in distilled water.

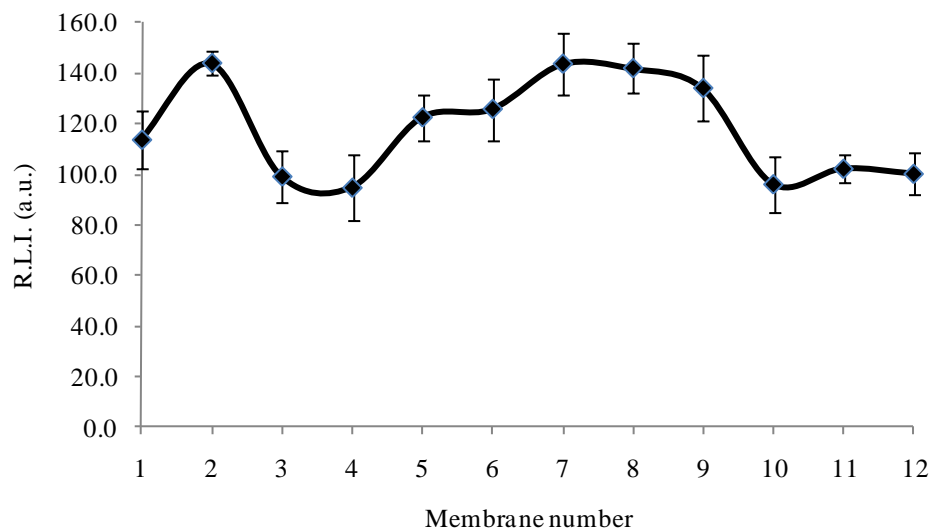


Figure S17. The joint effect of the ligand and ionic additive percentages on the luminescence responses of the membrane sensors. Membrane composition: PVC:DOS:Ligand:KTpClPB as 27.9-33.4:65.1:1.5-3.5:0-3.5 (% , w/w). $[\text{Eu}^{3+}] = 1.0 \times 10^{-6}$ M in distilled water. Table 2 shows the composition of each membrane.

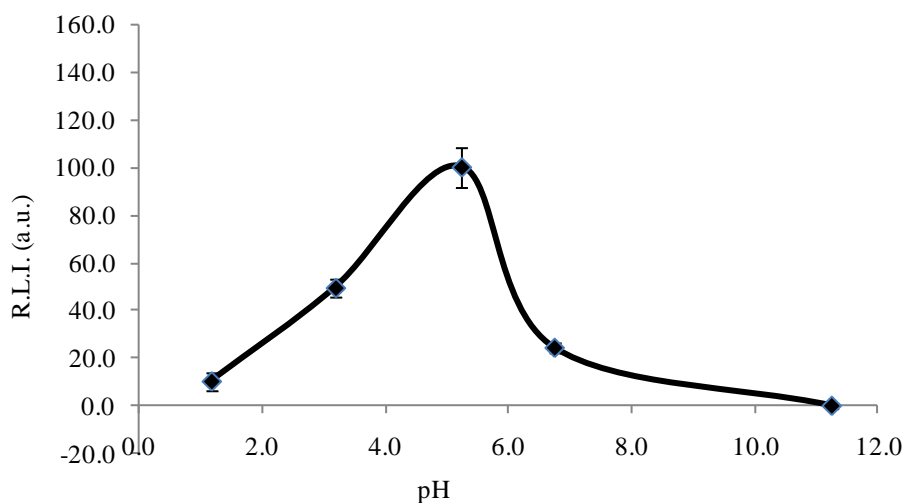


Figure S18. The pH effect on the luminescence signals of the europium sensors. Optimum membrane composition: PVC:DOS:Ligand:KTpClPB as 33.4:65.1:1.5:0 (% , w/w). $[\text{Eu}^{3+}] = 1.0 \times 10^{-6}$ M in distilled water.

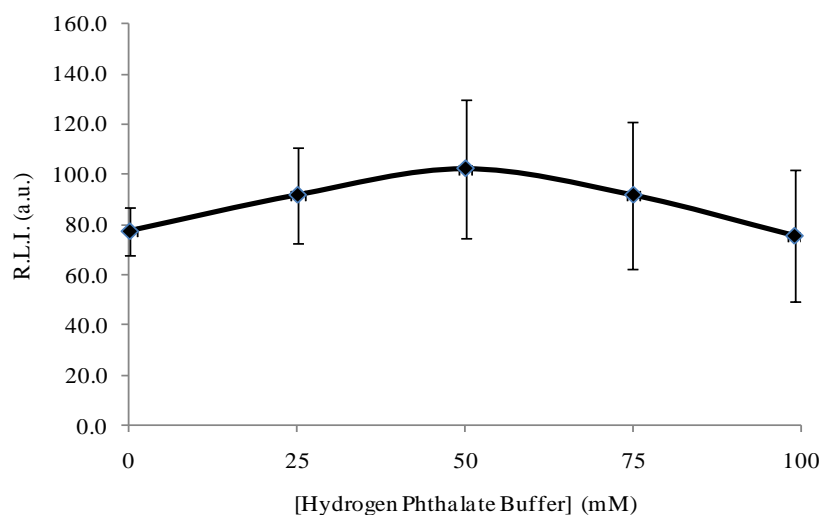


Figure S19. Effect of the ionic strength on the luminescence signals of the membrane sensors. Optimum membrane composition: PVC:DOS:Ligand:KTpCIPB as 33.4:65.1:1.5:0 (% , w/w). $[\text{Eu}^{3+}] = 1.0 \times 10^{-6}$ M in distilled water at pH 5.0 and in different hydrogen phthalate buffer concentration solutions at pH 5.0.

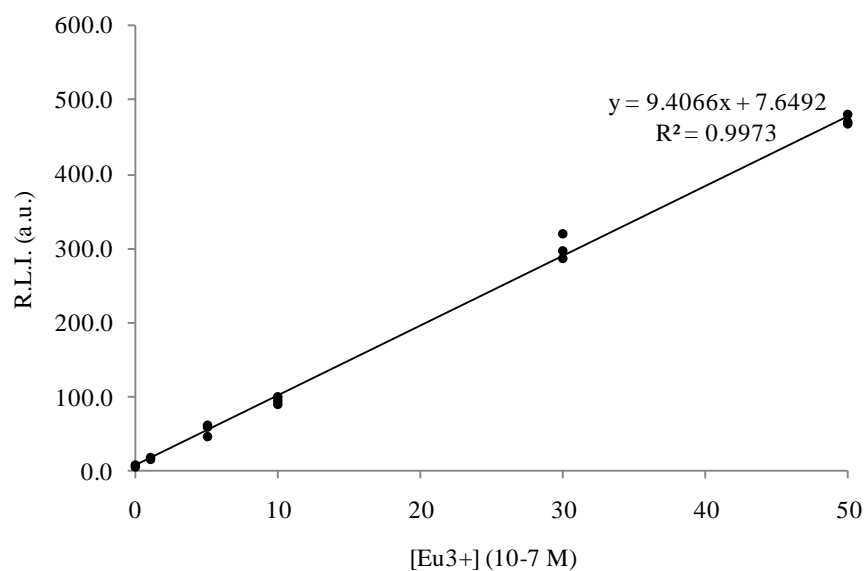


Figure S20. Calibration graph of europium(III) membrane sensors. Optimum membrane composition: PVC:DOS:Ligand:KTpCIPB as 33.4:65.1:1.5:0 (% , w/w). [Blank]= 25 mM hydrogen phthalate buffer at pH 5.0 and $[\text{Eu}^{3+}] = 1.0 \times 10^{-7}$ - 5.0×10^{-6} M in 25 mM hydrogen phthalate buffer solution at pH 5.0.

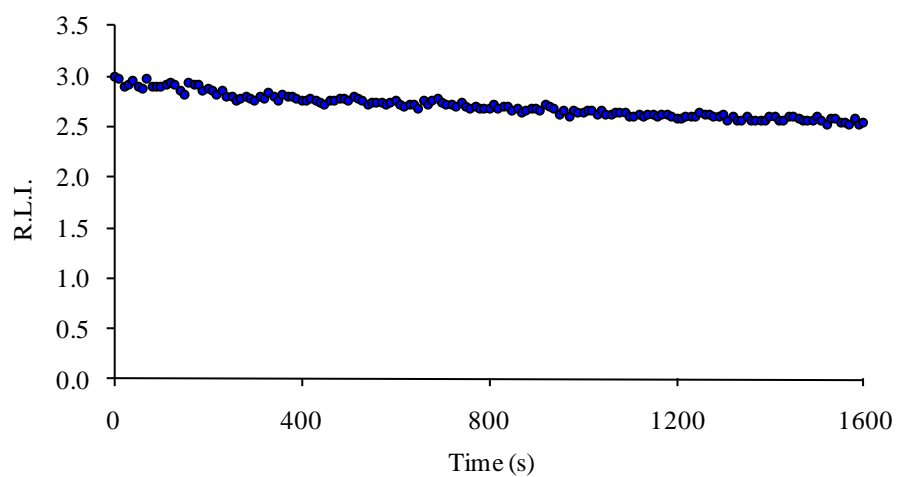


Figure S21. Variation of the luminescence emission in solution versus time.

IV.BIII.8. Capítulo 5: A novel tridentate bis(phosphinic acid)-phosphine oxide based Europium(III)-selective Nafion membrane luminescent sensor

A novel tridentate bis(phosphinic acid)-phosphine oxide based Europium(III)-selective Nafion membrane luminescent sensor

F.J. Sainz-Gonzalo ^a, C. Popovici ^b, M. Casimiro ^b, J.F. Fernández-Sánchez ^{a,*}, I. Fernández ^{b,*}, F. L. Ortiz ^{b,*}, A. Fernández-Gutiérrez ^a

^a *Department of Analytical Chemistry, Faculty of Sciences, University of Granada, Av. Fuentenueva s/n, 18071 Granada, Spain*

^b *Laboratory of Organic Chemistry, University of Almería, Ctra. Sacramento s/n, 04120 Almería, Spain*

ABSTRACT

A new europium(III) membrane luminescent sensor based on a new tridentate bis(phosphinic acid) phosphine oxide (**3**) system has been developed. The synthesis of this new ligand is described and its full characterization by NMR, IR and elemental analysis provided. The luminescence complex formed between europium(III) ion and ligand **3** was evaluated in solution, observing that its spectroscopic and chemical characteristics are excellent for measuring in polymer inclusion membranes. All the parameters (plasticizer, ligand and ionic additive) which can affect the sensitivity and selectivity of the sensing membrane as well as the instrumental conditions were carefully optimized. The best luminescence signal ($\lambda_{exc} = 229.06$ nm, $\lambda_{em} = 616.02$ nm) was exhibited by the sensing film having a composition Nafion:Ligand of 262.3:0.6 mg mL⁻¹. The membrane sensor showed a short response time (5 min) and an optimum working pH at 5.0 (25 mM acetate buffer solution). The membrane sensor manifested a good selectivity toward europium(III) ion with respect to other lanthanides(III) (La, Sm, Tb, Yb) ions, although a small positive interference

of terbium(III) ion was observed. It provided a linear range from 1.9×10^{-8} to 5.0×10^{-6} M with a very low detection limit (5.8×10^{-9} M) and sensitivity 8.57×10^{-7} a.u./M.

Keywords: Ligand-sensitized luminescence; Lanthanide; Europium(III) ion; bis(phosphinic acid) phosphine oxide; Nafion membrane; Water analysis

* Corresponding authors. Tel.: +34 958 248409; fax: +34 958243328.

E-mail addresses: jffernan@ugr.es (J.F. Fernández-Sánchez); ifernan@ual.es (I. Fernández).

1. Introduction

It has been demonstrated that rare earth elements (REEs) provoke alterations and damages in animals [1]. Furthermore, REEs can accumulate in humans producing liver damage and lung embolisms when they are inhaled during long-term exposure in working environment. Europium, one member of REEs, is found to have many applications as component in fluorescent lamps, lasers, ceramics and catalysts for oil and atomic industries. Thus, the growing increase in the europium dumping and its toxic properties and adverse effects have promoted the need of determining europium in the last years [2].

Nowadays, the europium(III) determination in water samples is performed by usual analytical methods such as fluorescence [3], spectrophotometry [4], inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) [5], inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES) [6], chelation ion chromatography (CIC) with absorbance detection [7] and multiple square wave voltammetry (MSWV) [8]. These methods are time consuming and too expensive for most analytical laboratories.

Chemical sensors have emerged as a powerful alternative to the traditional methods because they offer advantages of low cost, portability, selectivity, measurement in real time and simple operations. Zamani et al. [9] have made a potentiometric sensor based on an ion selective electrode using 4-(2-hydroxybenzylideneamino)-6-methyl-3-thioxo-3,4-dihydro-1,2,4-triazin-5(2H)-one (HMTDT) as membrane carrier for the determination of europium(III) in water. The detection limit was 7.8×10^{-7} M and good selectivity was obtained for many metal ions, improving the analytical characteristics of a previously reported europium(III) ion selective electrode [10].

However, optical sensors have demonstrated several advantages against electrochemical ones [11-14], which have been demonstrated advantageous in terms of sensibility and selectivity versus europium(III) electrochemical sensors [15-17].

Ligand-sensitized luminescence of lanthanides [18] is a detection technique with great importance for trace determination of lanthanide ions [19, 20]. This detection procedure can be implemented in solid phase by immobilizing a ligand agent into a polymeric liquid membranes [1, 9, 10, 16, 21-23] known as polymer inclusion membranes (PIMs) [24]. Both the nature of the immobilized ligand and the nature of plasticizers and ionic additives used have an enormous influence on the selectivity and sensitivity of these PIMs [21, 25, 26].

The stability and selectivity of the immobilized ligand can be enormously increased if its structure accommodates properly the ions via suitable soft donors (N, O and/or S) with enough flexibility. For this purpose, the use of molecules derived from aromatic multidentate P(O)(OH) phosphinic moieties as potential sensitizing ligands, which possess conjugated π -electron systems, represents an emerging field [27, 28]. Several ligands based on phosphonic or phosphinic acid arms have been used for the complexation of lanthanides [29-35]. Curiously, some research has been carried out toward functional resins containing several phenylphosphonic acid ligands that have been used in ion-exchange coordination of Eu(III) among other metals [36].

They absorb energy at the characteristic wavelengths of the ligand and emit visible electromagnetic radiation to the specific wavelengths of europium(III) ion. The emission peaks correspond to the transitions of the europium(III) ion [37]. Therefore, the luminescence signal of the formed complex is proportional to europium(III) concentration in solution.

In this paper, we have first synthesised a new tridentate ligand containing two diphenylphosphinic acid side-arms connected through the ortho position to a phenylphosphine oxide moiety and developed a selective and highly sensitive membrane luminescent sensor based on this new species for the determination of europium(III) ions in water.

2. Materials and Methods

2.1. Chemicals and reagents

Nafion perfluorinated resin solution, 20 wt. % in mixture of lower aliphatic alcohols/water containing 34% water was, purchased from Aldrich. Glycerol was obtained from Scharlau and potassium tetrakis(4-chlorophenyl)borate (KTpCIPB) was purchased from Fluka. Bis(2-

ethylhexyl) sebacate (DOS) was obtained from Aldrich. Absolute ethanol, methanol, anhydrous sodium acetate and potassium hydrogen phthalate were obtained from Panreac. Sodium chloride was purchased from Riedel-de Haën. Hydrate chloride salts of the lanthanides used were all of the highest purity available and were obtained from ABCR. All chemicals and reagents were of analytical grade except for glycerol and DOS (reagent grade) and were used as received without further purification.

2.2. Instrumentation and apparatus

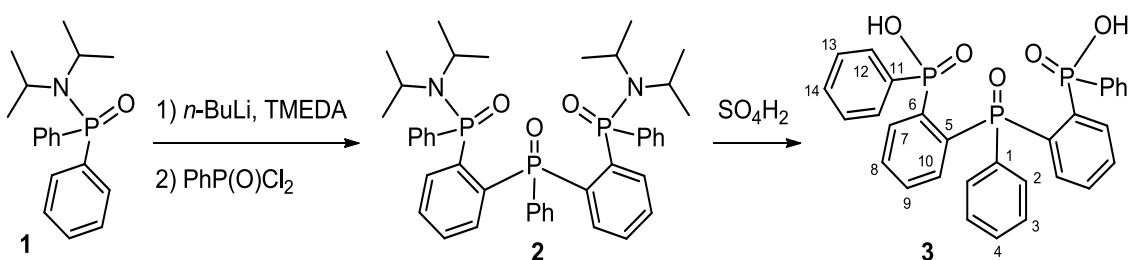
Aminco Bowman Series 2 Luminescence Spectrometer (Sim Aminco, Madison, USA) interfaced with a computer was used to perform the luminescence spectra and the relative luminescence intensity measurements in solution using 111-QS suprasil quartz cuvettes (light path = 10 x 10 mm), which were purchased from Hellma (Hellma, Jamaica, USA). Cary Eclipse Varian Fluorescence Spectrophotometer (Varian Australia, Mulgrave, Australia) equipped with a front surface accessory was used to obtain the luminescence spectra and the relative luminescence intensities of the membrane sensors. MicroPH2000 Crison pHmeter (Crison Instruments, Alella, Spain) was used to adjust the pH of the employed solutions.

WS-400B-6NPP/LITE Laurell spin coater (Laurell Technologies, North Wales, USA) was applied for the polymer inclusion membrane preparation by spin coating technique. G560E Vortex-Genie 2 mixer (Scientific Industries, Bohemia, USA) was used to obtain the polymer solution. Solution sonication was achieved by an Ultrasons Selecta ultrasonic bath (JP Selecta, Abrera, Spain).

^1H (500 MHz), ^{13}C (125 MHz), and ^{31}P (202 MHz) NMR spectra were recorded in MeOD on a Bruker Avance 500 spectrometer using a direct TBO ($^1\text{H}/^{31}\text{P}/\text{BB}$) probe head. Chemical shifts are referred to internal tetramethylsilane for ^1H and ^{13}C , and to external 85% H_3PO_4 for ^{31}P . Standard Bruker software was used for acquisition and processing routines. Chemical shifts (δ) are quoted in parts per million (ppm) and coupling constants (J) are measured in Hertz (Hz). Data are reported as follows: chemical shift, multiplicity (s = singlet, d = doublet, t = triplet, q = quartet, h = heptet, br = broad, m = multiplet), coupling constants (Hz), integration. High resolution mass spectra were recorded on Agilent Technologies LC/MSD TOF and HP 1100 MSD equipment with electrospray ionization. Melting points are uncorrected and were registered in a Büchi B-540 apparatus. Elemental analyses were carried out with an Elementar vario Micro. Infrared spectra were recorded in a Mattson-Genesis II FTIR equipment.

