

5/179

UNIVERSIDAD DE GRANADA
Facultad de Ciencias
Fecha ... 19/02/03 ...
ENTRADA NUM. ... 530 ...

UNIVERSIDAD DE GRANADA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA

BIBLIOTECA UNIVERSITARIA
GRANADA
Nº Documento 61357629x
Nº Copia 15586455



UNIVERSIDAD DE GRANADA
7 / FEB. 2003
COMISION DE DOCTORADO

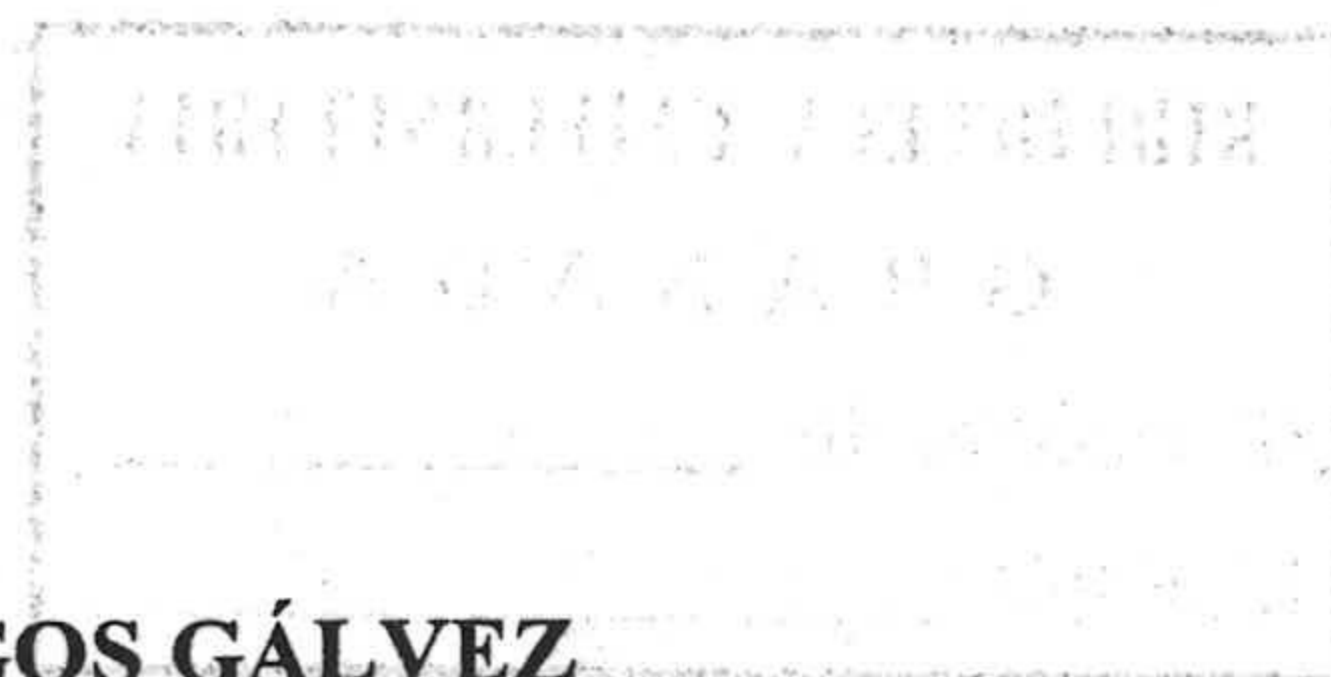
SESORES ÓPTICOS PARA CALCIO Y MAGNESIO.
ESTRATEGIAS, DESARROLLO Y APLICACIONES

TESIS DOCTORAL

PEDRO ÁLVAREZ DE CIENFUEGOS GÁLVEZ
GRANADA, 2003

**SESORES ÓPTICOS PARA CALCIO Y MAGNESIO.
ESTRATEGIAS, DESARROLLO Y APLICACIONES**

por



PEDRO ÁLVAREZ DE CIENFUEGOS GÁLVEZ

**Departamento de Química Analítica
Universidad de Granada**

VISADO en Granada, a 7 de Febrero
de 2003

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

Prof. Dr. Dña. M^a **Dolores Fernández
Ramos**, Profesora Titular Interina del
mismo Departamento

MEMORIA presentada para aspirar
al Grado de Doctor en Ciencias
Sección Químicas.

Granada, a 7 de Febrero de 2003

Fdo.- **Pedro Álvarez de Cienfuegos
Gálvez** Licenciado en Ciencias,
sección de Químicas.
Master en Química Analítica

A MIS PADRES

AGRADECIMIENTOS

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

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

A cada uno de los Docentes e Investigadores del departamento de Química Analítica por el apoyo y muestras de simpatía que hicieron mas acogedor y agradable el tiempo y lugar de trabajo y con los que compartí tantos buenos momentos.

A mi Familia por estar siempre pendiente de mí, por la alegría y cariño que me han proporcionado.

A Marina por su apoyo incondicional, por sus palabras de aliento en momentos difíciles, por su comprensión.

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

OBJETIVOS

OBJETIVOS DE LA TESIS

El objetivo general que se pretende con esta Tesis Doctoral es el desarrollo de métodos rápidos de análisis químico empleando sensores ópticos de un solo uso, también llamados tiras reactivas, para la determinación de dos iones alcalinotérreos en diversas matrices, como son calcio y magnesio. Para ello, se ensayaran dos tipos de sistemas basados en principios diferentes: complejación en membrana mediante reactivos cromogénicos convencionales e intercambio iónico entre una membrana polimérica plastificada conteniendo ionóforos selectivos y la disolución conteniendo el analito. Con esta Tesis Doctoral se pretende poner a punto procedimientos de análisis rápidos, fáciles de usar, de bajo costo y que no contaminen el medio.

Los objetivos específicos planteados son:

1. Desarrollar sensores ópticos de un solo uso para la determinación selectiva y rápida de calcio, magnesio y suma de calcio y magnesio, esto es dureza.
2. Poner a punto un sistema para la preparación de tiras reactivas que asegure la reproducibilidad necesaria para la aplicación.
3. Conseguir que esta metodología analítica presente como características más destacables las siguientes: sencillez en su aplicación a la resolución del problema analítico, posibilidad de que sea utilizado por personas sin preparación analítica, bajo costo por análisis y rapidez de respuesta, además de aquellas características que deben acompañar a todo método analítico, como son exactitud, precisión, sensibilidad, selectividad, robustez, etc.
4. Desarrollar nuevos ionóforos que mejoren la selectividad hacia los analitos de interés y, por otra parte, uso y acoplamiento de ionóforos ya conocidos y usados en técnicas eléctricas, a esquemas de reconocimiento en sensores ópticos
5. Aplicar las tiras reactivas desarrolladas a la determinación de alcalinotérreos en muestras de agua y leche de diverso tipo, procurando que el tratamiento de muestra sea mínimo, y validando los procedimientos mediante métodos de referencia adecuados.
6. Dado que el sistema químico seleccionado para el desarrollo de las tiras reactivas basado en uso de ionóforos, permite separar completamente la reacción de reconocimiento del ión alcalinotérreo de la de transducción, se pretende usar en todos los casos que sea posible, la misma reacción de transducción. Con ello, se podrán diseñar tiras reactivas que exhiban idéntica propiedad analítica, aunque selectivas para cada especie, con las posibilidades de instrumentación dedicada que ello supone.

CAPITULO 1
INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

Los ciudadanos, especialmente de lo que se ha venido en llamar del primer mundo, están cada vez más interesados en conocer qué comen, qué sustancias hay en el ambiente que les rodea, qué efecto tendrán sobre ellos los fármacos o los cosméticos que utilizan; en resumen, cada vez quieren –exigen– conocer más para precaver mejor. Todo ello origina una serie de necesidades, tanto públicas como privadas; una de las cuales es la de análisis químico, mediante la que se obtiene información confiable, de tipo cualitativo, cuantitativo y estructural de la materia.

Una de las tendencias actuales en Química Analítica es el desarrollo de metodología analítica que pueda ser usada donde se precise por parte del usuario o cliente, sin necesidad de una cuidadosa toma de muestra, conservación, transporte y ejecución del análisis en el laboratorio analítico por parte de personal entrenado. De alguna manera, supone una democratización y autonomización en el proceso de obtener información química rápida para responder a cuestiones relacionadas con salud, medio ambiente, terrorismo, defensa y similares.

Una posible solución a este problema es el uso de métodos rápidos de análisis que se puedan llevar a cabo *in situ*. Con este tipo de sistemas de análisis se pasa de obtener la información en el laboratorio a conseguirla en el lugar donde sea preciso. De las diversas formas de llevar a cabo este tipo de métodos, una de las más interesantes es la utilización de ensayos rápidos. Estos últimos permiten llevar a cabo los análisis químicos de forma rápida, simple y económica y sin necesidad de personal especializado, toma y tratamiento de muestras y desplazamiento de las mismas hasta los laboratorios convencionales de análisis y uso de instrumentación de laboratorio mas o menos sofisticada¹.

La información que ofrece este último tipo de procedimientos puede utilizarse tanto para la obtención rápida de información cualitativa y/o cuantitativa, como para discriminar la presencia de un constituyente en una muestra por encima de determinada concentración, de manera que permita seleccionar solo las muestras de interés y se reduzca de manera considerable el número de ellas a tomar y enviar al laboratorio.

También presentan interés para el control de procesos donde el problema no sea la precisión sino la monitorización de valores límites. Igualmente, puede ser una buena solución en muestras con componentes muy lábiles, pues se obvia todo el proceso de conservación de muestra. Incluso pueden servir para una primera estimación de niveles, en el establecimiento de estrategias de análisis en un problema dado. Amén de todo lo anterior, hay que considerar su uso por parte de personas particulares que quieran o necesiten controlar su nivel de glucosa, decidir si tienen que añadir cloro o sal de amonio cuaternario a su piscina o conocer la dureza del agua que origina su equipo de ablandamiento de agua.

De forma general, con este tipo de sistemas rápidos de análisis no se evita el uso del laboratorio analítico bien establecido y que emplea metodología certificada, sino que se establece un primer escalón en la obtención de información química, racionalizando de esta manera la utilización de ese laboratorio. Si a esto le sumamos la reducción de costos, de tiempo necesario y de personal, podremos concluir que se trata de una alternativa analítica interesante. Entre las limitaciones que tienen este tipo de ensayos rápidos podemos citar que ofrecen en ocasiones resultados de tipo semicuantitativo; que no suelen ser útiles para la

¹ Unger-Heumann, M., Fresenius J. Anal. Chem., 354, 803 (1996).

determinación de trazas o ultratrazas, aunque hay excepciones como algunos inmunoensayos que son más sensibles que los correspondientes métodos cromatográficos de laboratorio. Por otra parte, suelen servir para un solo parámetro, y tampoco permiten, usualmente, la especiación de iones metálicos.

Estos ensayos rápidos, son también llamados *test kit*, entre otros nombres², y se basan habitualmente en el empleo de reacciones (químicas, bioquímicas o inmunológicas) y procesos en condiciones que den lugar a un efecto observable visualmente (color desarrollado, longitud de una zona coloreada, número de elementos reaccionados) o fácilmente medible (colorimetría, fotometría, reflectometría, fluorescencia, volumetría, etc.).

Los análisis mediante pruebas rápidas pueden realizarse de dos formas: en disolución ó en fase sólida. Los primeros se basan en reacciones que se llevan a cabo en disolución, para lo cual el material a analizar -que debe estar en disolución o ser disuelto- se introduce en un pequeño recipiente en el que se encuentra, o al que se añade posteriormente, un sólido que se disuelve o una disolución que contiene los reactivos necesarios para efectuar la prueba. El sistema así formado evoluciona de forma que, bien visualmente o bien mediante el uso de un instrumento diseñado *ad hoc* o convencional, permite obtener los resultados analíticos deseados.

Existen una serie de casas comerciales (Merck, Chemetrics, Millipore o Hach, entre otras) que disponen tanto de reactivos como de los materiales e instrumentos necesarios para la realización de ensayos rápidos. Como ejemplos conocidos podemos citar los kits Aququant®, Aquamerck® o Microquant® para análisis de agua.

Los sistemas de fase sólida, también llamados tiras reactivas o sensores de gota plana, se pueden considerar como dispositivos analíticos autocontenidos. De una manera más precisa se pueden describir como elementos analíticos integrales que habitualmente toman la forma de películas o delgadas almohadillas y que contienen todos los reactivos necesarios para un ensayo situados dentro de la almohadilla o film y en estado sólido (seco al toque)³.

² Zolotov, Y., Ann. Chim., 87, 285 (1997).

³ Wang, J.Y., Reagent test device containing hydrophobic barriers. Patente US 4, 618, 475 (1986).

Estas zonas reactivas o matrices se encuentran adheridas a pequeñas tiras de material plástico que permiten su manipulación. Las matrices pueden ser papeles impregnados con reactivos, películas poliméricas conteniendo los reactivos o capas especiales con los citados reactivos.

En este caso, el procedimiento operacional difiere del anterior para disolución, pues los reactivos se encuentran formando una o varias capas sobre un soporte sólido constituido por celulosa o derivados, fibra de vidrio o polímeros sintéticos de diverso tipo. Para efectuar la prueba analítica, el sensor -tira reactiva- se pone en contacto con la disolución a analizar, bien por inmersión o bien depositando un volumen pequeño y conocido de la misma sobre la zona activa del sensor. Al difundir el problema en la zona de reacción, disuelve los reactivos y provoca la reacción o, lo que es muy habitual, desencadena un conjunto de reacciones que originan el desarrollo de una coloración, habitualmente, sobre la propia tira, lo que permite la estimación de la cantidad de analito presente. Dicha estimación se puede llevar a cabo visualmente usando una carta de colores, estimación semicuantitativa, o mediante un pequeño instrumento especialmente diseñado para ello y con el que se mide alguna propiedad óptica (absorbancia, reflectancia, fluorescencia, etc.) sobre el propio dispositivo, bien en equilibrio o de forma cinética.

Como vemos, se han integrado en un elemento unitario los reactivos necesarios y los procesos precisos para hacer posible la realización de determinado ensayo, de forma que no es necesario preparar, dispensar y mezclar los reactivos necesitados, ni realizar operaciones de reacción, extracción, precipitación, diálisis u otras.

Comparados con los métodos en disolución convencionales, los métodos de química seca presentan una serie de ventajas, entre las que destacan: 1) manipulación sencilla, lo que permite su uso incluso por personas sin formación específica en análisis; 2) corto tiempo de análisis; 3) no exige reactivos en disolución; 4) no hay problema, por tanto, de residuos, salvo la propia tira reactiva.

El origen de estos ensayos se encuentra en los papeles reactivos, esto es, tiras de papel de filtro impregnadas con reactivos, que se han usado en química analítica desde hace mucho tiempo -Prout reportó el uso del papel de litmus para el ensayo de alcalinidad en orina en 1817- para la detección de iones inorgánicos, sustancias orgánicas y sobre todo pH. Un hito en el uso de tiras reactivas fue la aparición, en la década de 1950, del denominado Clinistix

por la empresa Ames para el ensayo de glucosa urinaria, siendo la química clínica el campo en el que han experimentado mayor desarrollo. Así se ha usado para monitorizar numerosas funciones fisiológicas⁴ simplemente mojando la tira reactiva en una muestra de fluido corporal, tal como orina o sangre, y observando la respuesta originada, debido su relativamente bajo coste, facilidad de uso y rapidez en dar el resultado.

Los primeros formatos de tiras reactivas utilizadas eran de comparación visual a través de diversos procedimientos; esto es, originaban un color o una modificación de un color previo, y los resultados eran meramente cualitativos o como mucho permitían una estimación semicuantitativa mediante el uso de cartas de colores con un grado de exactitud baja⁵. Sin embargo, aunque actualmente se siguen usando estos ensayos, estos inconvenientes se fueron eliminando mediante la introducción de nuevas tecnologías y un cuidadoso control de la fabricación y el uso de medidas cuantitativas mediante instrumentación eléctrica u óptica. En esta Memoria de Doctorado solo se tratará de tiras reactivas de tipo cuantitativo a través de medidas ópticas.

Este tipo de sistema analítico fue usado extensamente a partir de finales de la década de los 70 y en la de los 80 en análisis clínicos -la llamada, en general, *Dry Reagent Chemistries*⁶ y denominada en España Química Seca-. Existen un gran número de tales ensayos rápidos^{7,8,9,10} algunos de los cuales están disponibles comercialmente para glucosa, colesterol¹¹, proteínas¹², enzimas u otros, constituyendo un mercado muy activo, de gran interés y

⁴ Oehme, I. y Wolfbeis, O. S. *Mikrochim. Acta*, 126, 177 (1997).

⁵ Ahlers, B., Choulga, A. y Cammann, K., Cation-selective sensor. Patente US 6,200,444 (2001).

⁶ Walter, B., *Anal.Chem.*, 55, 498A (1983).

⁷ Charlton, S. C., Fleming, R. L., Hemmes, P. y Lau, A. L. Unified Test Means for Ion Determination. Patente US 4,645,744, (1987).

⁸ Vogel, P., Thym, D., Fritz M. y Mosoiu, D., Test Carrier for the Determination of Ions (II). Patente US 5,302,346, (1993).

⁹ Priest, J. H. y Nelson, M., Dry reagent test strip comprising benzidine dye precursor and antipyrine compound. Patente US 5,824,491 (1998).

¹⁰ Charm, S. E., Skiffington, R., Markovsky, R. J, y Zomer, E., Test device, method and system for detection of an analyte. Patente WO 99/34191 (1999).

¹¹ Noble, D., *Anal.Chem.*, 65, 1037A (1999).

volumen económico (Bayer (Ames), Roche (Boehringer Mannheim), Johnson & Johnson (Eastman Kodak), Menarini).