2.3 Synthesis of bis(phosphinic acid) phosphine oxide **3**

All reactions requiring anhydrous conditions were conducted in dried apparatus under an inert atmosphere of nitrogen by using standard techniques for manipulating air-sensitive compounds. The solvents were dried prior to use in a Pure Solv 400-4-MD system, according to the procedure described by Pangborn and Grubbs [38]. Commercial reagents, except organolithium bases, were distilled prior to use. TMEDA were distilled from KOH. Compounds **1** [39, 40] and **2** [27] have been described previously. Compound **3** was synthesized as follows (scheme 1).



Scheme 1. Synthesis of ligand **3**.

To an aqueous solution constituted by THF (10 mL), H₂O (20 mL) and precursor **2** (1g, 1.38 mmol) was added dropwise 2 mL of H₂SO₄. After 30 min at this temperature the pH was adjusted to 14 using NaOH 1N. The reaction was then concentrated in *vacuum* in order to reduce the main part of the organic solvent and diisopropylamine. The resulting aqueous solution was washed two times with CH₂Cl₂ (10 mL) and its pH adjusted to pH 2 using HCl 2N. The mixture was then stored overnight at 4 °C, filtered, and the solid sequentially washed with cold distilled water (2 x 10 mL) and CH₂Cl₂ (2 x 10 mL). Finally, the solid was dried in the oven at 80 °C for at least 12 h, to provide **3** as a white solid (0.38g, 49%). Mp 181-183 °C. IR (KBr disk): $\tilde{\nu}_{\max}/\text{cm}^{-1}$ 1438, 1243, 1210, 1127, 1086, 934. ¹H RMN (MeOD, 20°C): 7.05 (ddd, 2H, ³J_{HH} 7.5 Hz, ³J_{PH} 15.3 Hz, ⁴J_{PH} 4.3 Hz, H-10), 7.27 (m, 6H, H-2, H-13), 7.38 (m, 4H, ³J_{HH} 7.0 Hz, H-3, H-14), 7.49 (t, 2H, ³J_{HH} 7.3 Hz, H-9), 7.61 (t, 1H, ³J_{HH} 7.5 Hz, H-4), 7.61 (dd, 4H, ³J_{HH} 7.5 Hz, ⁴J_{PH} 12.9 Hz, H-12), 7.76 (t, 2H, ³J_{HH} 7.5 Hz, ⁴J_{PH} 1.3 Hz, H-8), 8.28 (ddd, 2H, ³J_{HH} 7.9 Hz, ³J_{PH} 13.2 Hz, ⁴J_{PH} 3.7 Hz, H-7); ¹³C RMN (MeOD, 20°C): 136.90 (dd, ³J_{PC} 127.7 Hz, ⁴J_{PC} 9.2 Hz, C-6), 135.15 (dd, ³J_{PC} 10.8 Hz, ⁴J_{PC} 9.3 Hz, C-7), 134.76 (dd, ³J_{PC} 14.1 Hz, ⁴J_{PC} 11.1 Hz, C-10), 133.03 (d, ³J_{PC} 140.1 Hz, C-11), 132.86 (dd, ³J_{PC} 104.3 Hz, ⁴J_{PC} 11.0 Hz, C-5), 132.19 (d, ³J_{PC} 22.0 Hz, ⁴J_{PC} 2.8 Hz, C-8), 132.01 (d, ³J_{PC} 2.9 Hz, C-4),

131.86 (d, $^3J_{PC}$ 9.8 Hz, C-2), 131.66 (d, $^3J_{PC}$ 3.0 Hz, C-14), 131.17 (d, $^3J_{PC}$ 10.8 Hz, C-12), 130.87 (dd, $^3J_{PC}$ 13.0 Hz, $^4J_{PC}$ 2.7 Hz, C-9), 130.28 (d, $^3J_{PC}$ 110.6 Hz, C-1), 128.47 (d, $^3J_{PC}$ 12.5 Hz, C-3), 127.86 (d, $^3J_{PC}$ 13.7 Hz, C-13); ^{31}P RMN (MeOD, 20°C): 43.04 ($^3J_{PP}$ 10.6 Hz), 28.60 ($^3J_{PP}$ 10.6 Hz). MS-ESI, m/z: 559 (M+1, 100). Analysis: Calcd. (%) for $\text{C}_{30}\text{H}_{25}\text{O}_5\text{P}_5 \cdot (+2\text{H}_2\text{O})$: C, 60.61; H, 4.92. Found: C, 61.63; H, 4.64.

2.4. Solution preparation

Aqueous solutions were prepared using doubly distilled water obtained from a Milli-Q Plus 185 ultrapure water system (Millipore, Billerica, USA). Stock ligand solution was prepared in absolute ethanol and europium(III) solutions were done with doubly distilled water. Stock and working standard solutions of ligand and lanthanide ions were stored in amber glass bottles at 4 °C.

2.5. Luminescence measurements

The luminescence measurements in solution were performed at $\lambda_{\text{exc/em}} = 232.00/616.02$ nm, which correspond with the maxima excitation and emission wavelengths of the complex. A delay on measurement time (120 μs) was used to avoid the fluorescence background and the problems originated by lamp as reflection, intensity fluctuations, etc. Table 1 lists the optimized instrumental variables for the measurements carried out in solution and in solid phase.

Table 1. Optimized instrumental conditions for measuring in solution and in solid phase.

| Variable | Optimum value (solution) | Optimum value (solid phase) |
|------------------------------------|--------------------------|-----------------------------|
| $\lambda_{\text{exc/em}}$ (nm) | 232.00/616.02 | 229.06/616.02 |
| Slit width $_{\text{exc/em}}$ (nm) | 8/8 | 10/10 |
| Detector voltage (V) | 700 | 500 |
| Total decay time (ms) | - | 20 |
| Delay time t_d (μs) | 120 | 120 |
| Gate time t_g (μs) | 150 | 5000 |
| Number of flashes | - | 1 |

- Not reported.

2.6. Membrane preparation

The luminescence measurements of the membranes were developed at $\lambda_{\text{exc/em}} = 229.06/616.02$ nm, which correspond with the maxima excitation and emission wavelengths of the europium(III)-ligand complex in solid phase (see Table 1 for the optimum instrumental variables). The membrane response was considered as the difference between the luminescence intensity of the membrane in the presence of Eu(III) and the luminescence intensity of the membrane in absence of lanthanide ion. The blank solution contained the same chemical composition than the standard solution excepting the lanthanide(III) ion.

In both cases, all the experiments were carried out in triplicate to calculate the error.

The optimum membrane solution was prepared mixing thoroughly in a closed vial 786.8 mg (262.3 mg mL^{-1}) of Nafion perfluorinated resin solution and 1.8 mg (0.6 mg mL^{-1}) of ligand (sensitizing agent) in 2.25 mL of MeOH. The obtained mixture was stirred continuously with a mixer until its complete dissolution. A volume of 300 μL of the resulting solution was deposited on the acetate sheet and spin-coated at 700 rpm at room temperature until the complete solvent mixture evaporation, obtaining ultrathin and homogeneous sensing films on acetate sheets. The polymeric membranes were stored in a closed recipient at room temperature in absence of light until its use. Three membrane replicates were made for each experimental point.

3. Results and Discussion

3.1. Study of the europium(III)-ligand complex in solution

3.1.1. Spectroscopic characterization

The formation of the luminescent complex between europium(III) ion and ligand was observed clearly. Fig 1a shows the excitation and emission spectra of the formed complex. The individual excitation and emission spectra of europium(III) ion and ligand in solution are not depicted because they did not present any luminescence signal. The observed excitation wavelengths were 232, 246 and 276 nm. The emission wavelengths were 594, 616 and 654 nm, which correspond to the europium(III) ion characteristic transitions [37]. The emission wavelength corresponding to the hypersensitive transition (616 nm) produced the highest relative luminescence intensity. Therefore, the optimum excitation and emission wavelengths

of europium(III)-ligand complex were 232.00 nm and 616.02 nm, respectively. An important parameter in luminescent complexes is the luminescence lifetime (τ). The variation of the relative luminescence intensity versus time is shown in Fig. 1b. A decrease on the relative luminescence intensity in course of time was observed. The experimental data were fitted with an exponential decay model obtaining the following equation: $R.L.I. = 1.1487 \times e^{-1294.97t}$, so the estimated luminescence lifetime was 770 μs .

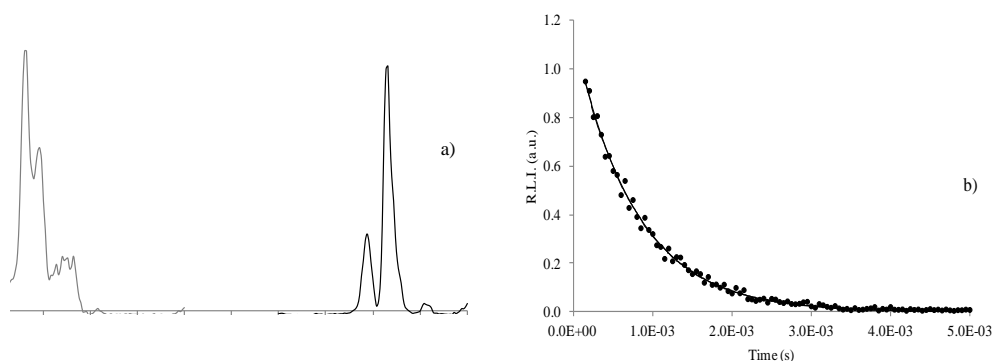


Fig. 1. Spectral characterization of europium(III)-ligand complex in solution. a) Excitation (grey line) and emission spectra (black line); b) luminescence decay curve. $[\text{Eu}^{3+}] = [\text{Ligand}] = 1.0 \times 10^{-6} \text{ M}$, 75% EtOH (v/v).

The complex is formed instantaneously when ligand and metal ion are added to the media and it is stable for at least 1 minute (see Electronic Supporting Information, ESI, Fig. S1). Therefore, all the measurements were developed after the preparation of the sample.

3.1.2. Effect of non-aqueous solvent

The dependence of the luminescence signal versus the presence of organic solvent was carried out using ethanol. Several percentages of ethanol (0, 25, 50, 75 and 100% (v/v)) were added to the sample. The results are shown in ESI (Fig S2). It indicates that the luminescence signal is not affected when the percentage of ethanol is lower than 25%. However, for higher percentages the relative luminescence intensity decreased gradually until the signal practically disappeared when the sample only contains ethanol. Thus, the use of organic media does not improve or even decrease the luminescence signal; therefore no organic media was used for the rest of experiments.

3.1.3. Effect of ionic strength

The influence of ionic strength on the complex luminescence intensity was also evaluated. The ionic strength was controlled by using different concentrations of NaCl (0.0, 0.1, 0.2, 0.3 and 0.5 M). ESI (Fig S3) shows the variation of the relative luminescence intensity versus the NaCl concentration. It is possible to conclude that the ionic strength does not affect significantly the luminescence signal for concentration lower than 0.3 M. For higher concentrations of NaCl the luminescence signal is decreased. Thus, for the rest of the experimental work NaCl was not used.

3.1.4. Effect of pH

The pH dependence on the complex luminescence intensity was evaluated for a sample containing 5.0×10^{-7} M Eu(III). The pH was adjusted between 3.0 and 11.0 by using HCl and/or NaOH. The results are depicted in ESI (Fig. S4). It can be seen that the relative luminescence intensity was independent from solution pH in a range of 3.0 to 9.0. This wide working pH could be used to measure environmental and industrial water samples without the need of pH adjustment in the analyzed samples. For higher pHs, the luminescence signal decreases drastically. It was attributed to the formation of $\text{Eu}(\text{OH})_3$ which is insoluble. For it, although the adequate working pH covered a wide range, a neutral pH of 7.0 was selected as optimum.

3.1.5. Stoichiometry of europium(III)-ligand complex

The stoichiometry of the complex formed between europium(III) ion and ligand was studied by using the Joe Jones method (Fig. 2).

Fig. 2a shows the relative luminescence intensity versus Eu(III):Ligand ratio maintaining constant europium(III) ion concentration. It can be observed two inflections points at 1:1 and 1:2 Eu(III):Ligand ratio. Therefore, it can be interpreted as the formation of two different stoichiometries: 1:1 for lower amount of ligand and 1:2 for higher amounts of ligands. The decrease of the luminescence signal observed for higher concentration of ligand was attributed to an auto quenching phenomena. These results were also corroborated by carrying out the same experiments but keeping constant ligand concentration (Fig. 2b). As the obtained results agreed in both cases, it is concluded that the ligand promote the formation of two europium(III) complexes with Eu(III):Ligand stoichiometries of 1:1 (low luminescence complex) and 1:2 (high luminescence complex).

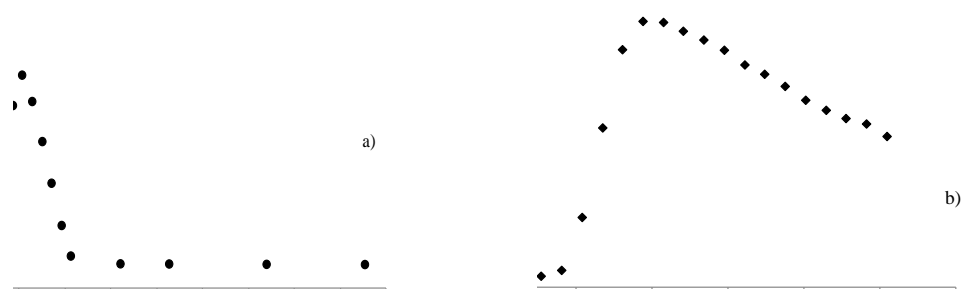


Fig. 2. Determination of the stoichiometry of the complex in solution. a) Keeping the Eu(III) concentration constant ($[\text{Eu}^{3+}] = 7.5 \times 10^{-6} \text{ M}$; $\text{pH} = 7.0$); b) keeping constant the concentration of the ligand ($[\text{Ligand}] = 3.8 \times 10^{-6} \text{ M}$; $\text{pH} = 7.0$).

3.2. Characterization of luminescence sensing films

The sensing response was used for the characterization of the sensing films. The sensing response was determined by subtracting the luminescence signal of the films after immersion in 20 mL of a blank solution during 5 min from the luminescence signal of the films after immersion in 20 mL of Eu(III) solution during 5 min. Before the measurements all the membranes were dried with a nitrogen flow.

3.2.1. Spectral characterization

It was observed that europium(III) ion evidenced very strong luminescence intensity for the Nafion membrane based on the ligand to its most intense emission peak (hypersensitive transition) among different lanthanides tested. This is most probably due to the selective interaction of ligand and europium(III) ion, and the fast exchange kinetics of the resulting europium(III)-ligand complex.

Fig. 3 shows the excitation and emission spectra of the optimized membrane sensor in the presence of europium(III) ion. It shows, on the one hand four emission peaks (593, 616, 655 and 700 nm) which correspond to the characteristic line-type bands of europium(III) ion. The highest luminescent peak corresponds with 616.02 nm, which was practically the same emission wavelength that the highest luminescent peak in solution (618.00 nm). Thus it is possible to conclude that the immobilization of the ligand into the liquid membrane does not affect the chemical structure of the ligand. On the other hand, a wide excitation band with two

maximum peaks (229 and 273 nm) was observed. These peaks could arise from the excitation of the phenyl groups of the ligand. The absolute excitation maximum (229.06 nm) was not modified with respect to that of the solution (232.00 nm).

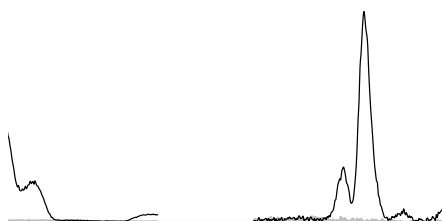


Fig. 3 Spectral characterization of the optimized sensing film in absence of Eu(III) ion (grey line) and in presence of europium(III) (black line). Optimum membrane composition: Nafion:Ligand 262.3:0.6 mg mL⁻¹; [acetate buffer] = 25 mM at pH 5.0; [Eu³⁺] = 1.0 x 10⁻⁶ M. $\lambda_{\text{exc/em}} = 229.06/616.02$ nm, excitation and emission slit widths of 10 nm, 500 V detector voltage, $t_d = 120$ μ s and $t_g = 5$ ms.

Furthermore, the preliminary studies demonstrated that five minutes was sufficient time in which an acceptable luminescence signal was obtained, so it was selected as reaction time. This considerable reaction time could be explained by a slow diffusion rate of europium(III) ion into the membrane, which was produced by its relatively high ionic volume.

3.2.2. Nature and concentration of plasticizer

The plasticizer nature can affect the response of the sensing film. Two plasticizers such as DOS and glycerol were evaluated. It was observed that the membrane sensors formed with DOS plasticizer precipitated during their preparation. It was due to the precipitation of DOS plasticizer inside the membrane, which is a moderately non-polar molecule immobilized in a polar polymeric matrix. Non precipitated particles were observed when glycerol (molecule with more polar character) was used as plasticizer. So glycerol was selected as the plasticizer of choice.

Subsequently, four concentrations of glycerol (0.0, 50.4, 96.8, and 139.9 mg mL⁻¹) were tested and the results are depicted in the ESI (Fig. S5). It was observed that the addition of glycerol to the polymeric membrane composition did not improve the luminescence intensity

of the sensing film and even provoked a slight decrease at high concentrations. It can be explained by the characteristic structure of Nafion perfluorinated resin (branched linear polymer), which allowed the entrance and diffusion of europium(III) ions inside the membrane. It is possible to conclude that it is not necessary to use any plasticizer to increase the sensitivity of the sensing film.

3.2.3. Ligand concentration

The dependence of ligand concentration on the luminescence intensity of the sensing film was also studied. Five concentrations (0.0, 0.3, 0.6, 1.0 and 1.5 mg mL⁻¹) were tested (see ESI, Fig. S6). The graph shows that the sensing response to Eu(III) ion increases gradually up to a ligand concentration of 0.6 mg mL⁻¹. Higher concentrations of ligand do not increase the response signal, thus the optimum ligand concentration was set to 0.6 mg mL⁻¹.

3.2.4. Ionic additive concentration

The influence of ionic additive concentration on the luminescence signal of the sensing membrane was investigated by varying potassium tetrakis(4-chlorophenyl) borate (KTPClPB) concentration from 0.0 to 1.5 mg mL⁻¹. KTPClPB is an alkaline lipophilic salt, which was incorporated into the membrane for reasons of electroneutrality. ESI (Fig. S7) shows that the sensing response with Eu(III) ions is not affected by the use of KTPClPB in the membrane composition. It can be concluded that the addition of ionic additive to the membrane composition is not necessary and was discarded, reducing in this way the costs of the sensing film. For explaining this phenomenon, it was assumed the entrance of the ionic pair EuCl₃·6H₂O, fulfilling in this way the electroneutrality principle which governs the PIMs.