En menor extensión se han utilizado en otros campos como es el análisis medioambiental^{13,14}, para determinar especies tales como metales, pesticidas⁶ o gases¹⁵, y en donde existen algunas empresas que ofrecen estos productos (Merck, Macherey-Nagel, Environmental Test Systems, Kyoritsu, Serim Research Co., entre otras). También se ha usado en control de drogas¹⁶, aunque presentan interés en otras áreas tales como control de procesos, defensa, biotecnología o vida diaria.

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

1. Clasificación de los ensayos

Se pueden clasificar los ensayos de fase sólida en dos grupos: sistemas verticales y sistemas horizontales, atendiendo a como se relaciona el problema conteniendo el analito con la tira reactiva. En los sistemas verticales el fluido atraviesa perpendicularmente la capa o capas que constituyen la zona reactiva sufriendo un conjunto de reacciones y procesos que

¹² Gossain, V. V.; Gunaga, K. P.; Carella, M. J.; Edminster, R. R.; Bowman, K. A. y Rovner, D. R., *Arch. Pathol. Lab. Med.*, 120, 1015 (1996).

¹³ Valcarcel, M. y Luque de Castro, M. D., *Flow-Through (Bio)Chemical Sensors*, Elsevier Science B.V., (1994).

¹⁴ Jaunakais, I. y Hill, R., *Colorimetric Test Strip*. Patente US 5,620,658 (1995).

¹⁵ Effkemann, S.; Brodsgaard, S.; Mortensen, P. y Linde, S., *Fresenius J. Anal. Chem.*, 366, 361 (2000).

¹⁶ Campiglia, A. D. y Vo-Dinh, T. *Anal. Chim. Acta*, 372, 349 (1998).

permitirán desarrollar una propiedad analítica. En los sistemas horizontales la muestra se deposita sobre una zona de recepción y se mueve por flujo fluido a través de la tira de ensayo produciéndose como consecuencia de esa migración separaciones cromatográficas, reacciones y/o retenciones de analito o interferentes, que originaran la propiedad analítica. En esta Memoria de Doctorado solo trataremos de ensayos de tipo vertical, por lo que a ellos nos atenderemos en lo que continúa.

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

Los reactivos en los sistemas verticales se encuentran en fase sólida y se pueden distribuir o bien a través de toda la matriz de la tira reactiva o bien pueden estar compartimentalizados en dominios específicos dentro de la infraestructura de la matriz. Esta distribución de reactivos y componentes necesarios se puede lograr de dos maneras: 1) mediante una única capa, los llamados sistemas monocapa; o 2) mediante un conjunto de capas diferenciadas que se encuentran apiladas, los llamados sistemas multicapa. La mayor o menor complejidad del sistema dependerá del propio analito, de la complejidad de la matriz que lo contiene y de la selectividad de la reacción de reconocimiento.

1.1. Sistemas monocapa

Estos sistemas emplean membranas constituidas por una única capa, la cual puede ser homogénea o bien heterogénea.

Los sistemas homogéneos son los más simples. Consiguen una distribución homogénea de componentes a través de: 1) procesos de impregnación de un soporte adsorbente - sistemas de fibra impregnada-; 2) por deposición de una disolución de reactivos sobre un soporte no adsorbente; 3) por fabricación de un film usando un material formador de película junto con los reactivos sobre un soporte plástico. Todo ello se puede lograr por técnicas de inmersión, pintado, rociado, aplicación o deposición.

Los sistemas de fibra impregnada son los más antiguos y se han empleado como base para la preparación de un gran número de productos para diagnóstico de uso comercial. En general, los sistemas de fibra impregnada consisten en una pieza de celulosa que puede ser porosa o semipermeable con respecto a la difusión del soluto. Las composiciones químicas necesitadas en este tipo de sistemas están distribuidas homogéneamente en forma seca, bien en los intersticios de la matriz celulósica o en la superficie del conjunto de fibras¹⁷. La razón de su amplio uso fue su bajo precio, su facilidad de preparación y la buena reactividad de las fibras de celulosa. Sin embargo, presentan problemas principalmente debido a la falta de uniformidad del papel y a su inestabilidad frente a ácidos y bases fuertes y sustancias oxidantes. Otro problema que presenta el papel, es el llamado efecto cromatográfico debido a la tendencia que tiene la muestra aplicada a lavar los reactivos incorporados en la membrana celulósica. Alternativamente se han usado diversas fibras sintéticas en lugar de celulosa, así por ejemplo, se han usado fibras de poliamida impregnadas para ensayos de urobilinógeno o cuerpos cetónicos¹⁸.

Para solucionar los problemas de los sistemas de fibra impregnada se introdujeron las películas reactivas. Su principal ventaja es el alto grado de uniformidad que se consigue en la capa de reactivo. Mediante el uso de las películas reactivas junto con medidas ópticas, especialmente reflectancia difusa, fue posible lograr con las tiras reactivas resultados con la calidad de los obtenidos con métodos químicos en disolución.

La película reactiva se puede aplicar directamente sobre la capa de polímero sintético que servirá para su manipulación o bien se situará sobre una película portadora adicional que le dotará de la estabilidad necesaria para su preparación y posterior uso.

En comparación con la mayoría de las tiras reactivas basadas en fibra celulósica impregnada, las tiras de película reactiva tienen una superficie suave y una menor proporción de espacios huecos, lo que, aparte de las ventajas ya citadas, origina diversos inconvenientes. Entre ellos se ha citado la baja velocidad de reacción o la baja velocidad de aporte de oxígeno.

¹⁷ Lange, H., Rittersdorf, W. y Rey, H. G., Diagnostic device. Patente US 3,897,214 (2001).

¹⁸ Lange, H., Rittersdorf, W., Rey, H. G., Werner, W. y Rieckmann, P., Stable test strips having a water-soluble paper layer and methods for making same. Patente US 4,061,468 (1977).

no en reacciones enzimáticas basadas en estas tiras reactivas; así por ejemplo, en la determinación de glucosa con glucosa oxidasa¹⁹.

De una manera general, los sistemas monocapa homogéneos suelen mostrar diversos problemas, lo que restringe su uso a determinados ensayos simples o con un menor grado de integración. Los problemas de mayor importancia son: 1) los reactivos pueden ser mutuamente incompatibles; 2) los reactivos pueden tener diferente solubilidad y ser solubles unos en medio acuoso y otros en medio orgánico; 3) algunos reactivos pueden lixiviar durante su uso; 4) puede ser necesario modificar las condiciones experimentales durante las diferentes reacciones que tienen lugar, así el pH; 5) puede ser necesario efectuar procesos de separación, por ejemplo, extracción o diálisis, incorporados en el esquema analítico; y 6) los tiempos de equilibración pueden ser muy altos, lo que los inhabilita para su uso.

A estos problemas se pueden dar diversas soluciones, una de ellas es el uso de membranas monocapa heterogéneas. Con ellas se pretende compartimentalizar la membrana, principalmente, segregar reactivos mutuamente incompatibles o bien separar etapas particulares secuenciales del esquema analítico global. Las estrategias usadas para la preparación de membranas monocapa heterogéneas dependen del tipo de problema que pretende resolver.

1.2. Sistemas multicapa

El empleo de formatos monocapa presenta ventajas en cuanto a su fabricación, sin embargo con ellos no se pueden resolver con eficacia todos los problemas, ni se pueden aplicar a cualquier conjunto de reacciones o procesos. La determinación de algunos compuestos en solución acuosa raramente se puede llevar a cabo con un único reactivo y, consecuentemente, es frecuente usar una combinación de diversos reactivos para reacciones multi-etapa. Por ello, se han desarrollado los sistemas multicapa, en los que se sitúan un conjunto de capas de diferente naturaleza que serán recorridas verticalmente por la muestra, produciéndose un conjunto secuencial de operaciones analíticas, así disolución, filtración, diálisis o extracción, junto con reacciones químicas de muy diverso tipo, tales como neutralización,

¹⁹ Rothe, A., Knappe, W. R. y Trasch, H. F., Test strips. Patente US 4,604,264 (1986).

complejación, reacciones redox, formación de compuestos insolubles, reacciones estereoespecíficas u otras, y todo ello, integrado en una película de espesor menor de 100 μm .

El número de capas puede ser muy variado dependiendo del problema a resolver – tanto analito como matriz-, de las reacciones químicas usadas y del sistema de medida utilizado. Generalmente, las capas están construidas sobre un soporte que consiste en un plástico rígido y delgado o un material similar que puede ser transparente o reflectante. Cuando el soporte es hidrofóbico y la adhesión entre ese soporte y el adhesivo hidrofílico de la capa de reactivo es insuficiente, se puede someter a tratamiento para hacer la superficie hidrofílica; por ejemplo, mediante irradiación ultravioleta o con un haz de electrones; o bien se pueden hacer procesados auxiliares, así la formación de una capa subyacente preparada con una sustancia que tenga una adhesión apropiada tanto al soporte como a la capa de reactivo o bien la formación de pequeñas irregularidades en la superficie del soporte de forma que no se reduzca considerablemente las características de transmisión de radiación, por ejemplo mediante pulido o tratamiento electroquímico.

Existen diferentes tipos de capas que se pueden estructurar de manera diferente en cada caso. Las más habituales son las siguientes: capa reflectante, capa opacificante, capa distribuidora, capa de reactivos, capa de reactivos inestables, capa de recepción, capa de eliminación de interferencias y capa de separación.

2. Esquemas de sensado

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

De una manera general un ligando –portador de iones, ionóforo, indicador o agente complejante- o un reactivo o reactivos se enlazan químicamente o bien se entrapan físicamente cerca de la interfase o bien en el seno de la capa sensora o bien se inmovilizan directamente en la superficie de la zona sensora. La señal óptica se genera mediante la interacción

del reactivo, que cambia sus propiedades ópticas por reacción con el analito²⁰, bien solo o con la ayuda de compuestos adicionales –cromoionóforo, fluoroionóforo, colorante indicador, reactivos auxiliares-.

Entre ellos podemos citar: a) medida de propiedades intrínsecas, tal es el caso de fosforescencia para el pesticida morestan²¹, previa retención del analito en una membrana; b) reacciones orgánicas, así la formación de un azoderivado para nitrito²² o fenol²³; c) reacciones enzimáticas; muy habituales en análisis clínico, así para glucosa o CPK²⁴; d) reacciones de complejación convencionales, así para cobre²⁵ o vanadato²⁶; e) reacciones basadas en ionóforos, caso de iones alcalinos²⁷; f) reacciones inmunológicas^{28,29}.

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

²⁰ Seiler, K. y Simon, W. *Sens. Actuators B*, 6, 295 (1992).

²¹ Capitán-Vallvey, L. F.; Fernández-Ramos, M. D., Avidad-Castañeda, R. y Deheidell, M. *Anal. Chim. Acta*, 440, 131 (2001).

²² Capitán-Vallvey, L. F., Ariza-Avidad, A., Fernández-Ramos, M. D., Arroyo, E. y Avidad-Castañeda, R., *Anal. Bioanal. Chem.*, 373, 289 (2002).

²³ Panreac. Chemetrics. *Innovación en Análisis Rápidos de Aguas*. (1998).

²⁴ Guardiola Vicente, J. M. *La orina y su análisis*, Química Farmaceutica Bayer, Ed.; Madrid, (1995).

²⁵ Capitán-Vallvey, L. F., Cano-Raya, C., Esparza del Valle, C., Fernández-Ramos, M. D., de Orbe Payá, I. y Avidad-Castañeda, R. *Anal. Lett.*, 35, 615 (2002).

²⁶ Jaunakais, I. y Jaunakais, J. K. Test device for detection of molybdate, vanadate and ferric ions. Patente US 5,106,581 (1992).

²⁷ Charlton, S. C. Method, device y composition for the assay of ions. Miles Laboratories Inc. Patente US 5,300,439 (1985).

²⁸ Grubb, A. O. y Glad, U. C. Immunoassay with test strip having antibodies bound thereto. Patente US 4,168,146 (1979).

²⁹ Rosenstein, R. W., Solid phase chromatographic immunoassay. Patente US 5,591,645 (1994).

2.1. Tiras reactivas basadas en reactivos cromogénicos convencionales

Algunas tiras reactivas se basan en una reacción entre un analito que se encuentra presente en el problema y el reactivo que se encuentra inmovilizado en la membrana sensora. Como consecuencia de la reacción se origina una nueva especie que implica una reorganización del reactivo, en ocasiones con la incorporación del analito en ella, como es el caso de la complejación, lo que lleva aparejado una modificación de sus características electrónicas y, por tanto, de sus propiedades ópticas, lo que aprovecharemos para la medida.

La mayoría de los reactivos que originan combinación de iones, a través de reacciones de complejación y redox, principalmente, son ácidos o bases débiles, por lo que el equilibrio implica protones. Por ello, cuando se utilizan estas reacciones para establecer la concentración de iones metálicos, es necesario mantener la concentración protónica constante mediante tamponamiento del medio de reacción.

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

En la Figura 1.1 se muestra un modelo general de tira reactiva en la que la zona sensora de la misma es de naturaleza hidrofóbica. En el caso de que estuviera constituida por un polímero hidrofílico –celulosa, por ejemplo- se podrían sustituir las anteriores constantes de distribución por isothermas de adsorción.

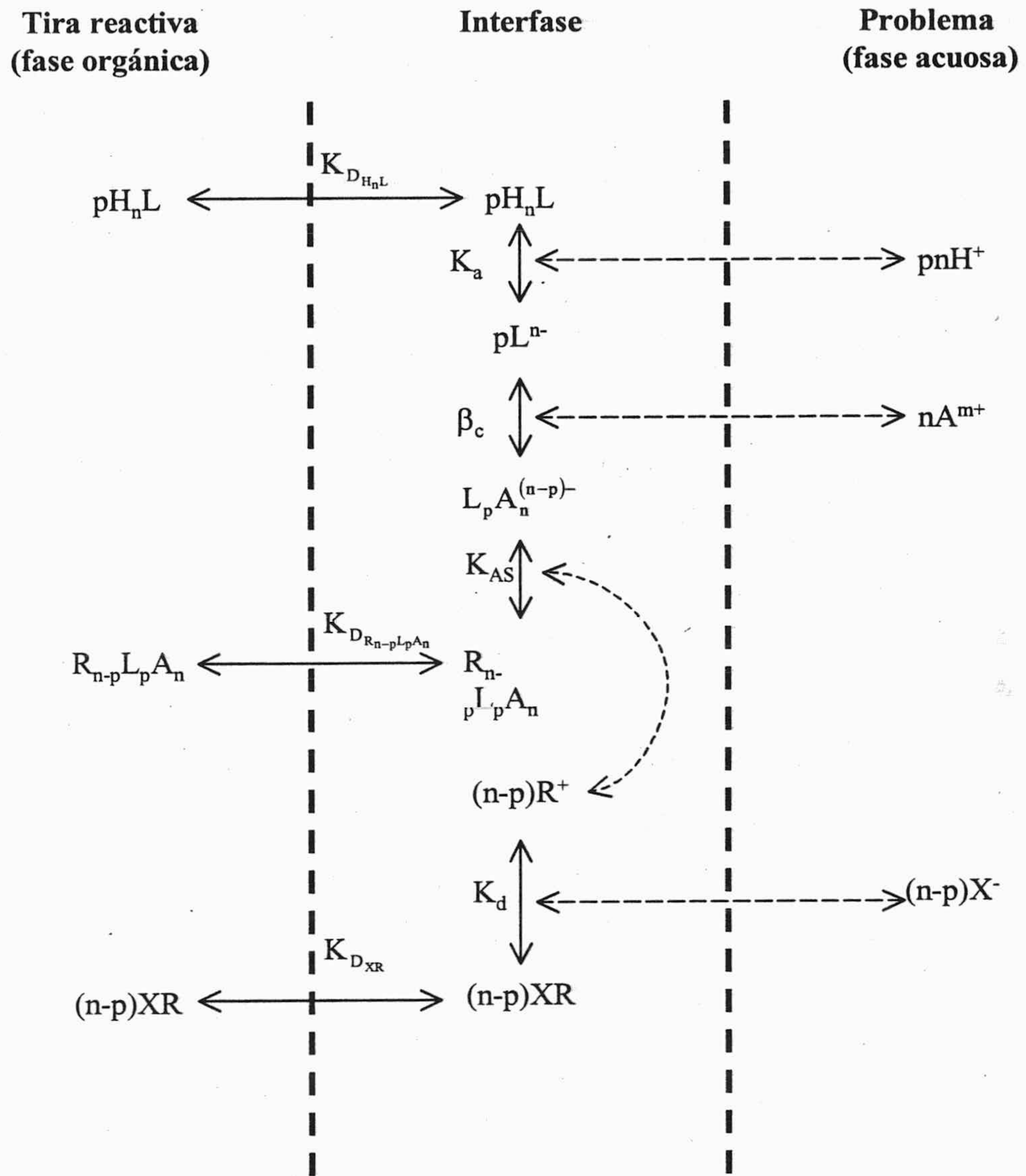
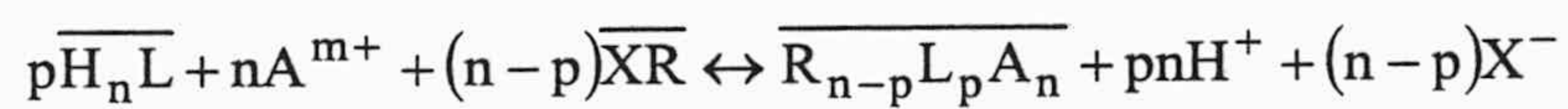


Figura 1.1. Modelo de tira reactiva basada en un ligando convencional

El equilibrio general que se cumple es:



donde se cumple que $p < n$ y cuya constante de equilibrio vendrá dada por.

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

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

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

$$K_e = \frac{\beta_c K_{AS} K_{DR_{n-p}L_pA_n} K_a^p K_d^{n-p}}{K_{DH_nL}^p K_{DXR}^{n-p}} \quad (1.2)$$

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

En consecuencia el equilibrio quedará resumido por:



y caracterizado por:

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

donde $[A]$ es la concentración de analito y \overline{L} y \overline{AL} es el número de moléculas de reactivo libres y combinadas en la fase inmovilizada de la tira reactiva, respectivamente^{30,31}.