To sum up, the optimum composition of the sensing film was: Nafion:Ligand as 262.3:0.6 mg mL⁻¹.

3.2.5. pH effect

The pH dependence of the sensing film was tested over the pH range of 2.0-11.0 at a 1.0 x 10⁻⁶ M Eu(III) concentration (see ESI, Fig. S8). The sensing response varied in a distorted Gaussian way in the studied pH range. The response of the membrane sensors was strongly dependent on pH, which implied that the proposed sensor could be used to measure environmental and industrial water samples, but being necessary a previous pH adjustment of the analyzed samples. The maximum luminescence intensity was obtained at pH 5.0, for

which fast exchange kinetics were achieved inside the membrane. For higher pH values, a relatively important drift was observed, which could be due to the formation of $\text{Eu}(\text{OH})_3$ insoluble compound in solution. For lower pH values, a gradual decrease on the luminescence intensity was observed. It could be due to the protonation of the ligand used to some extent and therefore, the decrease of the formation of the luminescent complex in the membrane. Finally, the pH value of 5.0 was considered optimum for analyzing europium(III) ions in water samples.

3.2.6. Kind and concentration of buffer solution

The use of a buffer solution was investigated in order to maintain water samples at the optimum pH. Different buffer solutions such as acetate and hydrogen phthalate, whose working pH range covered the optimum pH of 5.0, were studied. ESI (Fig. S9) shows the sensing response for each buffer solution. Rather similar luminescence signals were obtained with both buffer solutions, being the acetate-based one which provided a higher sensing response. It could be explained since acetate is a relatively small molecule with a larger polar character compared to hydrogen phthalate, which confers the formation of more polar ionic pairs with europium(III) ion and therefore, a better diffusion of these ionic pairs into the membrane cavities.

The influence of buffer solution concentration on the membrane sensors was also tested. ESI (Fig. S10) depicts the sensing response with different concentrations of the acetate buffer at pH 5.0 (0, 25, 50, and 75 mM). The increase of the buffer concentration increases the sensing response up to 25 mM, keeping constant the signal for higher concentrations. The addition of acetate buffer solution produced a considerable increase on the luminescence signal due to the formation of more stabilized ion pairs of europium(III) with regard to water; and thus, they penetrated and spread better inside the membrane. When the concentration of buffer was higher than 25 mM, significant differences were not observed because all europium(III) ions were forming ion pairs with acetate molecules. Therefore, a minimum acetate buffer concentration of 25 mM was considered as optimum.

3.3. Figures of merits

3.3.1. Analytical parameters

The luminescence intensity of the sensing films at different concentrations of europium(III) (see ESI, Fig. S11) indicated a linear concentration range from 1.9×10^{-8} to 5.0×10^{-6} M. A linear fit ($R.L.I. = 8.5707 \times [Eu^{3+}] - 1.0982$; $r^2 = 0.9981$) was performed successfully with the experimental data, in which graphical or mathematical interpolation could be carried out inside the linear range to determine europium(III) concentration. Other characteristic parameters may be summarized as follows: the slope of the calibration graph was 8.57×10^{-7} a.u./M, the detection limit was 5.8×10^{-9} M (which is the best detection limit reached for any europium(III)-sensitive optical sensing film published in the literature), the quantification limit was 1.9×10^{-8} M and the blank relative standard deviation for three replicate measurements was 13.9%.

3.3.2. Study of interferences

The selective behavior is clearly one of the most important parameters of a membrane sensor. Four lanthanide(III) ions (lanthanum, samarium, terbium and ytterbium) were selected as interfering ions in order to check the selectivity of the membrane sensor. Fig. 4 shows the results of this study.

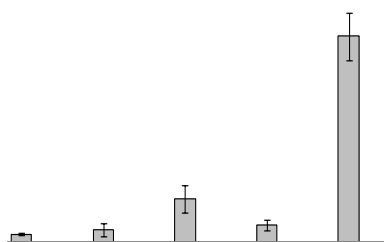


Fig. 4. Interference study. Optimum membrane composition: Nafion:Ligand 262.3:0.6 mg mL⁻¹; [Lanthanide(III) ion] = 1.0×10^{-6} M in 25 mM acetate buffer solution at pH 5.0. $\lambda_{exc/em}$ = 229.06/616.02 nm, excitation and emission slit widths of 10 nm, 500 V detector voltage, t_d = 120 μ s and t_g = 5 ms.

It presents that lanthanum, samarium and ytterbium(III) ions provoked negligible signals whereas terbium(III) ion provided an appreciable luminescence signal with regard to europium(III) ion signal. Therefore, it can conclude that terbium(III) ion produced a small positive interference in the determination of europium(III) ion and the luminescent signals were additive for lanthanide(III) ions, but more important, the membrane sensors were selective for determining europium(III) ions in water.

4. Conclusions

The results presented here demonstrate that a Nafion membrane luminescence sensor for determining europium(III) ions was developed. For it, a new mixed ligand containing two diphenylphosphinic acid side-arms connected through the ortho position to a phenylphosphine oxide moiety was synthesized and evaluated as sensitizing agent, observing the phenomenon of ligand-sensitized luminescence of lanthanides. The new ligand was fully characterized by NMR, IR and elemental analysis. The stoichiometries of europium(III)-ligand complexes were 1:1 (less luminescent complex) and 1:2 (more luminescent complex). The spectroscopic (large Stokes shift, long luminescence lifetime and emission spectrum with very narrow bands) and chemical (wide range of pH and no influence of ionic strength) characteristics of the luminescent complex in solution were excellent indicators for carrying out the immobilization of the ligand in PIMs.

The nature and concentration of plasticizer as well as ligand and ionic additive concentrations were investigated to optimize the chemical composition of the membrane sensor. Optimum membrane sensor had a composition for Nafion:Ligand of 262.3:0.6 mg mL⁻¹. The response of the sensing film had a strong influence with working pH, so a previous pH adjustment was necessary for analyzing europium(III) water samples. Acetate buffer solution, whose concentration was 25 mM, was used to obtain the maximum luminescence signal maintaining the optimum pH of 5.0. The membrane sensor was rather selective for the determination of europium(III) ions, although a small positive interference of terbium(III) ion was observed. It showed a short time response (5 min) and a linear range from 1.9×10^{-8} to 5.0×10^{-6} M with a detection limit of 5.8×10^{-9} M, which is the best detection limit reached for any europium(III)-sensitive optical sensing film published in the literature.

The developed sensing film is a simple and very promising alternative to expensive and tedious analytical methods, which offers the possibility for practical sensing and the determination of europium(III) ion concentration in water.

Acknowledgements

This work was supported by Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa (projects P07-FQM-2625 and 2738), Ministerio de Ciencia e Innovación (MICINN) and fondos FEDER (projects 2008-0117 and TEC2010-17085). We thank Dr. R. Romero for helpful discussions and technical assistance on ESI-TOF analysis.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found in Appendix A.

References

- [1] H.A. Zamani, M.S. Zabihi, M. Rohani, A. Zangeneh-Asadabadi, M.R. Ganjali, F. Faridbod, S. Meghdadi, *Materials Science and Engineering: C*, 31 (2011) 409-413.
- [2] Y. Suzuki, T. Suzuki, N. Furuta, *Analytical Sciences*, 26 (2010) 929-935.
- [3] N. Arnaud, J. Georges, *Analyst*, 122 (1997) 143-146.
- [4] S. Liawruangrath, S. Sakulkaemaruethai, *Talanta*, 59 (2003) 9-18.
- [5] C. Karadas, D. Kara, A. Fisher, *Analytica Chimica Acta*, 689 (2011) 184-189.
- [6] C. Huang, Z. Jiang, B. Hu, *Talanta*, 73 (2007) 274-281.
- [7] C.-Y. Liu, N.M. Lee, T.-H. Wang, *Analytica Chimica Acta*, 337 (1997) 173-182.
- [8] L.M. Moretto, J. Chevalet, G.A. Mazzocchin, P. Ugo, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 498 (2001) 117-126.
- [9] H.A. Zamani, G. Rajabzadeh, M.R. Ganjali, *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, 80 (2007) 172-177.
- [10] M. Reza Ganjali, M. Rahimi, B. Maddah, A. Moghimi, S. Borhany, *Analytical Sciences*, 20 (2004) 1427-1431.
- [11] J.F. Fernandez-Sanchez, I. Fernandez, R. Steiger, R. Beer, R. Cannas, U.E. Spichiger-Keller, *Advanced Functional Materials*, 17 (2007) 1188-1198.

- [12] A.L. Medina-Castillo, J.F. Fernandez-Sanchez, A. Fernandez-Gutierrez, *Advanced Functional Materials*, 21 (2011) 3488-3495.
- [13] A.L. Medina-Castillo, J.F. Fernandez-Sanchez, A. Segura-Carretero, A. Fernandez-Gutierrez, *Biosensors & Bioelectronics*, 25 (2009) 442-449.
- [14] A.L. Medina-Castillo, G. Mistlberger, J.F. Fernandez-Sanchez, A. Segura-Carretero, I. Klimant, A. Fernandez-Gutierrez, *Macromolecules*, 43 (2010) 55-61.
- [15] S. Chen, H. Zhao, X. Wang, X. Li, L. Jin, *Analytica Chimica Acta*, 506 (2004) 25-29.
- [16] M.R. Ganjali, M. Hosseini, M. Hariri, P. Norouzi, A.A. Khandar, A. Bakhtiari, *Materials Science and Engineering: C*, 30 (2010) 929-933.
- [17] C. Guo, A. Lang, L. Wang, W. Jiang, *Journal of Luminescence*, 130 (2010) 591-597.
- [18] A. Thibon, V. Pierre, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 394 (2009) 107-120.
- [19] W. Yang, Z.L. Mo, X.L. Teng, M. Chen, J.Z. Gao, L. Yuan, J.W. Kang, Q.Y. Ou, *Analyst*, 123 (1998) 1745-1748.
- [20] W. Jiang, Y. Ma, W. Zhao, Y. Feng, N. Wang, Z. Si, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 377 (2003) 681-684.
- [21] M.R. Ganjali, F. Faridbod, P. Norouzi, M. Adib, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 120 (2006) 119-124.
- [22] M.R. Ganjali, P. Norouzi, T. Alizadeh, A. Tajarodi, Y. Hanifehpour, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 120 (2007) 487-493.
- [23] H.A. Zamani, A. Imani, A. Arvinfar, F. Rahimi, M.R. Ganjali, F. Faridbod, S. Meghdadi, *Materials Science and Engineering: C*, 31 (2011) 588-592.
- [24] F.E. Mercader-Trejo, E. Rodríguez de San Miguel, J. de Gyves, *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 84 (2009) 1323-1330.
- [25] M.R. Ganjali, F.S. Mirnaghi, P. Norouzi, M. Adib, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 115 (2006) 374-378.
- [26] S.K. Menon, N.R. Modi, B. Patel, M.B. Patel, *Talanta*, 83 (2011) 1329-1334.
- [27] C. Popovici, I. Fernandez, P. Ona-Burgos, L. Rocés, S. Garcia-Granda, F. Lopez-Ortiz, *Dalton Transactions*, 40 (2011) 6691-6703.
- [28] F.J. Sainz-Gonzalo, M. Casimiro, C. Popovici, A. Rodriguez-Dieguez, J.F. Fernandez-Sanchez, I. Fernandez, F. Lopez-Ortiz, A. Fernandez-Gutierrez, Unpublished results submitted to *Dalton Transactions*. (2012).

- [29] C.F.G.C. Geraldes, A.D. Sherry, W.P. Cacheris, *Inorganic Chemistry*, 28 (1989) 3336-3341.
- [30] C.J. Broan, K.J. Jankowski, R. Katakay, D. Parker, A.M. Randall, A. Harrison, *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications* (1990) 1739-1741.
- [31] D. Parker, J.A.G. Williams, *Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions* (1996) 3613-3628.
- [32] I. Lukes, J. Kotek, P. Vojtisek, P. Hermann, *Coordination Chemistry Reviews*, 216-217 (2001) 287-312.
- [33] K.P. Pulukkody, T.J. Norman, D. Parker, L. Royle, C.J. Broan, *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2* (1993) 605-620.
- [34] E.P. Horwitz, H. Diamond, D.G. Kalina, in: W.C. Carnell, G. Choppin (Eds.), *ACS Symp. Ser. no. 216*, 1983, p. 433-450.
- [35] M.K. Chmutova, L.A. Ivanova, N.E. Kochetkova, N.P. Nesterova, B.F. Myasoedov, A.M. Rozen, *Radiochemistry*, 37 (1995) 388-392.
- [36] T. Andrzej W, *Reactive and Functional Polymers*, 44 (2000) 9-19.
- [37] F.S. Richardson, *Chemical Reviews*, 82 (1982) 541-552.
- [38] A.B. Pangborn, M.A. Giardello, R.H. Grubbs, R.K. Rosen, F.J. Timmers, *Organometallics*, 15 (1996) 1518-1520.
- [39] B. Burns, N.P. King, H. Tye, J.R. Studley, M. Gamble, M. Wills, *Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions 1* (1998) 1027-1038.
- [40] I. Fernandez, P.O. Burgos, G.R. Gomez, C. Bled, S. Garcia-Granda, F.L. Ortiz, *Synlett* (2007) 611-614.

Appendix A. Supplementary Data

A novel tridentate bis(phosphinic acid)-phosphine oxide based Europium(III)-selective Nafion membrane luminescent sensor

F.J. Sainz-Gonzalo ^a, C. Popovici ^b, M. Casimiro ^b, J.F. Fernández-Sánchez ^{a,*}, I. Fernández ^{b,*}, F. L. Ortiz ^{b,*}, A. Fernández-Gutiérrez ^a

^a *Department of Analytical Chemistry, Faculty of Sciences, University of Granada, Av. Fuentenueva s/n, 18071 Granada, Spain*

^b *Laboratory of Organic Chemistry, University of Almería, Ctra. Sacramento s/n, 04120 Almería, Spain*

INDEX

Solution characterization

- Fig. S1.** Complex formation time
- Fig. S2.** Effect of the organic media in solution
- Fig. S3.** Effect of the ionic strength in solution
- Fig. S4.** Effect of pH in solution

Characterization of sensing film

- Fig. S5.** Effect of the concentration of plasticizer
- Fig. S6.** Effect of the concentration of ligand
- Fig. S7.** Effect of the concentration of KTpCIPB
- Fig. S8.** Effect of pH
- Fig. S9.** Effect of kind of buffer
- Fig. S10.** Effect of the concentration of buffer
- Fig. S11.** Calibration curve

Solution NMR characterization of ligand 3

- Fig. S12.** ¹H NMR spectrum (500 MHz) for ligand **3** in MeOD at RT.
- Fig. S13.** ³¹P NMR spectrum (202 MHz) for ligand **3** in MeOD at RT.
- Fig. S14.** ¹³C NMR spectrum (125 MHz) for ligand **3** in MeOD at RT.
- Fig. S15.** ¹H COSY NMR spectrum (500 MHz) for ligand **3** in MeOD at RT.

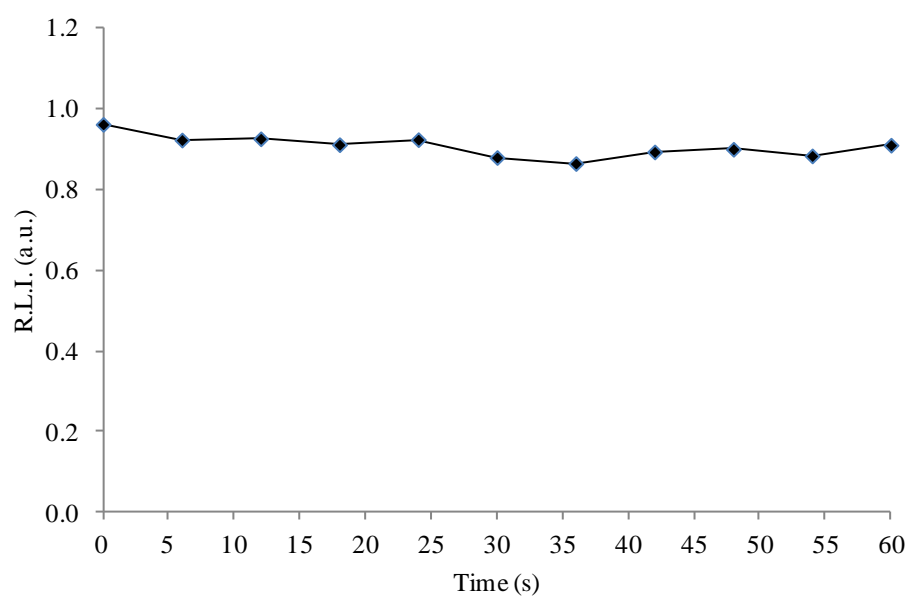


Fig. S1. Formation time of europium(III)-ligand complex in solution. $[\text{Eu}^{3+}] = [\text{Ligand}] = 1.0 \times 10^{-6} \text{ M}$ (75% EtOH, v/v).

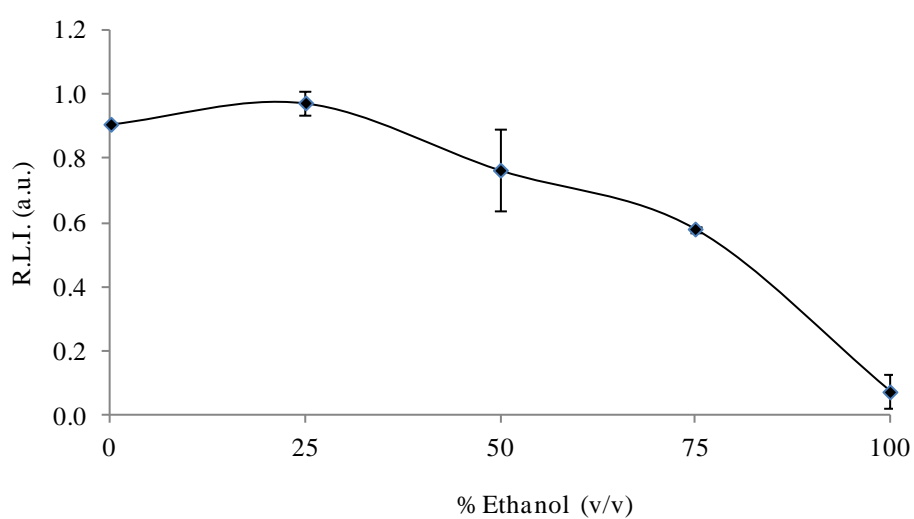


Fig. S2. Luminescence intensity versus EtOH percentage in solution. $[\text{Eu}^{3+}] = 5.0 \times 10^{-7} \text{ M}$ and $[\text{Ligand}] = 2.0 \times 10^{-6} \text{ M}$.