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

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

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

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

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

³⁰ Oehme, I. y Wolfbeis, O. S., *Mikrochim. Acta*, 126, 177 (1997).

³¹ Seitz, W. R. *Anal. Chem.*, 56, 16 (1984).

En el caso de que la propiedad analítica medida dependa de la combinación AL, la ecuación 1.5 se puede simplificar como sigue:

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

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

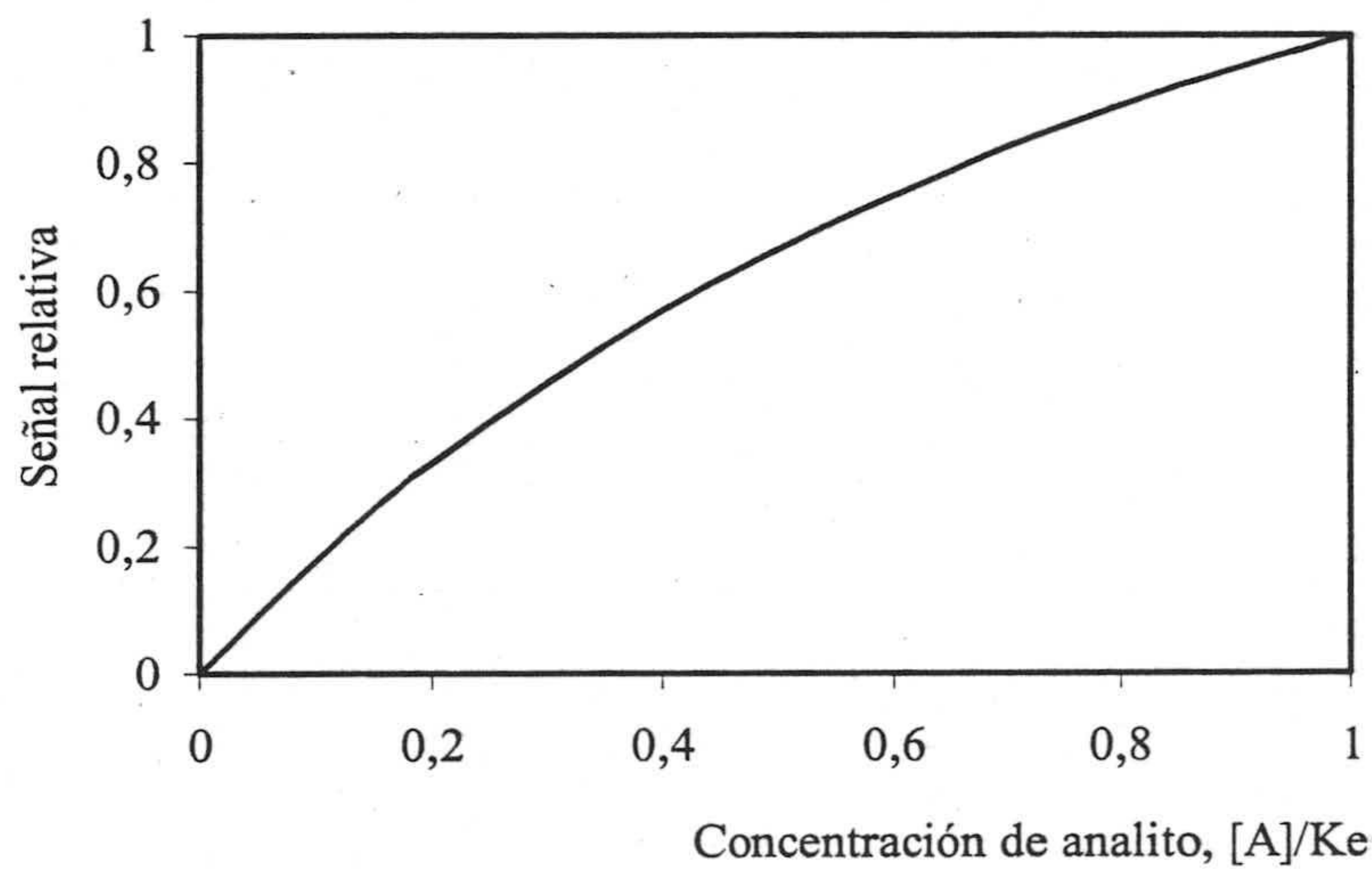


Figura 1.2. Relación entre señal óptica que es proporcional a complejo formado y la concentración de analito

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

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

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

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

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

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

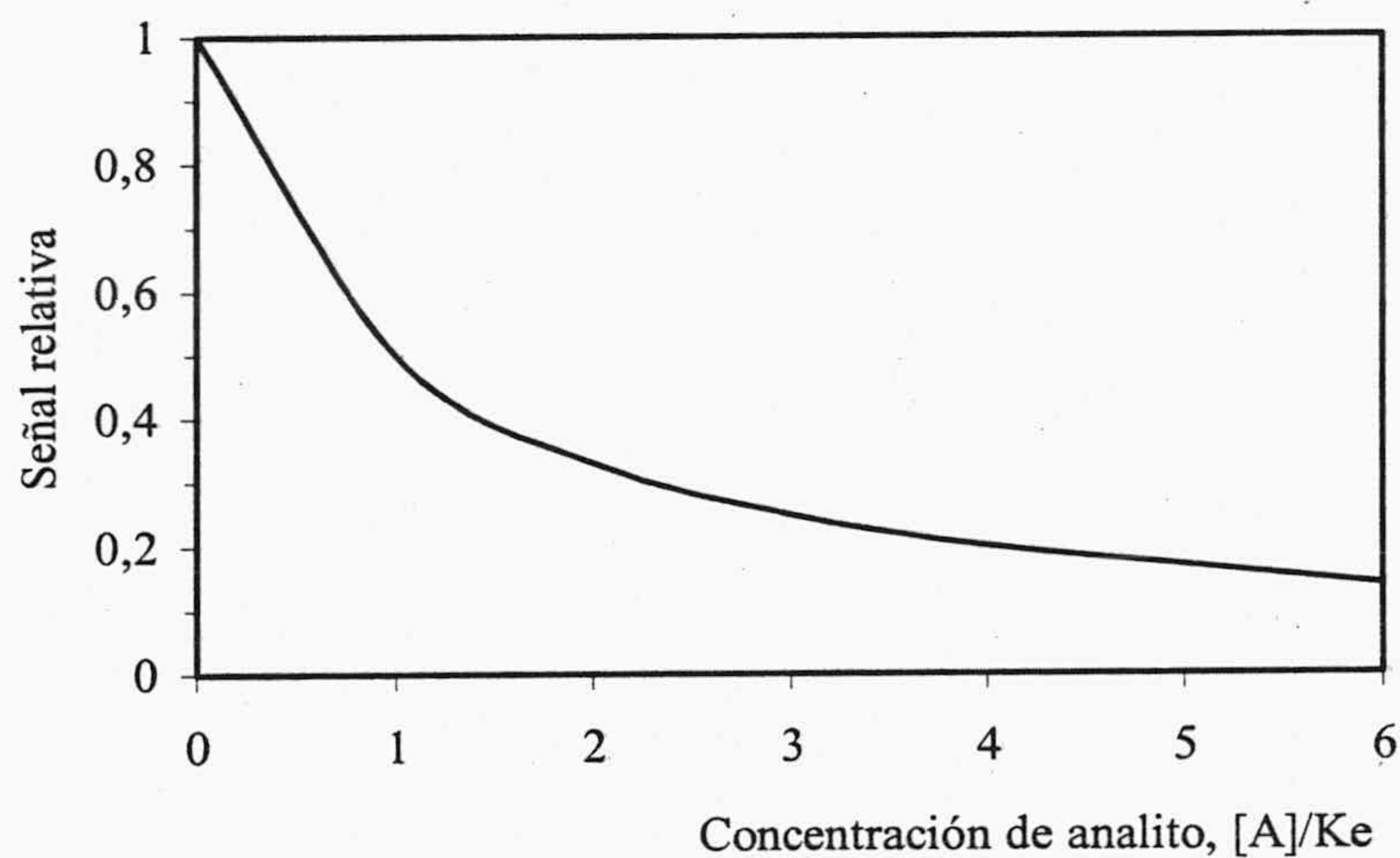


Figura 1.3. Relación entre señal óptica proporcional a reactivo restante y concentración de analito

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

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

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

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

$$A_{\bar{AL}} = \frac{\varepsilon_{\lambda_{\bar{AL}}} l \Phi K_e [A]}{1 + K_e [A]} C_L \quad (1.8)$$

donde $A_{\bar{L}}$ y $A_{\bar{AL}}$ son los valores de absorbancia medidos a las longitudes de onda $\lambda_{\bar{L}}$ y $\lambda_{\bar{AL}}$ características del reactivo y de la combinación, $\varepsilon_{\bar{L}}$ y $\varepsilon_{\bar{AL}}$ son las absortividades molares respectivas del reactivo y de la combinación, l es el paso de radiación efectivo de la zona sensora de la tira reactiva que suele ser de unos pocos a decenas de μm y Φ es la eficiencia en la recogida de radiación en el detector.

En el caso de que se mida la absorción de radiación por reflexión se aplicará la expresión de Kubelka-Munk, donde la intensidad de radiación reflejada por el medio de reacción es determinada por el porcentaje de reflexión (R%) que se expresa como:

$$R\% = \frac{I_m}{I_r} R_r \quad (1.9)$$

donde I_m es la intensidad de radiación reflejada por la tira reactiva, I_r es la intensidad de radiación reflejada por la referencia y R_r es el porcentaje de reflectividad de la referencia. Las medidas de reflectancia son comparables a las de transmitancia y al igual que ella no se relaciona linealmente con la concentración. Se han usado diversos algoritmos, que dependen de la naturaleza de la iluminación, de las características reflectantes de la tira reactiva seca y de la geometría del instrumento, para convertir las medidas de reflectancia en función lineal de la concentración³².

Gran número de las reacciones usadas en sensores de un solo uso para la determinación de especies, sobre todo iones metálicos, basadas en reactivos cromogénicos convencionales son irreversibles. Esto se debe a diversas razones, la primera de las cuales es que la constante estabilidad K_e es muy grande, esto es, producen una gran variación negativa de energía libre. Como el rango de respuesta aproximadamente abarca $\log K_e \pm 1$, si se cumple que $pM < (\log K_e - 1)$, el reactivo se encontrara saturado por el ión metálico presente y un ulterior aumento en la concentración de ese ión metálico no originará un aumento de señal.

La forma más habitual de usar esos sensores irreversibles es ponerlos en contacto con un volumen fijo de analito, de forma que se establezca un aparente equilibrio que estará gobernado por la cantidad total de analito en la muestra, de forma que el analito será extraído de la muestra a la tira reactiva tal como se observa en la Figura 4, donde se cumple que $C_1 > C_2 > C_3$. Se alcanzará la saturación una vez que la cantidad de analito excede la capacidad enlazante de la membrana.

³² Walter, B. Anal.Chem. 55, 498 (1983).

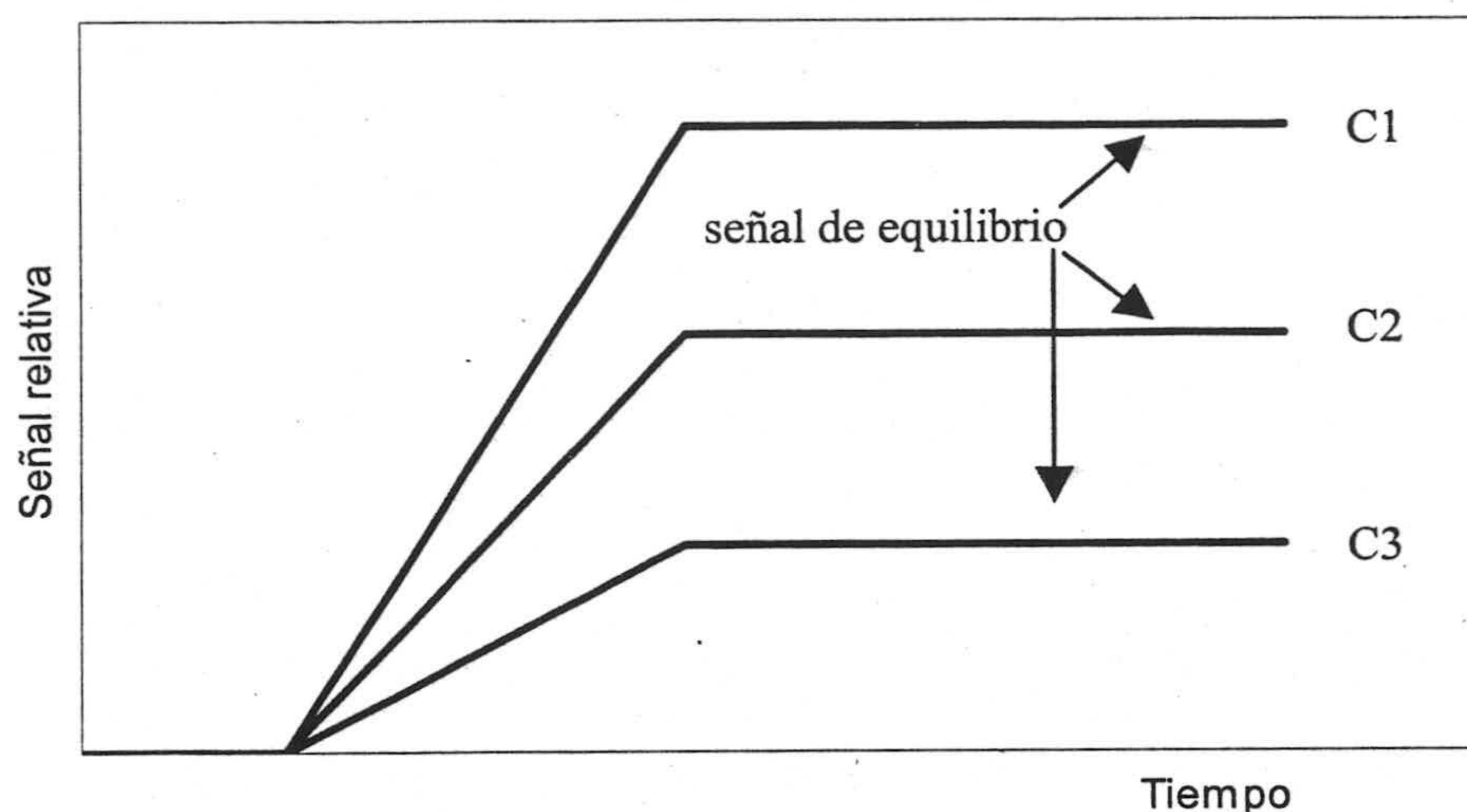


Figura 1.4. Respuesta de tiras reactivas a un volumen fijo de problema

Una segunda razón que justifica la irreversibilidad es la lenta velocidad de reversión de las reacciones. Esto es, que la velocidad de reacción entre el agente complejante y el ión metálico es alta, pero la reacción inversa es muy lenta. Generalmente, la regeneración de la membrana se logra con ácidos diluidos, entre pH 1 y 2. Sin embargo, las tiras reactivas se suelen considerar de un solo uso debido a su bajo precio.

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

En este caso, la tira reactiva no funciona como un sensor reversible, pues el sensor perturba la muestra, sino como un dispositivo de preconcentración permitiendo la determina-

ción de pequeñas concentraciones de analito. Este es el caso de la determinación de nitrito con una tira reactiva, basada en la diazotación de sulfanilamida con ácido nitroso y posterior reacción de copulación con N-(1-naftil)etilendiamina y retención del azoderivado catiónico formado sobre el polímero sulfónico Nafion mediante intercambio iónico. Permite la determinación a partir de $1,7 \mu\text{g L}^{-1}$ de nitrito dependiendo del tiempo de contacto de la tira reactiva con la disolución³³.

Otro aspecto a considerar, es que la estequiometría de las combinaciones, especialmente en el caso de complejos metálicos, tiende a disminuir debido a la dificultad de ordenar moléculas que se encuentran en posiciones mas o menos fijas sobre el soporte, o que tienen mayor dificultad para moverse que en disolución, alrededor de un ión metálico que tiene unos requerimientos dados. Se tiende en general a la menor estequiometría 1:1. Así, la morina forma un complejo de estequiometría 2:1 con aluminio en disolución mientras que inmovilizada sobre celulosa lo forma 1:1. Sin embargo, esto no siempre es así, lo que se traduce, a veces, en velocidades lentas de formación de los complejos por la necesidad de difusión de moléculas de reactivo a través de la fase sólida³⁴.

Como consecuencia de lo anterior, el uso de las constantes de estabilidad en disolución puede no ser una buena vía para describir lo que ocurre en fase sólida. Además no hay que olvidar que la inmovilización de reactivos puede tener diversas consecuencias especialmente si la unión se hace a través de uno de los posibles grupos complejantes como ocurre en la morina inmovilizada sobre celulosa con cloruro cianúrico que involucra a los grupos OH de la molécula³⁵.

Otro aspecto a considerar, es que como la respuesta depende de una constante de equilibrio, estos sensores, al igual que los de fibra óptica, medirán solo la concentración de analito que se encuentre en una forma asequible para interactuar con el reactivo. Así po-

³³ Capitán-Vallvey, L. F.; Ariza-Avidad, A.; Fernández-Ramos, M. D.; Arroyo, E.; Avidad-Castañeda, R. *Anal. Bioanal. Chem.*, 373, 289 (2002).

³⁴ Brykina, G. D.; Marchak, T. V. y Belyavskaya, T. A., *Zh. Anal. Khim.*, 54, 2094 (1980).