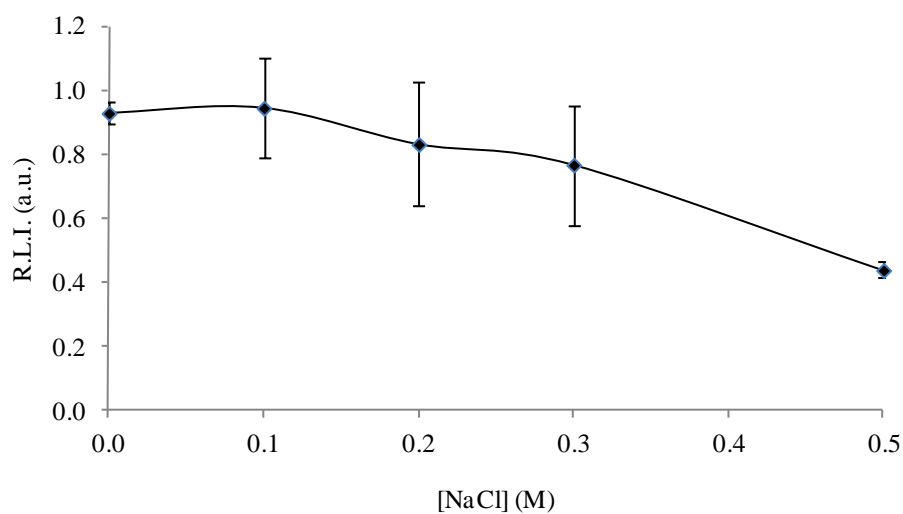


Fig. S3. The influence of NaCl concentration on the complex luminescence intensity in solution. $[\text{Eu}^{3+}] = 5.0 \times 10^{-7} \text{ M}$ and $[\text{Ligand}] = 2.0 \times 10^{-6} \text{ M}$ (0% EtOH, v/v).

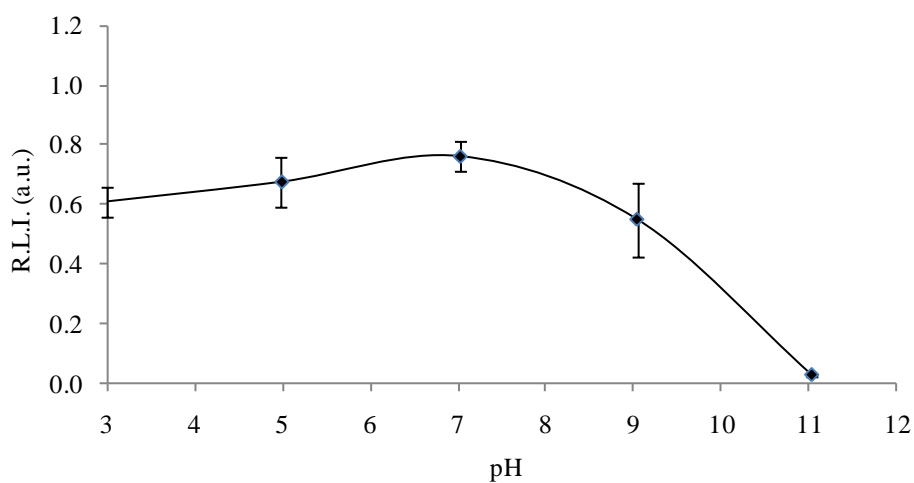


Fig. S4. Effect of pH on the complex luminescence intensity in solution. $[\text{Eu}^{3+}] = 5.0 \times 10^{-7} \text{ M}$ and $[\text{Ligand}] = 2.0 \times 10^{-6} \text{ M}$ (0% EtOH, v/v; 0 M NaCl).

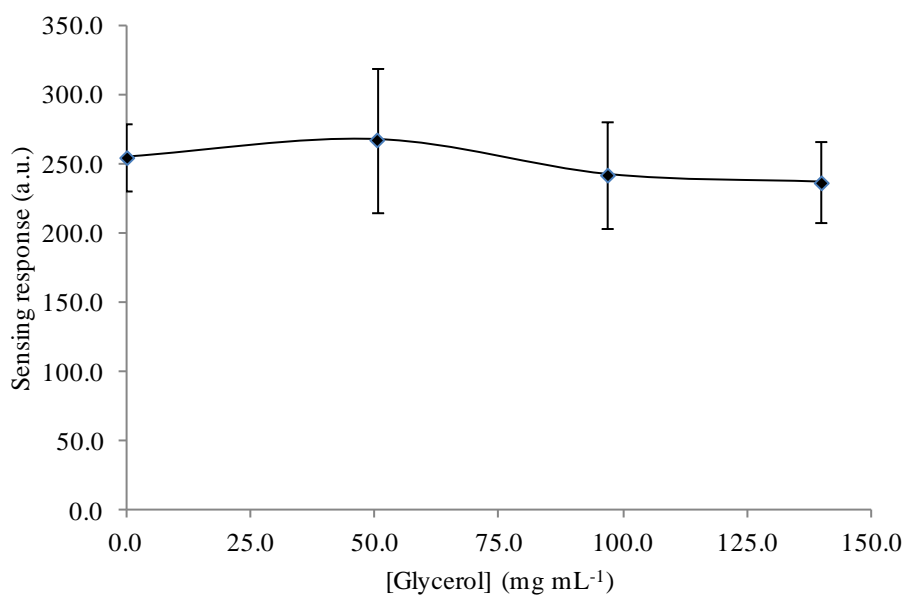


Fig. S5. Sensing response of the film versus glycerol plasticizer concentration. Membrane composition: Nafion:Glycerol:Ligand:KTPClPB as 262.3:0-139.9:0.6:0.6 mg mL⁻¹. [Eu³⁺] = 1.0 x 10⁻⁶ M. $\lambda_{\text{exc/em}}$ = 229.06/616.02 nm, excitation and emission slit widths of 5 nm, 700 V detector voltage, $t_d = 120 \mu\text{s}$ and $t_g = 5 \text{ ms}$.

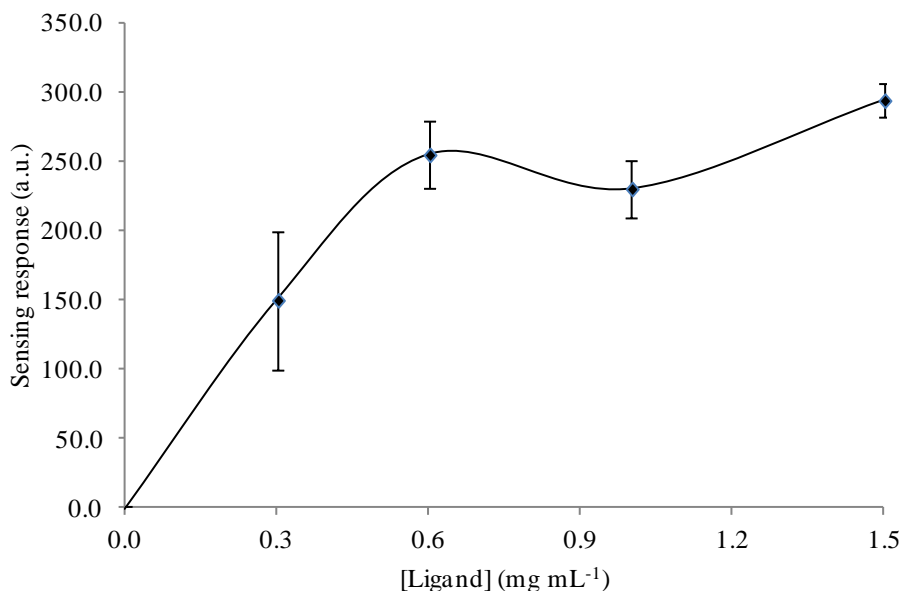


Fig. S6. Effect of ligand concentration on the sensing response. Membrane composition: Nafion:Ligand:KTPClPB as 262.3:0-1.5:0.6 mg mL⁻¹. [Eu³⁺] = 1.0 x 10⁻⁶ M. $\lambda_{\text{exc/em}}$ = 229.06/616.02 nm, excitation and emission slit widths of 5 nm, 700 V detector voltage, $t_d = 120 \mu\text{s}$ and $t_g = 5 \text{ ms}$.

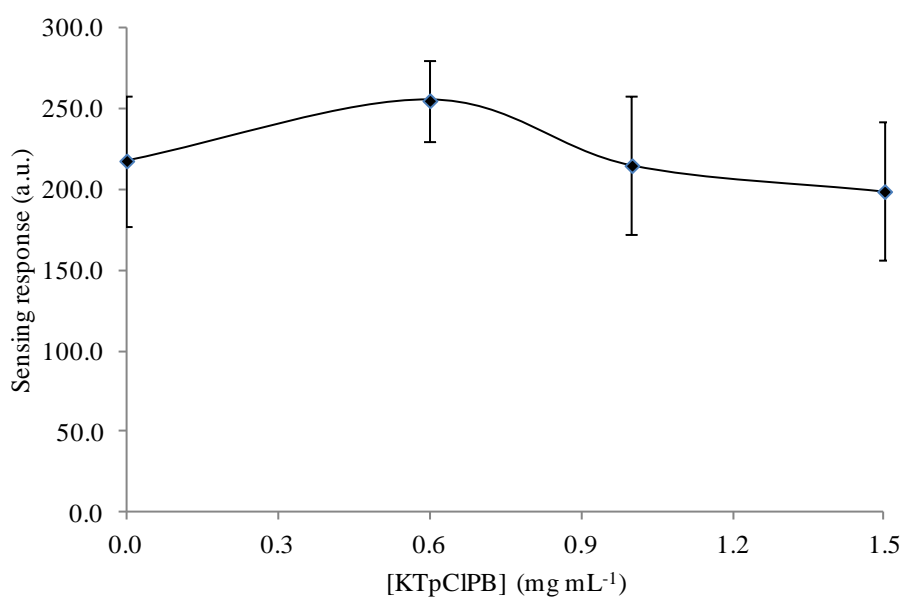


Fig. S7. Variation of the sensing response versus ionic additive concentration. Membrane composition: Nafion:Ligand:KTpCIPB as 262.3:0.6:0-1.5 mg mL⁻¹. [Eu³⁺] = 1.0 x 10⁻⁶ M. $\lambda_{\text{exc/em}}$ = 229.06/616.02 nm, excitation and emission slit widths of 5 nm, 700 V detector voltage, $t_d = 120 \mu\text{s}$ and $t_g = 5 \text{ ms}$.

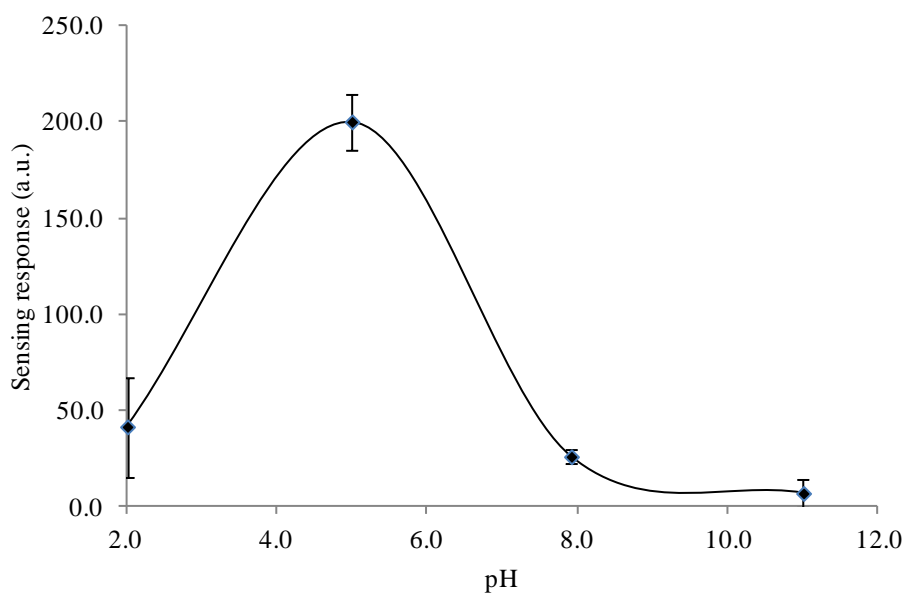


Fig. S8. Effect of pH on solid phase. Optimum membrane composition: Nafion:Ligand as 262.3:0.6 mg mL⁻¹. [Eu³⁺] = 1.0 x 10⁻⁶ M. $\lambda_{\text{exc/em}}$ = 229.06/616.02 nm, excitation and emission slit widths of 5 nm, 700 V detector voltage, $t_d = 120 \mu\text{s}$ and $t_g = 5 \text{ ms}$.

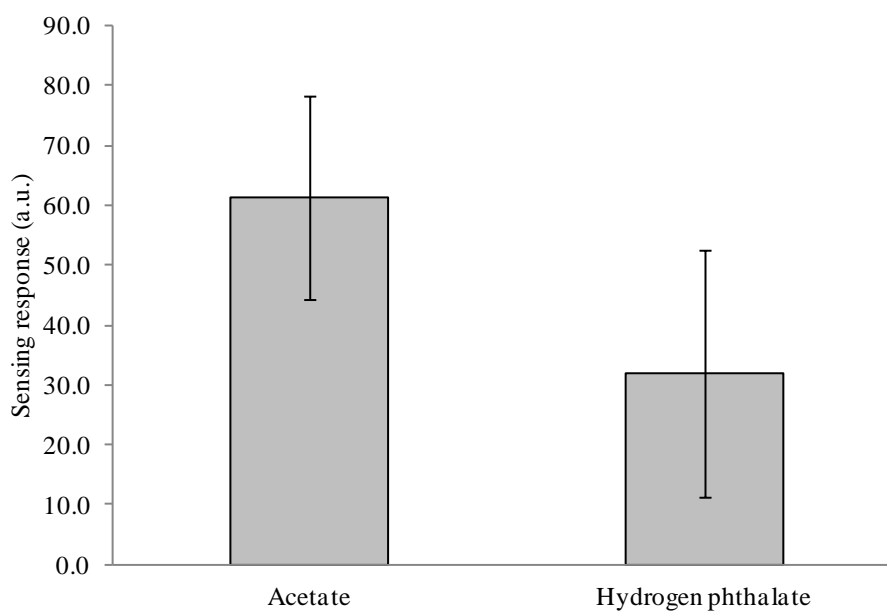


Fig. S9. Sensing response of the film in different 75 mM buffer solutions at pH = 5.0. Optimum membrane composition: Nafion:Ligand as 262.3:0.6 mg mL⁻¹. [Eu³⁺] = 1.0 x 10⁻⁶ M. $\lambda_{\text{exc/em}}$ = 229.06/616.02 nm, excitation and emission slit widths of 10 nm, 500 V detector voltage, t_d = 120 μ s and t_g = 5 ms.

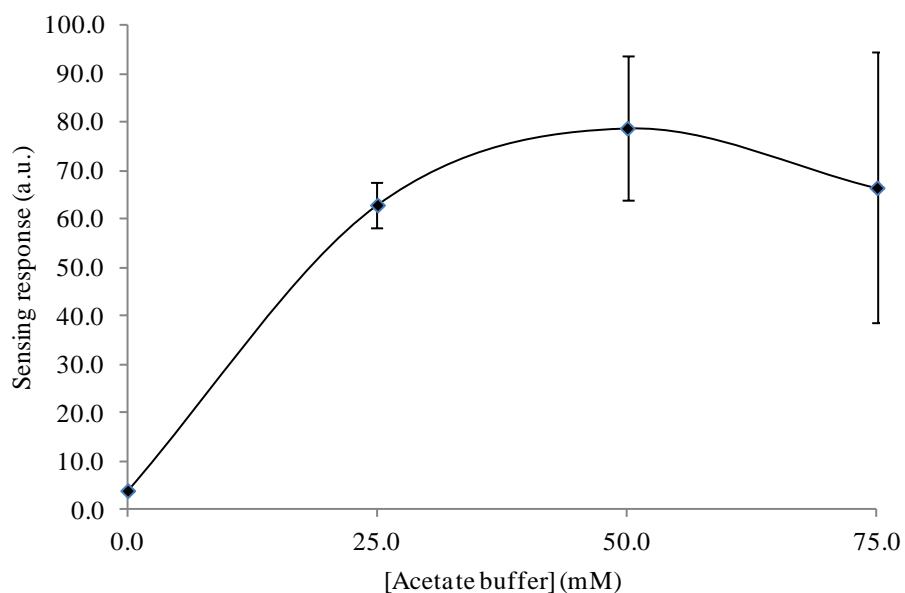


Fig. S10. Effect of the ionic strength on the sensing response. Optimum membrane composition: Nafion:Ligand as 262.3:0.6 mg mL⁻¹. [Eu³⁺] = 1.0 x 10⁻⁶ M, pH = 5.0. $\lambda_{\text{exc/em}}$ = 229.06/616.02 nm, excitation and emission slit widths of 10 nm, 500 V detector voltage, t_d = 120 μ s and t_g = 5 ms.

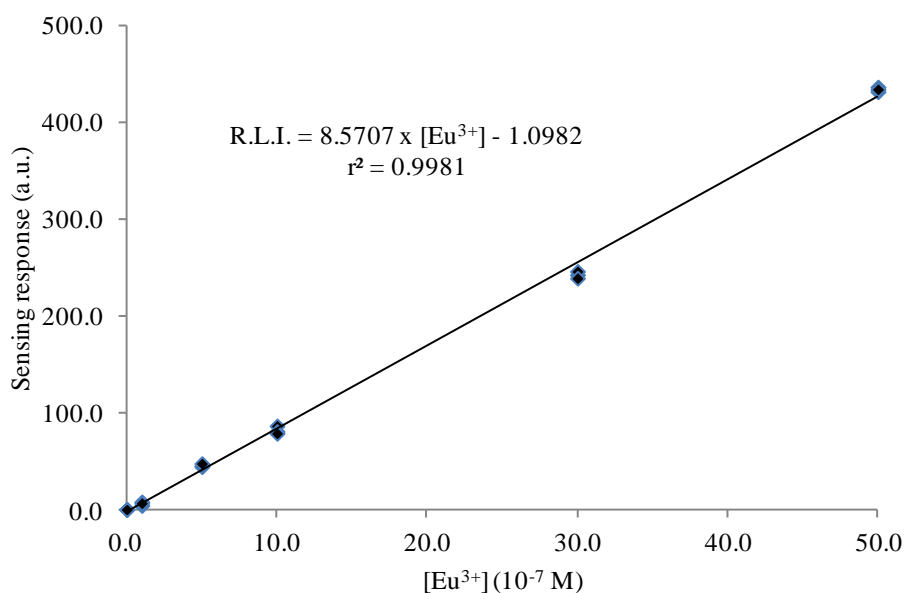


Fig. S11. Calibration graph of the europium(III) membrane sensors. Optimum membrane composition: Nafion:Ligand as 262.3:0.6 mg mL⁻¹. [Blank] = 25 mM acetate buffer at pH 5.0; [Eu³⁺] = 1.0 × 10⁻⁷-5.0 × 10⁻⁶ M in 25 mM acetate buffer solution at pH 5.0. $\lambda_{\text{exc/em}}$ = 229.06/616.02 nm, excitation and emission slit widths of 10 nm, 500 V detector voltage, t_d = 120 μ s and t_g = 5 ms.

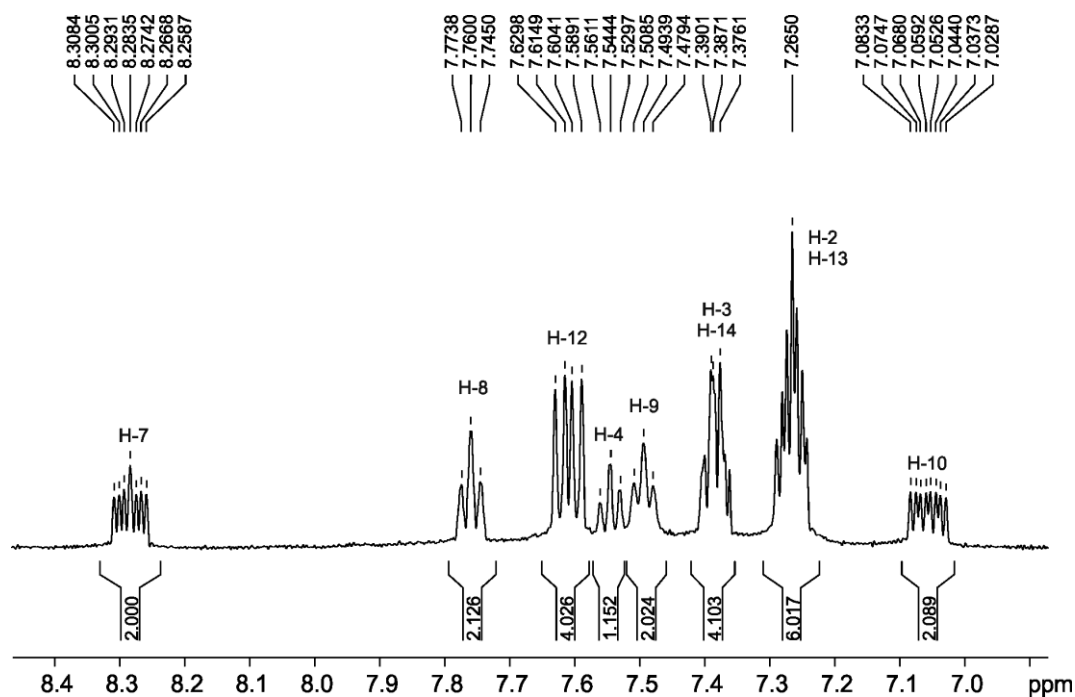


Fig. S12. ¹H NMR spectrum (500 MHz) for ligand **3** in MeOD at 20 °C.

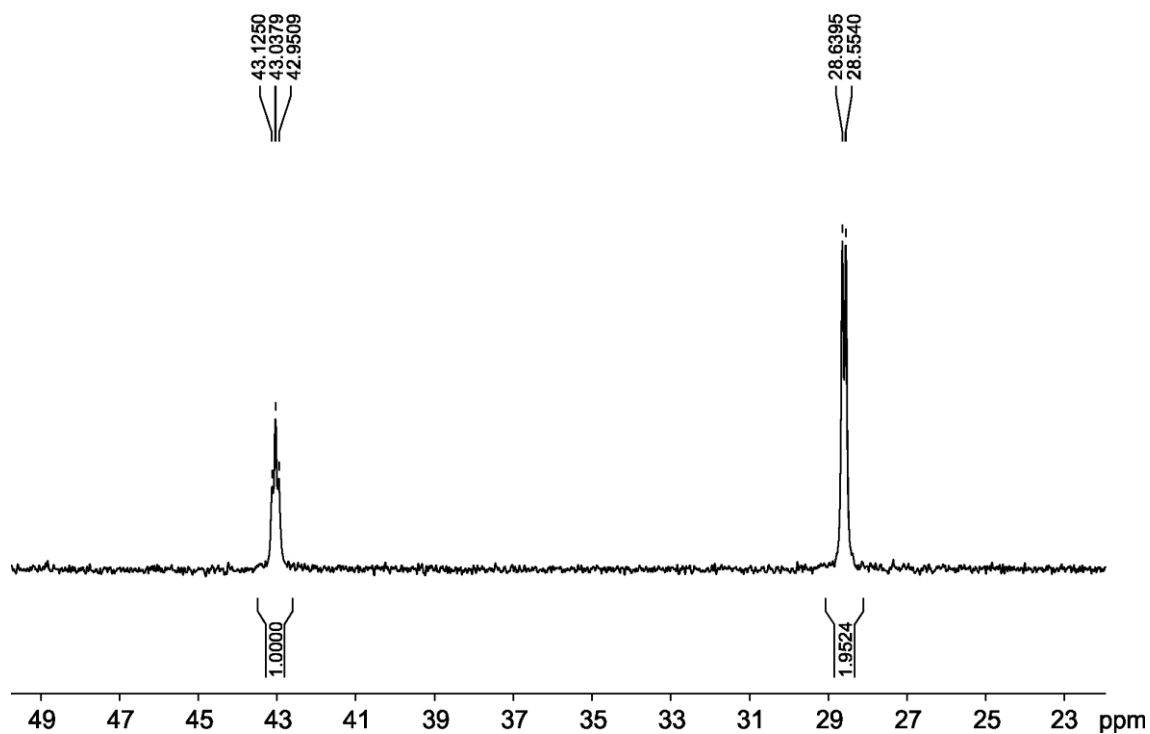


Fig. S13. ³¹P NMR spectrum (202 MHz) for ligand **3** in MeOD at 20 °C.

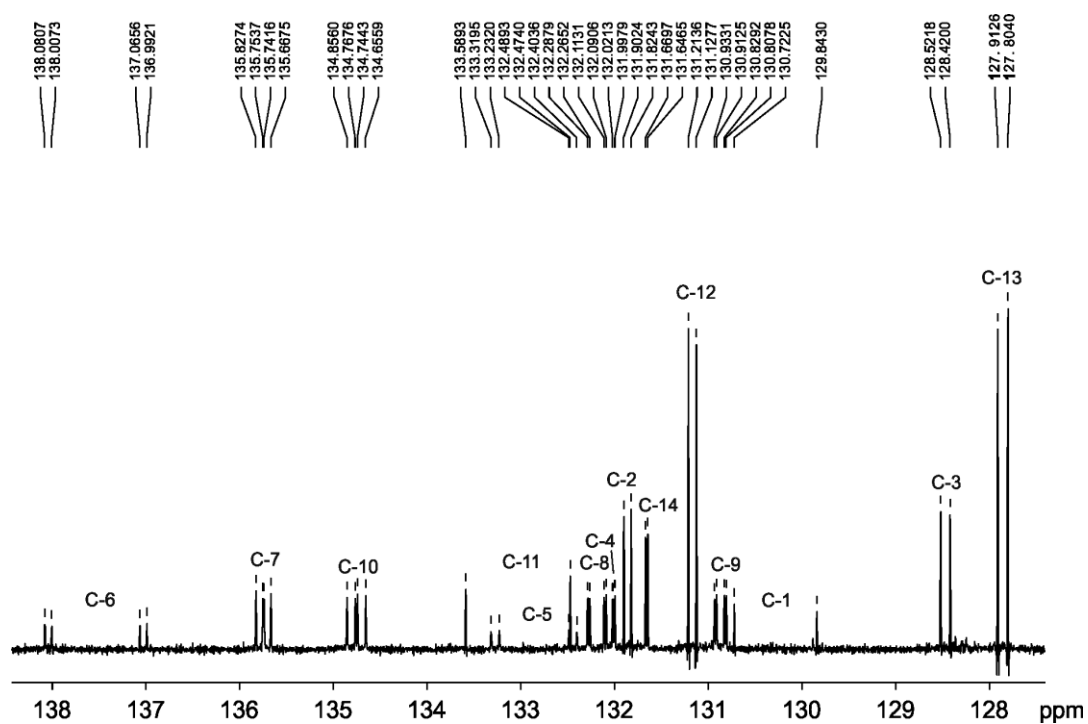


Fig. S14. ¹³C NMR spectrum (125 MHz) for ligand **3** in MeOD at 20 °C.

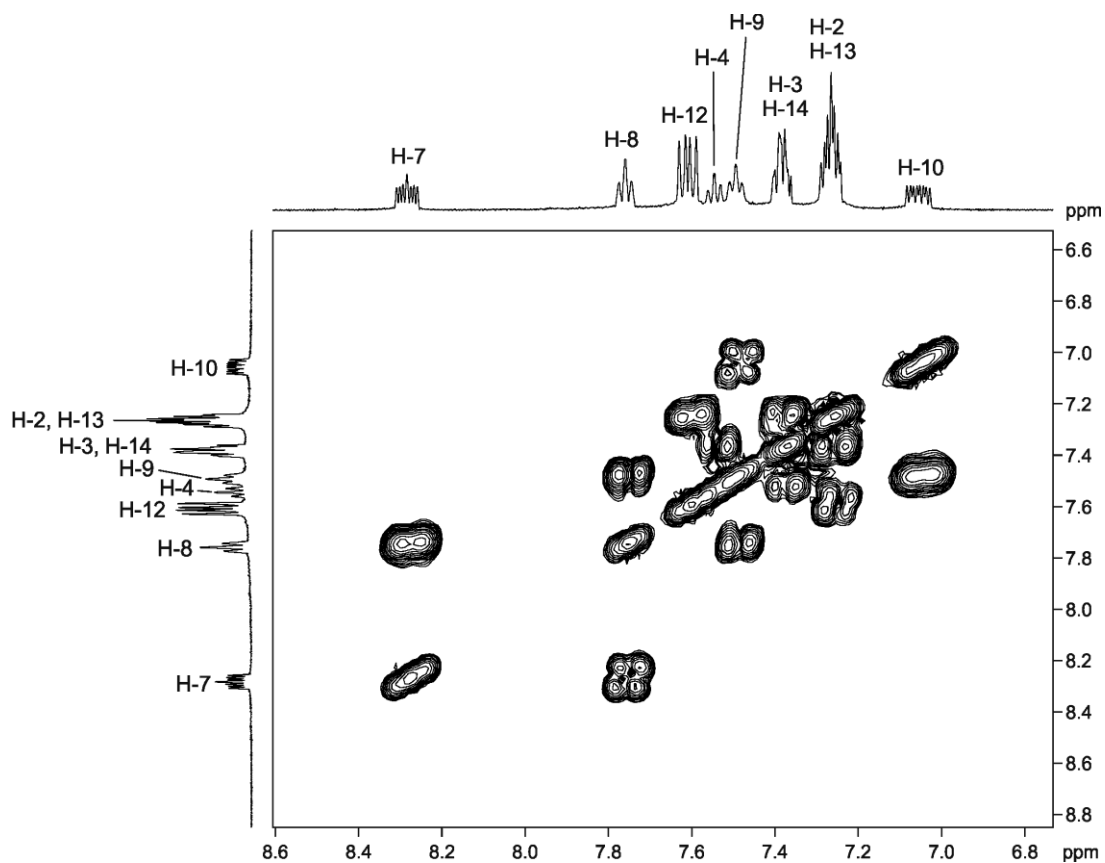


Fig. S15. ^1H COSY NMR spectrum (500 MHz) for ligand **3** in MeOD at $20\text{ }^\circ\text{C}$.

IV.BIII.9. Capítulo 6: A novel luminescent optical fibre probe based on immobilized tridentate bis(phosphinic amide)-phosphine oxide for Europium(III) ion aqueous detection *in situ*

A novel luminescent optical fibre probe based on immobilized tridentate bis(phosphinic amide)-phosphine oxide for Europium(III) ion aqueous detection *in situ*

F.J. Sainz-Gonzalo¹, C. Elosua², J.F. Fernández-Sánchez^{1,*}, C. Popovici³, I. Fernández³, F.L. Ortiz³, F. J. Arregui^{2,*}, I. R. Matias², A. Fernández-Gutiérrez¹

¹ *Department of Analytical Chemistry, Faculty of Sciences, University of Granada, Av. Fuentenueva s/n, 18071 Granada, Spain*

² *Public University of Navarre, Department of Electrical and Electronic Engineering, 31006 Pamplona, Spain*

³ *Laboratory of Organic Chemistry, University of Almería, Ctra. Sacramento s/n, 04120 Almería, Spain*

Abstract

A novel optical fibre probe based on a tridentate bis(phosphinic amide)-phosphine oxide $\text{PhPO}(\text{C}_6\text{H}_4\text{POPhN}(\text{CH}(\text{CH}_3)_2)_2)_2$ (ligand **1**) has been developed for the detection of europium(III) ions in water. The dip coating technique was used to deposit the ligand **1** encapsulated on a poly(vinyl chloride) membrane onto an optical fibre. The optimum deposition thickness of the membrane was 284.4 ± 39.8 nm. The sensing mechanism relies on the reaction between europium(III) ion and ligand **1**, which produces a strong luminescent complex of stoichiometry (1:2) with a maximum emission peak around 612 nm. Two different configurations, aerial and aqueous, were tested for measuring the luminescence off-line and on-line, respectively. The proposed probe showed a response time of 92 seconds in the aqueous configuration (*in situ* detection of europium(III) ions in water). The luminescence of the proposed probe displayed a power-law response for the europium(III) concentration in a

broad range of concentrations of at least 5 orders of magnitude, from 10 nM to 1 mM, with a correlation coefficient (R^2) of the fitted curve better than 0.99.

Keywords: Europium(III) ion; Luminescence; Optical fibre; Tridentate bis(phosphinic amide)-phosphine oxide; PVC membrane; Dip coating

* Corresponding author. Tel.: +34 958248409; fax: +34 958243328.

E-mail address: jffernan@ugr.es (J.F. Fernandez-Sanchez), parregui@unavarra.es (F.J. Arregui).

1. Introduction

Europium is one of the rare earth elements (REEs), which is used in anodic rays of televisions and monitor screens, fluorescent lamps, glasses, lasers, catalysts, polished glasses as well as in oil and atomic industries [1]. Diverse REE toxicity tests in animals have demonstrated that they provoke alterations in the reproduction and nervous system; and damage in liver and spleen [2-5].

Furthermore, REEs can cause lung embolisms including cancer in humans with long-term exposures of their dusts or vapours in the working environment. Therefore, the determination of europium has taken special interest in the last years due to its use in many applications in different fields and its possible toxic effects [6].

The most stable oxidation state of europium element is europium(III), which is the target ion to be detected herein. Traditional analytical methods such as spectrophotometry [7], fluorescence [8], inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES) [9], inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) [10], multiple square wave voltammetry (MSWV) [11] and chelation ion chromatography (CIC) with absorbance detection [12] are used for the europium(III) determination in water samples. These methods, although accurate and with low detection limits, require expensive and sophisticated instrumentation as well as complicated and multistep sample preparation and long analysis times, so they are not very appropriate for analysis of a large number of samples. Therefore, the analysis is often limited to laboratory level only. However, the rapid and field detection of europium(III) ions is of tremendous interest in environmental applications.

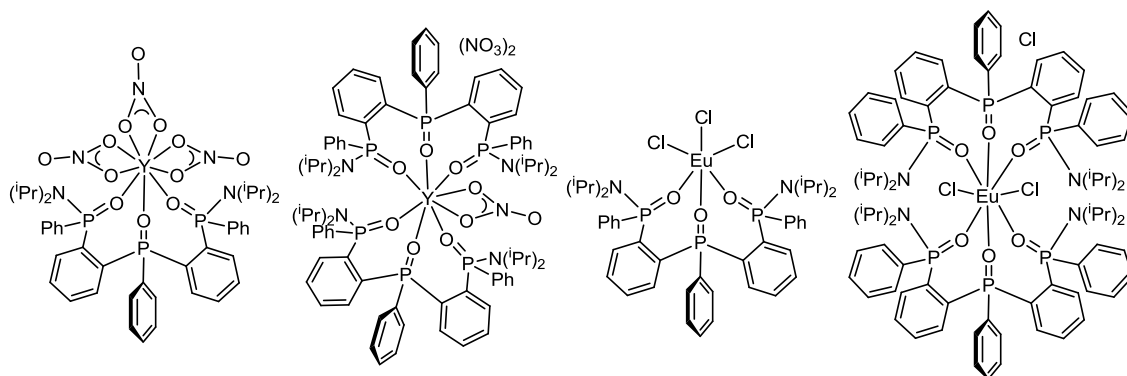
The development of chemical sensors has involved a powerful alternative to the mentioned methods, because chemical sensors minimize these disadvantages and permit on-line, *in situ* and real time monitoring [13-16]. Therefore, the cost-effective and rapid determination of europium(III) has been achieved employing electrochemical [17-21] and optical sensors [22-24].

More specifically, sensors based on optical fibre are attracting considerable attention due to their importance in applications such as environmental monitoring, biomedical sensing and industrial process control [25-28]. Optical fibre sensors present numerous advantages such as passive nature, electromagnetic interference immunity, wide bandwidth and possibility of multiplexing [29], among others. Furthermore, these sensors are small in size, light weight, minimally invasive and allow the remote use [30]. Different configurations can be employed for the fabrication of optical fibre devices [31-33]. The use of thin-film coatings in optical fibre sensors can enhance the sensing properties as well as adding novel functions [34]. These optical fibre chemical sensors are a kind of optical sensors, in which the immobilization of an appropriate reagent is developed in an optomembrane [35]. By choosing the proper membrane and reagent, it is possible the determination of different heavy metal ions [36-39].