³⁵ Brykina, G. D. y Smirnov, I. P., *Vestn. Mosk. Univ., Ser.2:Khim.*, 32, 270 (1991).

drían medir metal libre en lugar de metal total, al igual que ocurre en los electrodos potenciométricos.

Como ejemplo de tiras reactivas basadas en reactivos convencionales podemos citar la determinación de plomo en gasolina usando ditizona³⁶, la determinación de cobre en agua mediante batocuproina³⁷, la de hierro, molibdato y vanadato en líquidos de refrigeración usando ácido 2,3,4-trihidroxibenzoico³⁸ o la de cinc en agua usando ditizona³⁹

2.2. Tiras reactivas basadas en reactivos ionóforos

El término ionóforo o portador de iones fue utilizado para describir la capacidad transportadora de iones a través de membranas de la valinomicina y nigericina y señalar el aspecto dinámico del mecanismo de transporte⁴⁰, aunque también se usa el término general ligando para señalar la asociación y coordinación entre la molécula portadora y el ión.

Así Moore y Pressman observaron una liberación de protones a partir de mitocondrias en disoluciones de potasio y evidenciaron las propiedades únicas de la valinomicina para inducir el transporte activo de potasio a través de membranas y su intercambio por protones

³⁶ Campbell, R. L. Method y paper test strip for determining low levels of lead in hydrocarbon fuels. Patente US 3,893,808 (1975).

³⁷ Foerster, J. W., Ewing, K., Ervin, A., y Lamontagne, R. In situ copper (I) determination. Patente WO 99/47917 (1999).

³⁸ Jaunakais, I. y Jaunakais, J. K. Test device for detection of molybdate, vanadate and ferric ions. Patente US 5,106,581 (1992).

³⁹ Capitán Vallvey, L.F., Avidad Castañeda, R., Fernández Ramos, M.D. Alvarez de Cienfuegos, P. y Ariza Avidad, A., Sensor de un solo uso para la determinación de ión cinc en aguas. Patente Española. Número de solicitud P9900718 (1999).

⁴⁰ Painter, G. R. y Pressman, B.C., Host Guest Complex Chemistry II, Vogel, F., Ed.; Springer, New York, (1982).

⁴¹. Este proceso de cambio iónico se da también a través de bicapas artificiales⁴², así como en la interfase de membranas poliméricas plastificadas de electrodos selectivos de iones⁴³.

La limitación principal que presentan los reactivos convencionales para el desarrollo de sensores de tipo sonda, flujo y, en menor extensión, de gota plana, se debe a las altas constantes de estabilidad que originan con iones metálicos. Ello hizo que aumentará el interés por el uso de ionóforos, que se pueden considerar como moléculas orgánicas lipofílicas, no coloreadas y con capacidad para complejar iones de forma reversible y transportarlos a través de membranas orgánicas⁴⁴. Este tipo de moléculas ha encontrado una amplia utilización en electrodos selectivos de iones especialmente para iones alcalinos y alcalinotérreos y aniones como cloruro⁴⁵.

Químicamente los ionóforos pueden ser moléculas de diverso tipo de entre las que destacan los coronanos, criptandanos, antibióticos y podanos, entre otros. Uno de los compuestos más utilizados son los coronanos que son compuestos macrocíclicos monocíclicos conteniendo átomos donores que son ricos, o deficientes, en electrones y que son capaces de complejar a concretos cationes o aniones debido a su peculiar estructura. Dentro de este grupo se encuentran los éteres corona que son compuestos orgánicos cíclicos cuyas moléculas contienen nueve o más átomos en el ciclo, incluyendo, al menos, tres heteroátomos – oxígeno, nitrógeno o azufre y más raramente otros elementos, tales como fósforo, arsénico o silicio⁴⁶. Debido al tamaño del ciclo y a la geometría que poseen cada uno de ellos, los coronanos pueden complejar a diferentes iones. En esta interacción, los átomos ricos en electrones, por ejemplo, los oxígenos de los éteres corona, se orientan hacia los cationes deficientes en electrones, mientras que los segmentos de átomos de carbono que unen esos oxígenos se

⁴¹ Moore, C. y Pressman, B. C., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 15, 562 (1964).

⁴² Mueller, P. y Rudin, D. O., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 26, 398 (1967).

⁴³ Stefanac, Z. y Simon, W., *Chimia*, 20, 436 (1966).

⁴⁴ Oehme, I. y Wolfbeis, O.S., *Mikrochim. Acta*, 126, 177 (1997).

⁴⁵ Spichiger-Keller, U. E., *Chemical Sensors and Biosensors for Medical and Biological Applications*, 1 ed.; Wiley-VCH: Weinheim, (1998).

⁴⁶ *Macrocyclic Compounds in Analytical Chemistry*, Y. Zolotov, John Wiley & Sons: New York, (1997).

proyectan hacia el exterior. De esta manera, el complejo resultante está cargado en el centro, pero es hidrófobo en la periferia.

Los criptandanos son análogos policíclicos de los coronanos, entre los que se encuentran compuestos multidentados bicíclicos y tricíclicos. En ellos, la ordenación cíclica de átomos donores, que pueden ser oxígeno, nitrógeno y/o azufre, es tridimensional, al contrario de lo que le ocurre a los anteriores, que es sustancialmente plana. Un criptandano es capaz de envolver virtualmente al ión de forma tridimensional y origina unos enlaces fuertes en el complejo.

Los podanos son compuestos no cíclicos que contiene cadenas lineales con una secuencia regular de átomos ricos en electrones, como puede ser oxígeno, y, por tanto, tiene capacidad para asociarse con cationes formando complejos. La principal diferencia estructural con coronanos y criptandanos es su estructura abierta. Los podanos pueden clasificarse, según el número de cadenas con átomos donores que posea, en monopodanos, dipodanos, tripodanos, etc. En los monopodanos hay una única cadena conteniendo átomos donores; en un dipodano hay dos cadenas unidas a través de un átomo puente o un grupo atómico capaz de una orientación espacial variable; en un tripodano hay tres de tales cadenas unidas al átomo o grupo atómico central. Los podanos no cargados han sido muy utilizados para la determinación de sodio y calcio. Como ejemplo podemos citar el tripodano 1,1,1-tris[1'-(2'-oxo-4'-oxo-5'-aza-5'-metil)dodecanil] propano usado para la preparación de una tira reactiva para sodio ⁴⁷.

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

⁴⁷ Charlton, S. C., Hemmes, P. y Lau, A.L.Y., Ion test means having a hydrophilic carrier matrix. Patente US 4,649,123 (1987).

orgánica –zona sensora-. Los tipos de interacciones puestas en juego son de tipo no covalente sino de baja energía, lo que justifica la reversibilidad.

Bajo el punto de vista termodinámico, las interacciones entre un catión y un ligando se pueden clasificar en cuatro categorías, de acuerdo con la contribución dominante a la energía libre molar de interacción ΔG . El primero es el mecanismo de estabilización por entalpía, en el que $\Delta H < 0$, pudiendo subdividirse en dos grupos según sea la variación entrópica: $\Delta S > 0$ ó $\Delta S < 0$. El segundo es el mecanismo de estabilización por entropía, pues $\Delta S > 0$ y que a su vez puede dividirse en otros dos grupos: $\Delta H < 0$ y $\Delta H > 0$ ^{48,49}

Para éteres corona del tipo 15-corona-5 y 18-corona-6 y sus derivados se comprobó que las variaciones de ΔH y ΔS se compensaban⁵⁰, observándose que la variación de la energía libre de Gibbs frente a la variación de entropía mostraba una pendiente positiva y una ordenada positiva ΔS_0 para $\Delta H = 0$. La contribución entrópica se justifica como derivada del proceso de desolvatación y parece ser el factor principal que gobierna la complejación aceptor-huésped (*host-guest*).

Cuando la ordenada en origen ΔS_0 se hace positiva, la complejación tiene lugar aún cuando no haya incremento en entalpía. Valores grandes de pendientes se interpretan como debidos a cambios conformacionales de moderados a sustanciales, típicos de ligandos acíclicos flexibles tales como podanos o éteres corona cíclicos. Por el contrario, valores altos de ordenada en el origen, típica de esqueletos más rígidos, como los criptandanos bicíclicos, se explican como resultado de una extensa desolvatación tanto de catión como de ligando con cambios pequeños conformacionales. La ordenada en origen positiva implica un mecanismo de asociación estabilizada por entropía donde el conformómero predominante del ionóforo libre en disolvente puro se encuentra menos estabilizado que los de la asociación ión-ionóforo; lo cual significa que la asociación está entrópicamente favorecida. La polaridad y

⁴⁸ Kauffman, E.; Lehn, J. M. y Sauvage, J. P., *Helv. Chim. Acta*, 59, 1099 (1976).

⁴⁹ Vögtle, F.; Weber, E. Patai, S., *The Chemistry of Ethers, Crown Ethers, Hydroxyl Groups and Their Sulfur Analogous*. Ed.; Wiley: New York, Capítulo 2, (1980).