In the particular case of europium(III) ion detection, the sensitized 4f-luminescence of lanthanides [40] is a well-known technique, which is widely used for the trace determination of europium(III) ions [23, 24]. Europium(III) ion presents a rich photophysical and coordination chemistry for the formation of luminescent complexes, which show large Stokes shift, long luminescence lifetimes and emission spectra with very narrow bands. The complex (1:2) formed between europium(III) ion and ligand **1** absorbs energy from UV-visible radiation at the characteristic wavelengths of the ligand **1** and emits electromagnetic radiation in the visible region to the characteristic emission wavelengths of europium(III) ion [23]. The observed emission peaks at 586, 612 and 690 nm tally with the europium(III) ion specific transitions [41]. Thus, the ligand **1** could be a good candidate for the development of an optical fibre sensor for europium(III) ion detection. We have recently shown the structural insights of the species established when mixing ligand **1** with yttrium [42] and europium precursors [23] (Scheme 1).

With respect to the immobilization of the reagent, polymer inclusion membranes (PIMs) could be used for entrapping the ligand **1**. PIMs are synthetic membranes in which the ligand is immobilized inside a polymeric matrix with the presence of a plasticizer. The nature of the

immobilized ligand, plasticizers and ionic additives employed has significant influence on the sensitivity and selectivity of PIMs [43, 44]. They offer numerous advantages as effective reagent immobilization, easy preparation, versatility and good mechanical properties, which have been used previously for the determination of europium(III) ions [18, 19, 23, 24].



Scheme 1. Yttrium and europium complexes based on ligand **1**.

This paper describes the development and optimization of a luminescent optical fibre probe for detecting europium(III) ions in situ and in water. Thus, the proposed sensor combines the advantages of optical sensors and the excellent properties of optical fibres with the sensitized luminescence of lanthanides including the great characteristics of polymer inclusion membranes. To our knowledge, this is the first time that a luminescent optical fibre probe has been developed for europium(III) ion, which has proven to have a great potential to be assembled into a portable, simple and cheap optical sensor for Eu(III) ion monitoring.

2. Experimental

2.1. Chemicals and reagents

Ligand **1** was prepared according to the synthesis procedure reported previously [23, 45]. Its schematic chemical structure is shown in Fig. 1. Europium(III) chloride hexahydrate (99.9% Eu, REO) was obtained from ABCR. Poly(vinyl chloride) high molecular weight (PVC) was purchased from Fluka. Bis(2-ethylhexyl) sebacate (DOS) was obtained from Aldrich. Tetrahydrofuran (THF) was obtained from Merck. Potassium hydrogen phthalate, absolute ethanol, concentrated sulphuric acid and hydrogen peroxide were purchased from

Panreac. All chemicals and reagents were of analytical grade except for DOS (reagent grade) and were used as received without further purification.

Aqueous solutions were prepared using doubly distilled water obtained from a Nanopure Analytical Barnstead system (Barnstead International, Dubuque, USA). A stock Eu(III) solution (1.0×10^{-2} M) was prepared by dissolving 0.0916 g of $\text{EuCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ in 25 mL of deionised water. Working standard solutions of Eu(III) were prepared by appropriate dilution of the stock solution. Stock and working standard solutions of Eu(III) ions were stored in amber glass bottles at 4 °C. A stock hydrogen phthalate buffer solution (0.1 M) at pH 5.0 was prepared as follows: 4.085 g of potassium hydrogen phthalate (0.2 M) were dissolved in 100 mL of deionised water. Next, this obtained solution was adjusted with NaOH 1 M until pH was 5.0. Finally, it was diluted to a volume of 200 mL with deionised water. Working standard buffer solutions were prepared by appropriate dilution of the stock buffer solution before mentioned. Measurement solutions were prepared mixing the working standard solutions of Eu(III) ions and the stock hydrogen phthalate buffer solution in the adequate proportion, and subsequently, filling up with deionised water. The piranha solution (3:1) was prepared immediately before its use mixing 2.55 mL of sulphuric acid 98% (w/w) and 0.85 mL of hydrogen peroxide 30% (w/v), respectively.

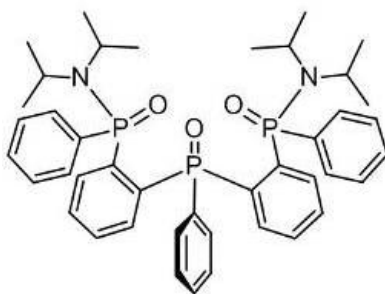


Fig. 1. Schematic chemical structure of the tridentate bis(phosphinic amide)-phosphine oxide PhPO (ligand 1).

2.2. Instrumentation and apparatus

A Leica DM2500 microscope (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) interfaced with a computer was used for visualizing the images of the optical fibres. The deposition thickness on optical fibres was measured by scanning electron microscopy (SEM) using a Carl Zeiss

FE-SEM Ultra Plus microscope (Carl Zeiss Microscopy, USA). A Crison GLP 22 pH meter (Crison, Alella, Spain) was used to adjust the pH of the stock buffer solution.

A Nadetech ND-R rotating dip coater (Nadetech Innovations, Pamplona, Spain) was employed for the deposition of homogeneous and thin films on optical fibre by dip coating technique. Ika MS3 digital mechanical stirrer (Ika Works, Wilmington, USA) was used to obtain the membrane cocktail solution.

2.3. Experimental set-up

A schematic diagram of the experimental set-up for probe response monitoring is depicted in Fig. 2. Two arrangements of the experimental set-up were employed for measuring luminescence intensity in different configurations: aerial (Fig. 2a) and aqueous (Fig. 2b).

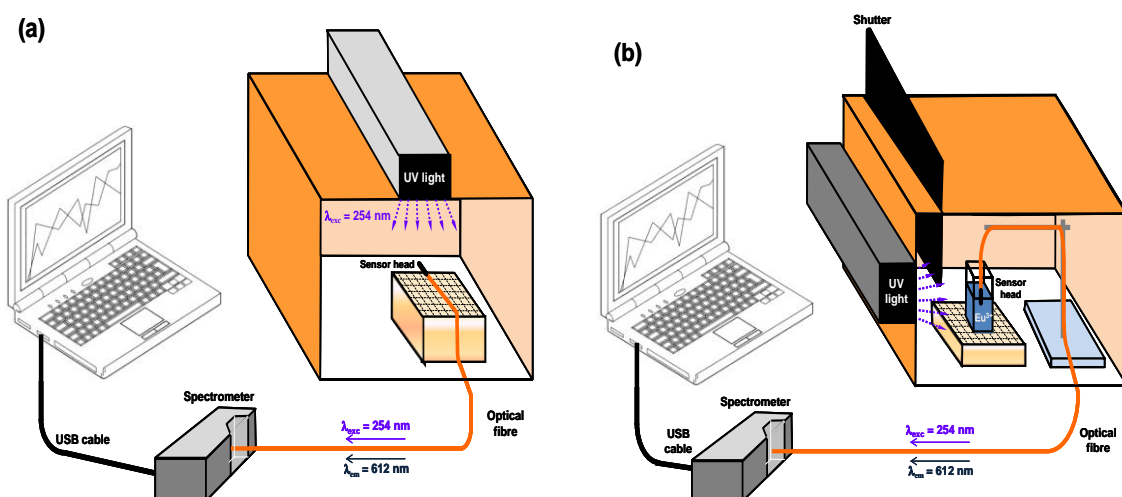


Fig. 2. Experimental set-up for monitoring luminescence intensity in: (a) aerial and (b) solution.

A Vilber Lourmat VL-6.MC filtered lamp (Vilber Lourmat, Marne-la-Vallée, France) with a 6 W tube at a centred wavelength of 254 nm was used as light source. Its intensity at 15 cm is $400 \mu\text{W}/\text{cm}^2$. An Ocean Optics USB2000-FLG miniature fibre-optic spectrometer (Ocean Optics, USA) was used to monitor the luminescent spectra. Multimode plastic-clad silica optical fibres (OFS, Norcross, USA) with core/cladding diameters of 200/230 μm were used to collect light from the detection zone to the spectrometer. The components of the experimental set-up were placed inside a black box to minimize any interference from ambient light. The light was launched from the filtered lamp through air or air/quartz/solution

interfaces and excited the formed complex between europium(III) ion and immobilized ligand **1** on the optical fibre end (see Fig. 2a and 2b). Both europium(III) luminescent emission and excitation signals travelled crossing the optical fibre until reaching the spectrometer.

For aerial measurements, the optical fibre probe was placed on a solid support in a predetermined and fixed position. Thus, the capture of luminescence signal was optimized in this configuration. For aqueous measurements, the optical fibre probe was introduced perpendicularly to the light source in a precision cell which contained the analysis solution. The Hellma 6030-UV quartz precision cell (Hellma, Jamaica, USA) with light path of 10.0 mm was employed for measuring luminescence intensities in solution and was placed on a cell holder next to the light source to optimize the collection of luminescence.

2.4. Optical fibre probe preparation

The membrane cocktail was prepared mixing thoroughly 89 mg of PVC, 174 mg of DOS (plasticizer), 4 mg of ligand **1** and 4.0 mL of THF in a glass vial [23]. The obtained mixture was stirred continuously with the mentioned mechanical stirrer until its complete dissolution. Once the membrane cocktail was prepared, it was always kept in refrigerator until its immediate use.

The optical fibre was cut perpendicularly at one end using a Fujikura CT-20-12 precision fibre cleaver. Then, a 2 cm long part of the optical fibre cladding was removed. Finally, the optical fibre was cleaned with absolute ethanol for eliminating dirtiness and impurities. After these treatments, the optical fibre was already prepared for the deposition process.

The used technique for the deposition of thin films on optical fibre was dip coating, which has been successfully employed in optical fibre sensor development [30, 46, 47]. The summarized deposition process is described as follows: the prepared optical fibre was placed on the previously mentioned dip coater. Then, the optical fibre was dipped into the membrane cocktail for at least 1 second and pulled out at a fixed speed of 11 mm/s using the dip coater. Next, the optical fibre coated with one layer was introduced into an oven at 80 °C for 15 minutes for a thermal curing process [30, 48], followed by 5 minutes of cooling at room temperature. This process was repeated until reaching the desired number of layers. Finally, the probes were stored in a closed recipient at room temperature until its use. A picture of the optical fibre probe is shown in Fig. 3.

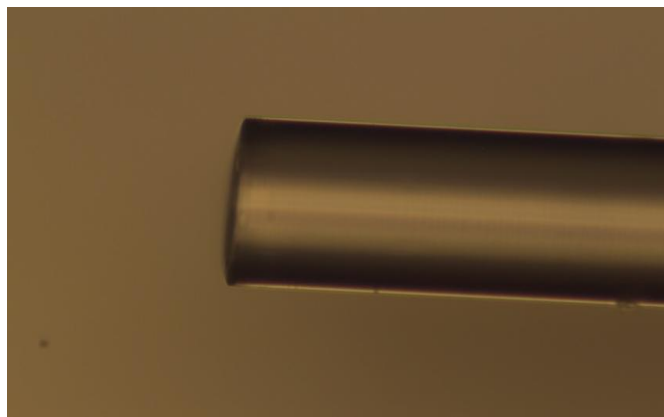


Fig. 3. Zoomed image of an optical fibre probe with five deposited layers.

2.5. Reaction procedure

In order to study the behaviour of the probe under different condition sets, two different configurations were tested: the aerial and aqueous set-ups. The first configuration is intended for studying the performance of the probe when it is necessary to make the measurements in a dry configuration. In this configuration, the probe is dipped into the solution to be measured and, once extracted from the liquid, is left to dry and then, the measurement can be performed. This configuration is intended for off-line measurements. The other set-up, the aqueous configuration, is intended for studying the performance of the probe in on-line measurements, which can be more demanding.

For the aerial measurements, in order to take a baseline, the optical fibre probe was first immersed in 15 mL of blank solution (25 mM hydrogen phthalate buffer solution at pH 5.0) for 10 minutes [23]. The blank solution contained the same chemical composition than the standard solution excepting for europium(III) ion. Thereafter, the optical fibre probe was dried at room temperature for 2 minutes before its luminescence was measured. Subsequently, it was gradually immersed in 15 mL of different europium(III) standard solutions (from 10^{-8} to 10^{-3} M Eu^{3+} in 25 mM hydrogen phthalate buffer solution at pH 5.0) for 10 minutes and dried again for 2 minutes before each luminescence measurement was performed with the experimental set-up of Fig. 2a.

For the aqueous measurements, in order to take a baseline, the optical fibre probe was immersed in the quartz precision cell containing 3.8 mL of blank solution (25 mM hydrogen phthalate buffer solution at pH 5.0) for 10 minutes and the luminescence was measured with the setup depicted in Fig. 2b. Subsequently, it was gradually immersed in 3.8 mL of different

europium(III) standard solutions (from 10^{-8} to 10^{-3} M Eu^{3+} in 25 mM hydrogen phthalate buffer solution at pH 5.0) for 10 minutes and the luminescence was measured for each one of the different europium(III) standard solutions.

2.6. Luminescence measurements

The luminescence measurements of the optical fibre probe in both configurations were performed at $\lambda_{\text{exc/em}} = 254/612$ nm, which tallied with the wavelength provided by light source and the maximum emission wavelength of europium(III) ion in the luminescent complex formed on optical fibre, respectively. The optical fibre probe response was considered as the difference between the luminescence intensity of the probe immersed in standard solution and the luminescence intensity of the probe immersed in blank solution. As it was commented before, the blank solution had the same chemical composition than the standard solution excepting for europium(III) ions. The integration times and averages for measuring luminescence intensities were selected in both cases in order to obtain the most meaningful luminescent intensities and show the sharpest spectra. It is important to remark that once the device has been exposed to a given concentration of europium(III) ions, due to the irreversible nature of the chemical reaction that produces the complex formed between europium(III) ion and ligand **1**, the probe cannot be used to measure lower concentrations of europium(III) ions. Due to this fact, in all the experiments described in this work, freshly prepared probes were used.

3. Results and discussion

3.1. Spectral characterization

The emission spectra of the optimized optical fibre probe in aerial configuration at three different stages of the experiment are shown in Fig. 4. The initial signal curve (green solid line), which is the signal collected from the fresh probe before the dipping into any solution, and the signal measured after the immersion into the buffer solution without any traces of europium ions (red dashed line) are similar.

As can be seen in Fig. 4, the difference between these two curves is negligible, which demonstrates that the probe is insensitive to the hydrogen phthalate buffer solution. On the other hand, after the immersion in $100 \mu\text{M}$ Eu^{3+} solution, it can be observed in Fig. 4 the

appearance of three emission peaks which tally with the characteristic line-type bands of europium(III) ion (blue solid line). These emission bands belong to the permitted transitions of europium(III) ion in luminescent complexes [41]. The emission spectrum of europium(III) ion forming the luminescent complex (1:2) with ligand **1** on optical fibre was very similar to that obtained following the reaction in solution [23]. In fact, the maximum emission peak wavelength (612 nm) is very close to the peak wavelength obtained in solution for this luminescent complex (618 nm) as reported previously [23]. From the three observed emission peaks, the highest emission peak (612 nm) was selected for detecting europium(III) ions in aqueous solution.

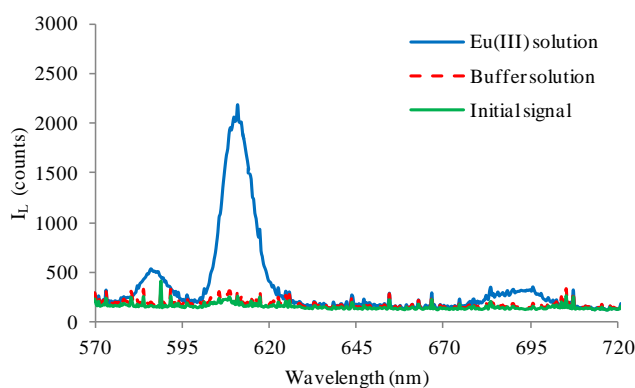


Fig. 4. Luminescence spectra from an optimized optical fibre probe of five layers in aerial configuration before dipping into any solution (solid green line), after immersion into 25 mM hydrogen phthalate buffer solution at pH 5.0 (dashed red line) and after dipping in 1.0×10^{-4} M Eu^{3+} 25 mM hydrogen phthalate buffer solution at pH 5.0 (solid blue line).

3.2. Number of layers and coating thickness

In order to optimize the response of the sensing coatings, the influence of the number of deposited layers on the luminescence signal was investigated. The results are plotted in Fig. 5. As can be seen, the luminescence intensity increased with number of layers (1-4), then it underwent a considerable rise with 5 deposited layers and finally, it decreased slightly after 6 layers. Therefore, the selected number of the deposited layers on optical fibre for the experiments was five.

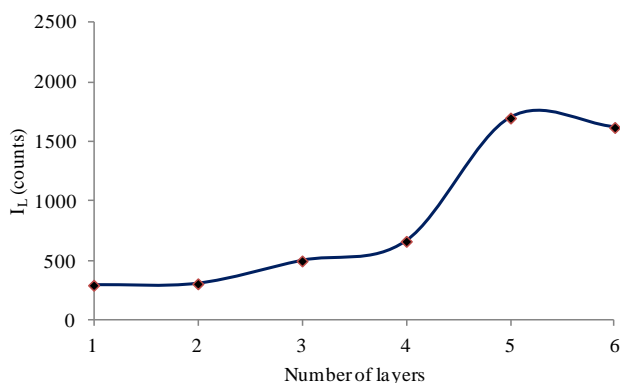


Fig. 5. Luminescence intensity of the optical fibre probe versus the number of deposited layers after dipping in the europium(III) solution (aerial configuration). $[\text{Eu}^{3+}] = 1.0 \times 10^{-4} \text{ M}$, integration time of 1500 ms and an average of 4.

The deposition thickness was measured by image processing of captures of probe heads from the scanning electron microscope described in section 2.2. The pull out speed was fixed at 11 mm/s in all the depositions. Three probe heads were used to calculate the error. The estimated thickness of five layers deposited on optical fibre was $284.4 \pm 39.8 \text{ nm}$ (95% confidence).

3.3. Analytical characteristics

3.3.1. Calibration curve in the aerial configuration

The probe response for off-line measurements, which were performed in a dry configuration, was studied and Fig. 6 shows the luminescent intensity of the probe for different europium(III) concentrations. It is remarkable to notice that the probe response follows a power-law curve versus concentration of europium(III) ions over a wide concentration range, from 10 nM to 1 mM (5 orders of magnitude) with a high correlation coefficient $R^2 = 0.9995$.

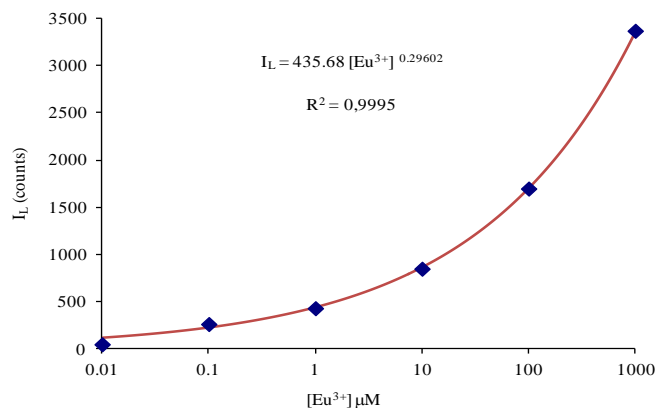


Fig. 6. Calibration graph of the europium(III) optical fibre probe in the aerial configuration. $\lambda_{em}=612$ nm, integration time of 1500 ms and an average of 4.

3.3.2. Calibration curve in the aqueous configuration

The probe response for the development of on-line measurements in liquid samples was investigated. The aqueous configuration was arranged to test the device and the obtained results are plotted in Fig. 7.

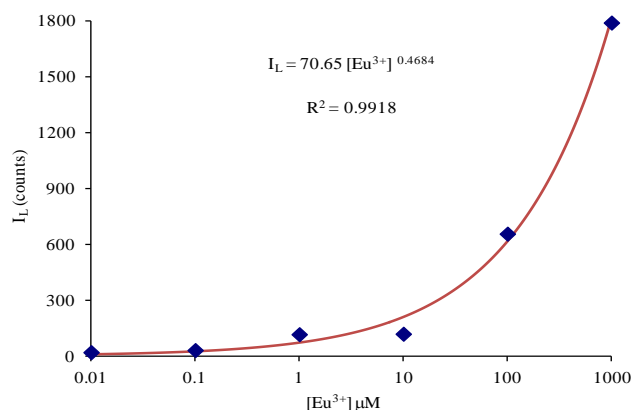


Fig. 7. Calibration graph of the europium(III) optical fibre probe in the aqueous configuration. $\lambda_{em}=612$ nm, integration time of 5000 ms and an average of 3.

In this situation the probe response also shows a power-law curve versus concentration of europium(III) ions over the same concentration range, from 10 nM to 1 mM (5 orders of magnitude) with a high correlation coefficient as well, $R^2 = 0.9918$, which opens the possibility of having an alarm sensor for the detection of europium(III) ions in environmental samples (river, lake, tap water, etc.), where its concentrations are in that range.

Once it has been experimentally proved that these probes can be used for on-line measurements, the response time was also studied. Fig. 8 shows the dynamic response of the optical fibre probe versus time when it was immersed in 100 μM europium(III) solution.

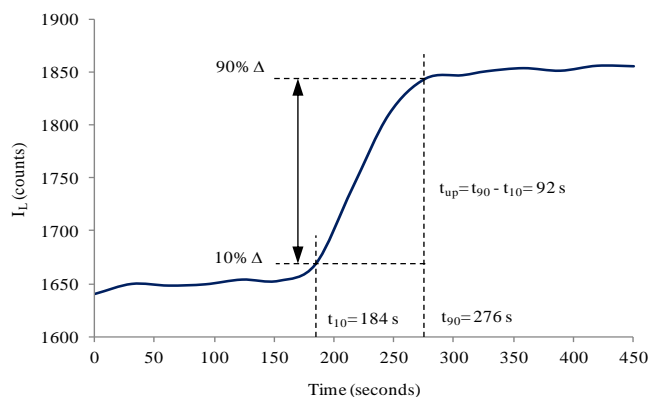


Fig. 8. Dynamic response of the europium(III) probe for the aqueous configuration. $[\text{Eu}^{3+}] = 1.0 \times 10^{-4} \text{ M}$ in 25 mM hydrogen phthalate buffer solution at pH 5.0. The measurements were performed integrating the luminescence intensity between 605 and 615 nm using a measurement interval of 30 seconds, an integration time of 10000 ms and no average.

It was observed that the luminescence intensity initially stayed constant, then it increased with increasing reaction time and finally, it remained stable with time. A response time of 92 seconds was observed.

4. Conclusions

This work experimentally demonstrates that a luminescent optical fibre probe based on ligand **1** immobilized on a PVC membrane can be used for detecting europium(III) ions in water. Dip coating technique was utilized to deposit ligand **1** on optical fibre. The optimum number of deposited layers was five and its estimated thickness was $284.4 \pm 39.8 \text{ nm}$. The luminescence measurements of the formed complex on optical fibre were performed at $\lambda_{\text{exc/em}} = 254/612 \text{ nm}$. Two experimental set-up configurations (aerial and in solution) were employed to measure luminescence intensities. The luminescence probe showed a power-law behavior versus concentration of europium(III) ions over an extent concentration range, from 10 nM to 1 mM, and a response time shorter than 2 minutes.

The proposed optode is the first luminescent optical fibre probe for detecting europium(III) ions in water described in the literature. The development of this type of probe is a simple and promising alternative for environmental monitoring, especially in contaminated and hazardous places. The probe is small, simple, easily prepared, stable, and of low-cost; and it could be used as an alarm type sensor for detecting the presence of europium(III) ions in water.

Efforts are on-going in our laboratory towards improving the reversibility of our new systems, and studying it in the presence of more lanthanides than those used herein.

Acknowledgements

The Regional Government of Andalusia (Excellence projects P07-FQM-2625 and P07-FQM-2738) and the Spanish Ministry of Science and Innovation and FEDER program (Projects 2008-01394, 2008-0117, TEC2010-17085 and TEC2010-20224-C02-01) are thanked for the financial support of this work. The authors also acknowledge to FIDENA for the use of the scanning electron microscope and Dr. Carlos Ruiz-Zamarreño for his help in the coating thickness measurements.

References

- [1] S. Pandya, J. Yu, D. Parker, Engineering emissive europium and terbium complexes for molecular imaging and sensing, *Dalton Transactions* (2006) 2757-2766.
- [2] Y. Nakamura, Y. Tsumura, Y. Tonogai, T. Shibata, Y. Ito, Differences in behavior among the chlorides of seven rare earth elements administered intravenously to rats, *Fundamental and Applied Toxicology* 37 (1997) 106-116.
- [3] S. Brambilla, S. Valaperta, G. Graziani, A. Montanelli, Gadolinium and lanthanum: A iatrogenic transmetallation?, *Clinical Biochemistry* 41 (2008) 1029-1033.
- [4] H. Zhang, J. Feng, W.F. Zhu, C.Q. Liu, S.Q. Xu, P.P. Shao, D.S. Wu, W.J. Yang, J.H. Gu, Chronic toxicity of rare-earth elements on human beings - Implications of blood biochemical indices in REE-high regions, South Jiangxi, *Biological Trace Element Research* 73 (2000) 1-17.
- [5] S. Zaichick, V. Zaichick, V. Karandashev, S. Nosenko, Accumulation of rare earth elements in human bone within the lifespan, *Metallomics* 3 186-194.

- [6] Y. Suzuki, T. Suzuki, N. Furuta, Determination of Rare Earth Elements (REEs) in Airborne Particulate Matter (APM) Collected in Tokyo, Japan, and a Positive Anomaly of Europium and Terbium, *Analytical Sciences* 26 (2010) 929-935.
- [7] S. Liawruangrath, S. Sakulkaemaruethai, Flow injection spectrophotometric determination of europium using chlortetracycline, *Talanta* 59 (2003) 9-18.
- [8] N. Arnaud, J. Georges, Fluorimetric determination of europium over a large dynamic range using its ternary complex with thenoyltrifluoroacetone and trioctylphosphine oxide in a micellar solution of triton X-100, *Analyst* 122 (1997) 143-146.
- [9] C. Huang, Z. Jiang, B. Hu, Mesoporous titanium dioxide as a novel solid-phase extraction material for flow injection micro-column preconcentration on-line coupled with ICP-OES determination of trace metals in environmental samples, *Talanta* 73 (2007) 274-281.
- [10] C. Karadas, D. Kara, A. Fisher, Determination of rare earth elements in seawater by inductively coupled plasma mass spectrometry with off-line column preconcentration using 2,6-diacetylpyridine functionalized Amberlite XAD-4, *Analytica Chimica Acta* 689 (2011) 184-189.
- [11] L.M. Moretto, J. Chevalet, G.A. Mazzocchin, P. Ugo, Advances in multiple square wave techniques for ion-exchange voltammetry at ultratrace levels: the europium(III) case, *Journal of Electroanalytical Chemistry* 498 (2001) 117-126.
- [12] C.-Y. Liu, N.M. Lee, T.-H. Wang, Chelation ion chromatography as a technique for trace elemental analysis in complex matrix samples, *Analytica Chimica Acta* 337 (1997) 173-182.
- [13] J.F. Fernandez-Sanchez, I. Fernandez, R. Steiger, R. Beer, R. Cannas, U.E. Spichiger-Keller, Second-generation nanostructured metal oxide matrices to increase the thermal stability of CO and NO(2) sensing layers based on iron(II) phthalocyanine, *Advanced Functional Materials* 17 (2007) 1188-1198.
- [14] A.L. Medina-Castillo, J.F. Fernandez-Sanchez, A. Fernandez-Gutierrez, One-Step Fabrication of Multifunctional Core-Shell Fibres by Co-Electrospinning, *Advanced Functional Materials* 21 (2011) 3488-3495.
- [15] A.L. Medina-Castillo, J.F. Fernandez-Sanchez, A. Segura-Carretero, A. Fernandez-Gutierrez, A semi-empirical model to simplify the synthesis of homogeneous and

- transparent cross-linked polymers and their application in the preparation of optical sensing films, *Biosensors & Bioelectronics* 25 (2009) 442-449.
- [16] A.L. Medina-Castillo, G. Mistlberger, J.F. Fernandez-Sanchez, A. Segura-Carretero, I. Klimant, A. Fernandez-Gutierrez, Novel Strategy To Design Magnetic, Molecular Imprinted Polymers with Well-Controlled Structure for the Application in Optical Sensors, *Macromolecules* 43 (2010) 55-61.
- [17] M.R. Ganjali, P. Norouzi, A. Daftari, F. Faridbod, M. Salavati-Niasari, Fabrication of a highly selective Eu(III) membrane sensor based on a new S-N hexadentates Schiff's base, *Sensors and Actuators B-Chemical* 120 (2007) 673-678.
- [18] H.A. Zamani, G. Rajabzadeh, M.R. Ganjali, A New Europium(III) PVC Membrane Potentiometric Sensor Based on 4-(2-Hydroxybenzylideneamino)-6-methyl-3-thioxo-3,4-dihydro-1,2,4-triazin-5(2H)-one, *Bulletin of the Chemical Society of Japan* 80 (2007) 172-177.
- [19] M.R. Ganjali, N. Davarkhah, H. Ganjali, B. Larijani, P. Norouzi, M. Hossieni, A Novel Europium(III) Sensor Based on 4E-4-(2-phenylviazenyl)-2-((E)-(2-aminoethylimino)methyl)phenol, *International Journal of Electrochemical Science* 4 (2009) 762-771.
- [20] S. Tyagi, H. Agarwal, S. Ikram, A dynamic electrochemical sensor for europium(III), *Indian Journal of Chemistry Section a-Inorganic Bio-Inorganic Physical Theoretical & Analytical Chemistry* 49 (2010) 1325-1331.
- [21] X. Ma, Z. Xu, H. Yuan, Y. He, D. Xiao, M.M.F. Choi, High-sensitive and selective Eu(3+) electrochemical sensor based on LaB(6) electrode and sodium dodecylbenzene sulfonate, *Sensors and Actuators B-Chemical* 147 (2010) 152-158.
- [22] M.R. Ganjali, M. Hosseini, M. Hariri, P. Norouzi, A.A. Khandar, A. Bakhtiari, Highly selective ratiometric fluorescence determination of Eu³⁺ ion based on (4E)-4-(2-phenyldiazenyl)-2-((E)-(2-aminoethylimino)methyl)phenol, *Materials Science and Engineering: C* 30 (2010) 929-933.
- [23] F.J. Sainz-Gonzalo, M. Casimiro, C. Popovici, A. Rodríguez-Diéguez, J.F. Fernández-Sánchez, I. Fernández, F.L. Ortiz, A. Fernández-Gutiérrez, Development of polymeric sensing films based on a tridentate bis(phosphinic amide)-phosphine oxide for determining Europium(III) in water, *Dalton Transactions* (submitted) (2012).

- [24] F.J. Sainz-Gonzalo, C. Popovici, M. Casimiro, J.F. Fernandez-Sanchez, I. Fernández, F.L. Ortiz, A. Fernández-Gutiérrez, A novel tridentate bis(phosphinic acid)-phosphine oxide based Europium(III)-selective Nafion membrane luminescent sensor, *Analytica Chimica Acta* (submitted) (2012).
- [25] H. Filik, D. Aksu, R. Apak, I. Sener, E. Kilic, An optical fibre reflectance sensor for p-aminophenol determination based on tetrahydroxycalix[4]arene as sensing reagent, *Sensors and Actuators B: Chemical* 136 (2009) 105-112.
- [26] T. Le, S. Tao, Intrinsic UV absorption spectrometry observed with a liquid core waveguide as a sensor technique for monitoring ozone in water, *Analyst* 136 (2011) 3335-3342.
- [27] Nuriman, B. Kuswandi, W. Verboom, Optical fiber chemical sensing of Hg(II) ions in aqueous samples using a microfluidic device containing a selective tripodal chromoionophore-PVC film, *Sensors and Actuators B: Chemical* 157 (2011) 438-443.
- [28] H.-H. Zeng, R.B. Thompson, B.P. Maliwal, G.R. Fones, J.W. Moffett, C.A. Fierke, Real-Time Determination of Picomolar Free Cu(II) in Seawater Using a Fluorescence-Based Fiber Optic Biosensor, *Analytical Chemistry* 75 (2003) 6807-6812.
- [29] S. Diaz, G. Lasheras, M. Lopez-Amo, P. Urquhart, C. Jauregui, J.M. Lopez-Higuera, Wavelength-division-multiplexed distributed fiber Raman amplifier bus network for sensors, *Proc. SPIE* 5855 (2005) 242-245.
- [30] C. Elosua, C. Bariain, I.R. Matias, A. Rodriguez, E. Colacio, A. Salinas-Castillo, A. Segura-Carretero, A. Fernandez-Gutierrez, Pyridine vapors detection by an optical fibre sensor, *Sensors* 8 (2008) 847-859.
- [31] J.M. Corres, I.R. Matias, I. del Villar, F.J. Arregui, Design of pH sensors in long-period fiber gratings using polymeric nanocoatings, *IEEE Sensors Journal* 7 (2007) 455-463.
- [32] J. Goicoechea, C.R. Zamarreno, I.R. Matias, F.J. Arregui, Utilization of white light interferometry in pH sensing applications by mean of the fabrication of nanostructured cavities, *Sensors and Actuators B-Chemical* 138 (2009) 613-618.
- [33] C.R. Zamarreno, J. Bravo, J. Goicoechea, I.R. Matias, F.J. Arregui, Response time enhancement of pH sensing films by means of hydrophilic nanostructured coatings, *Sensors and Actuators B-Chemical* 128 (2007) 138-144.

- [34] F.J. Arregui, I.R. Matías, J. Goicoechea, I. Del Villar, Optical fiber sensors based on nanostructured materials, in: F.J. Arregui (Ed.), Springer, Berlín, Heilderberg, 2009, p. 275-301.
- [35] A. Dybko, W. Wroblewski, J. Maciejewski, R. Romaniuk, Z. Brzozka, Efficient reagent immobilization procedure for ion-sensitive optomembranes, *Sensors and Actuators B: Chemical* 39 (1997) 207-211.
- [36] N.W. Hayes, C.J. Tremlett, P.J. Melfi, J.D. Sessler, A.M. Shaw, Uranyl-specific binding at a functionalised interface: a chemophotonic fibre optic sensor platform, *Analyst* 133 (2008) 616-620.
- [37] F. Long, C. Gao, H.C. Shi, M. He, A.N. Zhu, A.M. Klibanov, A.Z. Gu, Reusable evanescent wave DNA biosensor for rapid, highly sensitive, and selective detection of mercury ions, *Biosensors & Bioelectronics* 26 (2011) 4018-4023.
- [38] S.-M. Ng, R. Narayanaswamy, Demonstration of a simple, economical and practical technique utilising an imprinted polymer for metal ion sensing, *Microchimica Acta* 169 (2010) 303-311.
- [39] A. Nur, Development of a new fluorescent sensor based on a triazolo-thiadiazin derivative immobilized in polyvinyl chloride membrane for sensitive detection of lead(II) ions, *Sensors and Actuators B: Chemical* 157 (2011) 162-168.
- [40] A. Thibon, V. Pierre, Principles of responsive lanthanide-based luminescent probes for cellular imaging, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 394 (2009) 107-120.
- [41] F.S. Richardson, Terbium(III) and europium(III) ions as luminescent probes and stains for biomolecular systems, *Chemical Reviews* 82 (1982) 541-552.
- [42] C. Popovici, I. Fernandez, P. Ona-Burgos, L. Rocas, S. Garcia-Granda, F.L. Ortiz, Synthesis and structure of tridentate bis(phosphinic amide)-phosphine oxide complexes of yttrium nitrate. Applications of $(^{31}\text{P}, ^{89}\text{Y})$ NMR methods in structural elucidation in solution, *Dalton Transactions* 40 (2011) 6691-6703.
- [43] M.R. Ganjali, F.S. Mirnaghi, P. Norouzi, M. Adib, Novel Pr(III)-selective membrane sensor based on a new hydrazide derivative, *Sensors and Actuators B: Chemical* 115 (2006) 374-378.
- [44] H.A. Zamani, A. Imani, A. Arvinfar, F. Rahimi, M.R. Ganjali, F. Faridbod, S. Meghdadi, Neodymium(III)-PVC membrane sensor based on a new four dentate ionophore, *Materials Science and Engineering: C* 31 (2011) 588-592.

- [45] C. Popovici, I. Fernandez, P. Ona-Burgos, L. Roces, S. Garcia-Granda, F. Lopez Ortiz, Synthesis and structure of tridentate bis(phosphinic amide)-phosphine oxide complexes of yttrium nitrate. Applications of $(^{31}\text{P},^{89}\text{Y})$ NMR methods in structural elucidation in solution, *Dalton Transactions* 40 (2011) 6691-6703.
- [46] C. Bariain, I.R. Matias, C. Fernandez-Valdivielso, F.J. Arregui, M.L. Rodriguez-Mendez, J.A. de Saja, Optical fiber sensor based on lutetium bisphthalocyanine for the detection of gases using standard telecommunication wavelengths, *Sensors and Actuators B-Chemical* 93 (2003) 153-158.
- [47] C. Bariain, I.R. Matias, C. Fdez-Valdivielso, C. Elosua, A. Luquin, J. Garrido, M. Laguna, Optical fibre sensors based on vapochromic gold complexes for environmental applications, *Sensors and Actuators B-Chemical* 108 (2005) 535-541.
- [48] F.J. Arregui, M. Otano, C. Fernandez-Valdivielso, I.R. Matias, An experimental study about the utilization of Liquicoat (R) solutions for the fabrication of pH optical fiber sensors, *Sensors and Actuators B-Chemical* 87 (2002) 289-295.

Biographies

F.J. Sainz-Gonzalo obtained his BS degree in chemistry in 2001 from the University of La Rioja (Logroño, Spain). He received his MS degree in analytical chemistry from the same University in 2004. He is currently working towards the PhD degree in the University of Granada (Granada, Spain) about the development of optical sensor phases for the quality control of waters and wines. His research is based on characterizing polymeric membranes, sol-gel glasses and molecularly imprinted polymers as sensor phases to develop luminescent (bio)chemical sensors. His research interests include the nanostructured and sensor materials for developing optochemical sensors for analytical applications.

Cesar Elosua received his MS degree in electrical and electronic engineering from the Public University of Navarra in 2004. In the same year, he obtained a scholarship from the Science and Technology Spanish Ministry and he joined the optical fiber sensor group at the Department of Electrical and Electronic Engineering of the UPNA. During 2008, he was a visiting Ph.D. student at the University of Limerick and at the City University of London, working on Artificial Neural Networks algorithms. He became a lecturer of this department in

2009, receiving his PhD degree in the next year. His research interests include optical fibre sensors and networks, organometallic chemistry and data mining techniques.

Jorge F. Fernandez-Sanchez is Associate Professor in the Department of Analytical Chemistry at the University of Granada. He received his MS (2001) and PhD (2003) in Analytical Chemistry from the University of Granada. Between 2004 and 2006 he was working at the Swiss Federal Institute of Zurich, and since 2006 he is co-heading the optical sensor research line of the Prof. Fernandez-Gutierrez's research group. He has coauthored more than 60 book chapters, journal and conference papers related to optical sensors and nanotechnology applied to the development of optical sensing films.

Cristinel Popovici obtained his BS degree in chemistry in 1996 from the University of Bucarest. He received his MS degree in organic chemistry from the University of Almería in 2009. He is currently working towards the PhD degree in the same University about the use of phosphinamides lithiated at the ortho position as intermediate species towards the synthesis of more complex molecules, metal-based coordination compounds and catalysts.

Ignacio Fernandez is Associate Professor of Organic Chemistry at the University of Almería since 2011. He has been involved in several student exchange programs in the University of Bath (2000) and Würzburg (2001). He obtained his PhD from the University of Almería in 2003. Between 2004 and 2006 and during 2007 he was working at the Swiss Federal Institute of Technology (ETHZ, Switzerland) and in Cornell University (NY, USA), respectively. He has been visiting professor in the Inorganic Department at the Karlsruhe Institute of Technology (KIT, Germany) several times during 2008 and 2010. His current research interests are focused on the applications of multinuclear NMR studies to problems in organometallic chemistry, and development of new synthetic methodologies and metal-based catalysts. He has published over 60 papers in international journals.

Fernando Lopez-Ortiz is Full Professor of Organic Chemistry (1996) at the University of Almería. He received his PhD (1987) in synthetic organic chemistry from the University of Oviedo. He is the director of the research group "Organic and Organometallic Chemistry) and has published over 140 book chapters, journal and conference papers.

Francisco J. Arregui is a Full Professor at the Public University of Navarre (Pamplona, Spain). He was part of the team that fabricated the first optical fiber sensor by means of the layer-by-layer self-assembly method at Virginia Tech (Blacksburg, Va, USA) in 1998. He is the author of around 250 scientific journals and conference publications, most of them related to optical fiber sensors based on nanostructured coatings. Prof. Arregui has been an Associate Editor of the Journals: IEEE Sensors Journal, International Journal on Smart Sensing and Intelligent Systems and Journal of Sensors. He is also the Editor of the book named Sensors Based on Nanostructured Materials. Journal of Sensors was founded in 2007 by Prof. Arregui, who served as the Editor-in-Chief of the journal between 2007 and 2011.

Ignacio R. Matias is a Professor in the Electrical and Electronic Engineering Department at the Public University of Navarra, Spain. He received his MS (1992) and PhD (1996) in electrical and electronic engineering from the Polytechnic University of Madrid. He has coauthored more than 200 book chapters, journal and conference papers related to optical fiber sensors and electronic applications.

Alberto Fernandez-Gutierrez is Full Professor in the Department of Analytical Chemistry at the University of Granada. He founded the Environmental, Biochemical and Foodstuffs Analytical Control research group twenty years ago. Since then, he has been its director. From 1969 to 1974 he was assistant lecturer at the University of Granada, from 1974 to 1982 lecturer at the University of Extremadura, during 1983 guest lecturer at the University of Florida (USA) and in 1984 he returned to the University of Granada as associate professor. He has published over 250 papers in international journals, and about 25 books and chapters of books. He has supervised 17 PhD theses, 37 dissertations and more than 50 research contracts and projects.

IV.BIII.10. *Resumen de resultados del bloque III*

1. Se ha sintetizado y caracterizado un nuevo ligando bis(amida fosfínica) óxido de fosfina tridentado $\text{PhPO}(\text{C}_6\text{H}_4\text{POPhN}(\text{CH}(\text{CH}_3)_2)_2)_2$ (**1**) con el fin de evaluar su potencialidad en el desarrollo de una fase sensora de Eu(III). Los complejos $[\text{Eu}(\mathbf{1})_2]\text{Cl}_3$ (**2**) y $[\text{Eu}(\mathbf{1})]\text{Cl}_3$ (**4**) se sintetizaron a temperatura ambiente utilizando acetonitrilo como disolvente. El complejo 1:1 es el producto de control termodinámico cuando se emplean largos tiempos de reacción y una relación molar 1:1. En ambos complejos de europio, el ligando actúa como quelato tridentado. Diversos estudios han mostrado que los complejos de europio(III) con el ligando **1** poseen estequiometrías 1:1 y 1:2 en disoluciones de acetonitrilo. Las características espectroscópicas y químicas del complejo luminiscente **2** en disolución fueron excelentes indicadores para llevar a cabo la inmovilización del ligando **1** en una membrana polimérica. Se optimizaron la naturaleza y el porcentaje de plastificante así como las concentraciones de ligando **1** y aditivo iónico.
2. Este complejo se ha inmovilizado en una PIM. Los resultados presentados demuestran que se han desarrollado fases sensoras luminiscentes para determinar iones europio(III) en medio acuoso. La composición de la fase sensora óptima fue de 33.4:65.1:1.5 (% m/m) para PVC:DOS:1. Se utilizó una disolución tampón de hidrógeno ftalato, cuya concentración fue 25 mmol L^{-1} , para obtener la máxima señal luminiscente y mantener el pH óptimo de 5 con el fin de analizar muestras acuosas de europio(III). La fase sensora presentó alta selectividad para la determinación de iones europio(III). La fase sensora mostró un tiempo de respuesta corto (10 min) y un intervalo lineal desde 1.6×10^{-7} a $5.0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, con un límite de detección de $4.8 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$.

3. Se ha desarrollado un sensor luminiscente de membrana de Nafion para determinar iones europio(III). Para ello, se sintetizó un nuevo ligando bis(ácido fosfínico) óxido de fosfina y se evaluó como agente sensibilizante, observando el fenómeno de la luminiscencia sensibilizada de lantánidos. Las estequiometrías de los complejos de europio(III)-ligando fueron 1:1 (complejo menos luminiscente) y 1:2 (complejo más luminiscente). Las excelentes propiedades espectroscópicas y químicas del nuevo complejo luminiscente en disolución se emplearon para inmovilizar dicho ligando en membranas de inclusión polimérica. Tanto la naturaleza y el porcentaje de plastificante como las concentraciones de ligando y aditivo iónico se estudiaron para optimizar la composición química del sensor.

El sensor de membrana óptimo tuvo una composición de 262.3:0.6 mg mL⁻¹ para Nafion:Ligando. Se empleó una disolución tampón de acetato, cuya concentración fue 25 mmol L⁻¹, para ajustar el pH de la disolución a 5.0 (pH óptimo), y obtener de este modo, la máxima señal luminiscente para el análisis de muestras acuosas de europio(III). El sensor presentó buena selectividad para la determinación de iones europio(III), aunque se observó una pequeña interferencia positiva de terbio(III). El sensor mostró un tiempo de respuesta muy corto (5 min) y un intervalo lineal desde 1.9×10^{-8} a 5.0×10^{-6} mol L⁻¹, con un límite de detección de 5.8×10^{-9} mol L⁻¹.

4. Se ha desarrollado un optodo luminiscente mediante la inmovilización del ligando PhPO(C₆H₄POPhN(CH(CH₃)₂)₂)₂ (**1**) en una membrana de PVC y su posterior deposición sobre una fibra óptica para la detección de iones europio(III) en agua. Se empleó la técnica de *dip coating* para depositar el ligando **1** sobre la fibra óptica. Las medidas se llevaron a cabo empleando dos configuraciones del montaje experimental (estado seco y en disolución). Las

medidas de luminiscencia del complejo formado sobre la fibra óptica se realizaron a $\lambda_{exc/em} = 254/612$ nm. El optodo propuesto es la primera sonda de fibra óptica luminiscente para detectar iones europio(III) en agua descrito en la literatura, y puede usarse como un sensor de alarma para detectar la presencia de iones europio(III) en medio acuoso.

El número óptimo de capas depositadas fue cinco y su espesor estimado fue 284.4 ± 39.8 nm. La sonda presentó un comportamiento potencial frente a la concentración de iones europio(III) desde 10 nmol L^{-1} hasta 1 mmol L^{-1} y un tiempo de respuesta menor de 2 minutos. La sonda es pequeña, simple, estable, de fácil preparación y bajo coste.

V. CONCLUSIONES GENERALES

V. CONCLUSIONES GENERALES

1. Se ha sintetizado un MIP por la técnica de polimerización en disolución para los compuestos TEXs. La selección del disolvente y las condiciones de polimerización fueron los factores más importantes para su síntesis. El MIP se implementó en un optosensor convencional con detección fluorescente y se optimizaron tanto los parámetros FIA como instrumentales. La eliminación de interferencias se llevó a cabo ajustando las muestras a pH 11.0 y utilizando una disolución portadora de NaCl 1.0 mol L⁻¹. El optosensor se utilizó para desarrollar un test de “screening” de TEXs en aguas de consumo humano, el cual reconoció muestras contaminadas rápidamente y a bajo coste. El test se llevó a cabo sin necesidad de ninguna etapa de pre-concentración, siendo adecuado para utilizarse de forma rutinaria en los laboratorios de control de calidad de aguas y medioambientales. Este test se ha aplicado con éxito en la determinación de TEXs en aguas de consumo humano, y puede ser una importante alternativa a los laboratorios de rutina para reducir el número de muestras, que tienen que ser analizadas por técnicas más caras.

El test de “screening” estableció un valor umbral de 8.27 ± 0.57 u.a. para un nivel de corte de 700 µg L⁻¹ de etilbenceno. La fiabilidad del test mostró un 32% de falsos positivos y un 0% de falsos negativos para un total de 50 muestras. Para demostrar la aplicabilidad del test, se analizaron 15 muestras de agua reales, obteniéndose un 20% de falsos positivos y un 0% de falsos negativos. En todos los casos, el test de “screening” detectó las muestras contaminadas (35 de 65) produciéndose la ausencia de falsos negativos.

2. Este mismo MIP se ha usado para desarrollar un optosensor convencional para la detección de xilenos en muestras de agua. El pequeño volumen de

inyección de muestra permitió la detección selectiva de los tres isómeros de xileno, reduciéndose prácticamente las interferencias producidas por los compuestos de estructura química similar. El optosensor se utilizó para realizar un test de “screening” de xilenos en agua que reconoció muestras contaminadas muy rápidamente (50 s) y a bajo coste. El test se llevó a cabo sin necesidad de ninguna etapa de pre-concentración, siendo apropiado para usarse en los laboratorios de control de calidad de aguas y medioambientales. El test se ha aplicado con éxito en la determinación de xilenos en muestras de agua y puede considerarse una alternativa importante a los laboratorios de rutina para reducir el número de muestras analizadas.

El nivel de corte seleccionado para el test de “screening” fue $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ de *m*-xileno, que proporcionó un valor umbral de 48.9 ± 2.6 u.a. El estudio de la fiabilidad del test estableció un 23% de falsos positivos y un 0% de falsos negativos para un total de 30 muestras. Para demostrar la aplicabilidad del test, se analizaron 9 muestras de agua reales, dando lugar a una ausencia de falsos positivos y falsos negativos. En ambos casos, el porcentaje de falsos negativos fue nulo, puesto que el optosensor detectó todas las muestras contaminadas (19 de 39).

3. Se ha desarrollado una fase sensora fluorescente para la determinación de ácido L-málico en vinos. La reacción enzimática entre L-malato y NAD^+ , catalizada mediante el enzima L-MDH en medio básico, fue suficientemente selectiva para determinar L-malato y particularmente sensible para detectar fluorimétricamente el NADH formado en la fase sensora. La regeneración de la fase sensora se realizó empleando enzima diaforasa y hexacianoferrato(III). Se optimizaron todas las condiciones de reacción y los parámetros que influyen en el proceso sol-gel. El análisis de los vinos tintos se llevó a cabo

mediante el tratamiento previo con polivinilpirrolidona. Los resultados obtenidos con la fase sensora, que determina el contenido de ácido málico en los vinos, son comparables a los obtenidos con un método de referencia corrigiendo el efecto matriz de las muestras. Esta metodología se presenta como una alternativa a la cromatografía en capa fina, que es la técnica más usada en los laboratorios enológicos para determinar ácido málico en vino.

El intervalo dinámico de la fase sensora estuvo comprendido entre 0.1 y 1.0 g L⁻¹ de malato. La fase sensora presentó 6 regeneraciones y mostró una reproducibilidad aceptable [$s_r(\%) \sim 10$] con un tiempo de vida de 25 días. Los tiempos de reacción y regeneración fueron 12 y 8 minutos, respectivamente. La determinación de ácido málico se realizó ajustando el pH de los vinos a 11.

4. Se ha establecido una fase sensora polimérica luminiscente basada en un nuevo ligando bis(amida fosfínica) óxido de fosfina tridentado $\text{PhPO}(\text{C}_6\text{H}_4\text{POPhN}(\text{CH}(\text{CH}_3)_2)_2)_2$ (**1**) para determinar iones europio(III) en agua. La síntesis y caracterización de este nuevo ligando se llevó a cabo para evaluar su potencialidad en el desarrollo de fases sensoras ópticas para Eu(III). Los complejos $[\text{Eu}(\mathbf{1})_2]\text{Cl}_3$ (**2**) y $[\text{Eu}(\mathbf{1})]\text{Cl}_3$ (**4**) se sintetizaron en acetonitrilo a temperatura ambiente. El empleo de una relación molar 1:1 y largos tiempos de reacción proporcionaron el complejo 1:1, siendo éste el producto de control termodinámico. Los estudios realizados han mostrado que los complejos de europio(III) con el ligando **1** poseen estequiometrías 1:1 y 1:2 en disoluciones de acetonitrilo. Las características espectroscópicas y químicas del complejo luminiscente **2** en disolución fueron excelentes indicadores para llevar a cabo la inmovilización del ligando **1** en una membrana polimérica. Se optimizaron los porcentajes de los diferentes componentes que constituyen la fase sensora. La fase sensora desarrollada es una alternativa simple y eficaz a los métodos

analíticos tediosos y caros que ofrece la posibilidad de la monitorización y la determinación de iones europio(III) en medio acuoso.

La composición de la fase sensora óptima fue de 33.4:65.1:1.5 (% m/m) para PVC:DOS:1. Una disolución tampón de hidrógeno ftalato de 25 mmol L⁻¹ se empleó con el fin de mantener el pH de 5.0 (pH óptimo) para llevar a cabo el análisis de muestras acuosas de europio(III). La fase sensora presentó alta selectividad y un tiempo de respuesta corto (10 min). El intervalo lineal fue 1.6×10^{-7} a 5.0×10^{-6} mol L⁻¹ y el límite de detección fue 4.8×10^{-8} mol L⁻¹.

5. Se ha preparado otro sensor luminiscente de membrana de Nafion para la determinación de iones europio(III) en medio acuoso. Para ello, se sintetizó y caracterizó un nuevo ligando bis(ácido fosfínico) óxido de fosfina. Éste se usó como agente sensibilizante, observando el fenómeno de la luminiscencia sensibilizada de lantánidos. Las estequiometrías de los complejos de europio(III)-ligando fueron 1:1 (complejo menos luminiscente) y 1:2 (complejo más luminiscente). Esta fase sensora óptica sensible a europio(III) presenta el límite de detección más bajo publicado en la bibliografía. El sensor desarrollado es una alternativa simple y muy prometedora a los métodos analíticos habitualmente empleados, que ofrece la posibilidad para la monitorización práctica y la determinación de la concentración de iones europio(III) en agua.

Esta fase sensora está compuesta por 262.3:0.6 mg mL⁻¹ de Nafion:Ligando. Una disolución tampón de acetato de 25 mmol L⁻¹ se utilizó para mantener la muestra al pH óptimo (5.0). Esta fase sensora fue bastante selectiva para la determinación de iones europio(III), aunque se observó una pequeña interferencia positiva de iones terbio(III). La membrana sensible

presentó un intervalo lineal desde 1.9×10^{-8} a 5.0×10^{-6} mol L⁻¹, un límite de detección de 5.8×10^{-9} mol L⁻¹ y un tiempo de respuesta de 5 minutos.

6. Se ha optimizado el primer sensor de fibra óptica luminiscente para la detección de iones europio(III) en agua. Para ello, se llevó a cabo la inmovilización del ligando PhPO(C₆H₄POPhN(CH(CH₃)₂)₂)₂ en una membrana de inclusión polimérica de PVC mediante la técnica de *dip coating* en el extremo de una fibra óptica. El desarrollo de este optodo es una alternativa simple y prometedora para la monitorización medioambiental, especialmente en lugares peligrosos y contaminados. Como el optodo posee unas características adecuadas para la monitorización, podría utilizarse como sensor de alarma para detectar la presencia de iones europio(III) en agua.

Las medidas luminiscentes *off-line* y *on-line* se llevaron a cabo a $\lambda_{exc/em} = 254/612$ nm. El número óptimo de capas depositadas fue cinco y su espesor estimado fue 284.4 ± 39.8 nm. El optodo presentó un comportamiento potencial frente a la concentración de iones europio(III) desde 10 nmol L⁻¹ hasta 1 mmol L⁻¹ y un tiempo de respuesta inferior a 2 minutos.