⁵⁰ Izatt, R. M.; Terry, R. E.; Haymore, B. L.; Hansen, D. L.; Dalley, N. K.; Avondet, A. G. y Christensen, J. J., *J. Am. Chem. Soc.*, 98, 7620 (1976).

la donicidad protónica del disolvente ejerce una fuerte influencia en la preformación del ionóforo y, por tanto, en la energía libre de interacción⁵¹. Este mecanismo definido por una correlación positiva entre entalpía y entropía se denomina de compensación $\Delta H - \Delta S$. Este efecto es de validez universal y ha sido demostrado para un gran número de ligandos tanto cíclicos como acíclicos.

3. Uso de ionóforos en sensores ópticos

Se han utilizado diversos planteamientos para el desarrollo de sensores en los cuales se combina la selectividad que introducen los ionóforos con medidas de tipo óptico. Con ellos se trata de solucionar el problema que presentan estos ligandos; a saber, que la complejación no supone una gran variación de propiedades ópticas.

Podemos destacar los siguientes esquemas: a) Introducción en las moléculas de ionóforo partes cromogénicas o fluorogénicas de forma que se originen los llamados cromoionóforos o fluoroionóforos. La complejación origina una reorganización en la molécula e induce cambios en color o fluorescencia; b) Combinación de ionóforos con colorantes sensibles a potencial. La ubicación de un ionóforo selectivo para un ión dado a un lado de una membrana origina un cambio en el potencial de la membrana y, por tanto, en la distribución del colorante, originando así una respuesta óptica; por ejemplo una atenuación de fluorescencia por concentración; c) Extracción de iones en membranas usando ionóforos neutros; ese es el llamado mecanismo de cambio iónico; d) Extracción de un ión junto con un contraión en una membrana; ese es el conocido como mecanismo de coextracción⁵². A los dos últimos mecanismos son los que se denominan sistemas basados en un segundo componente ó sensores tipo Simon⁵³.

⁵¹ Spichiger-Keller, U. E., *Anal. Chim. Acta*, 400, 65 (1999).

⁵² Oehme, I. y Wolfbeis, O. S., *Mikrochim. Acta*, 126, 177 (1997).

⁵³ Spichiger-Keller, U. E. *Chemical Sensors and Biosensors for Medical and Biological Applications*, 1 ed.; Wiley-VCH: Weinheim, Capítulo 6, (1998).

3.1. Sensores basados en un segundo componente

En 1982 se reportó un tipo de sistema de dos fases que hacía uso de una membrana en una tira reactiva óptica, del tipo antes llamado de química seca, para la determinación de iones alcalinos en fluidos biológicos⁵⁴. Este tipo de optodo de química seca pertenecía al tipo, mencionado anteriormente, de basados en segundo componente, en el cual un indicador de pH se combina con un ionóforo para transducir la información producida por la interacción aceptor-huésped en una señal de tipo óptico. A este principio se denominó inicialmente de *heterogenous pH reaction*⁵⁵.

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

Este sistema fue patentado por Miles Inc. y comercializado bajo el nombre de analizador de química seca Seralyzer^{56,57}. Entre 1983 y 1986 tanto el instrumento como las tiras reactivas fueron evaluadas y el mecanismo en que se basan fue estudiado y discutido por el grupo del Prof. Simon en la ETH de Zurich (Suiza)⁵⁸. Dicho principio fue adaptado para optodos selectivos de iones, tanto de tipo sonda como de flujo, y usado para el desarrollo de gran número de membranas para diferentes iones metálicos^{59,60}.

⁵⁴ Charlton, S. C. y Fleming, R. L., Clin. Chem., 28, 1857 (1982).

⁵⁵ Rittersdorf, W., Guethlein, W., Thym, D. y Vogel, P., Method for the determination of an ion with increased sensitivity, use of substances which are suitable for this and a corresponding agent. Patente US 5,215,924 (1993).

⁵⁶ Gantzer, M. L., Hemmes, P. y Wong, D. Patente US Appl. 583,127 (1984).

⁵⁷ Gantzer, M. L., Hemmes, P. y Wong, Ion test means having a porous carrier matrix, EP 153,641 (1985).

⁵⁸ Spichiger-Keller, U. E. Chemical Sensors and Biosensors for Medical and Biological Applications, 1 ed.; Wiley-VCH: Weinheim, Capítulo 6, (1998).

⁵⁹ Bakker, E.; Buhlmann, P. y Pretsch, E., Chem. Rev., 97, 3083 (1997).

⁶⁰ Buhlmann, P.; Pretsch, E. y Bakker, E., Chem. Rev., 98, 1593 (1998).

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

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

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

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

un mecanismo de cambio iónico para analitos catiónicos y un mecanismo de extracción para aniónicos.

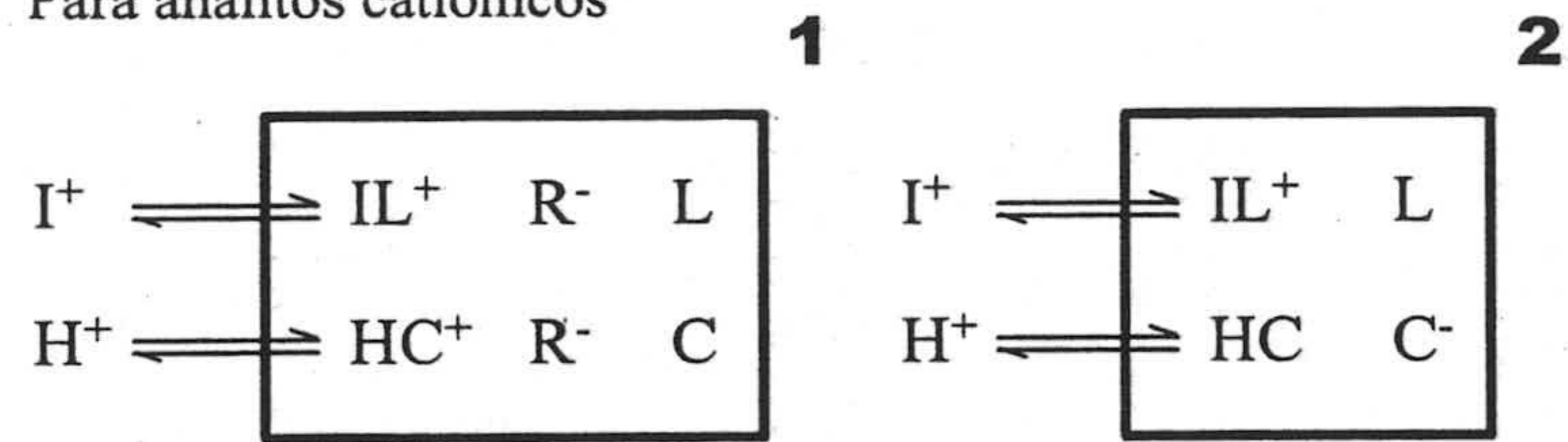
Brevemente vamos repasar los diferentes mecanismos de respuesta y el proceso involucrado en cada caso (Figuras 1.5 y 1.6). En el caso de membranas de cambio iónico basadas en un ionóforo L y un cromoionóforo C ambos neutros, se requiere la presencia simultánea de aniones lipofílicos R^- que proporcionen a la membrana propiedades de cambio iónico (Figura 1.5.1). Si el cromoionóforo selectivo de protones está de por sí cargado; esto es, está cargado negativamente cuando no está protonado y es neutro cuando está protonado, no se necesitan aniones lipofílicos en la membrana (Figura 1.5.2).

Si el ionóforo está cargado L^- se necesitarán posiciones iónicas R^+ en la membrana, caso de que el cromoionóforo esté cargado C^- (Figura 1.6.1), pero no serán necesarias con cromoionóforos neutros C (Figura 1.6.2). En el caso de que un mismo compuesto actúe como ionóforo y cromoionóforo, esto es, sería un cromoionóforo en sentido estricto; tanto el analito como el protón serían selectivamente complejados, pero solo uno de ellos induciría un cambio en la propiedad óptica (Figura 1.6.3).

De manera análoga a la anterior, en las membranas sensoras de aniones, basadas en equilibrio de coextracción, se pueden usar ionóforos neutros L y cromoionóforos cargados C^- , lo que a su vez exige el empleo de cationes lipofílicos R^+ (Figura 1.5.3) o bien, si el cromoionóforo C es neutro, no serán necesarios tales cationes lipofílicos (Figura 1.5.4). En el caso de que el ionóforo esté cargado L^+ serán necesarias posiciones aniónicas R^- en la membrana, siempre que el cromoionóforo no está cargado C (Figura 1.6.4) y no lo serán en caso contrario (Figura 1.6.5). Por último, membranas que solo contengan un cromoionóforo neutro pueden actuar como sensoras de aniones (Figura 1.6.6) aunque no coextraen aniones selectivamente, sino que muestran un esquema de selectividad tipo Hofmeister, esto es, la selectividad varía de acuerdo con la lipofilicidad del anión⁶¹.

⁶¹ Spichiger-Keller, U. E. *Chemical Sensors and Biosensors for Medical and Biological Applications*, 1 ed.; Wiley-VCH: Weinheim, Capítulo 3, (1998).

Para analitos catiónicos



Para analitos aniónicos

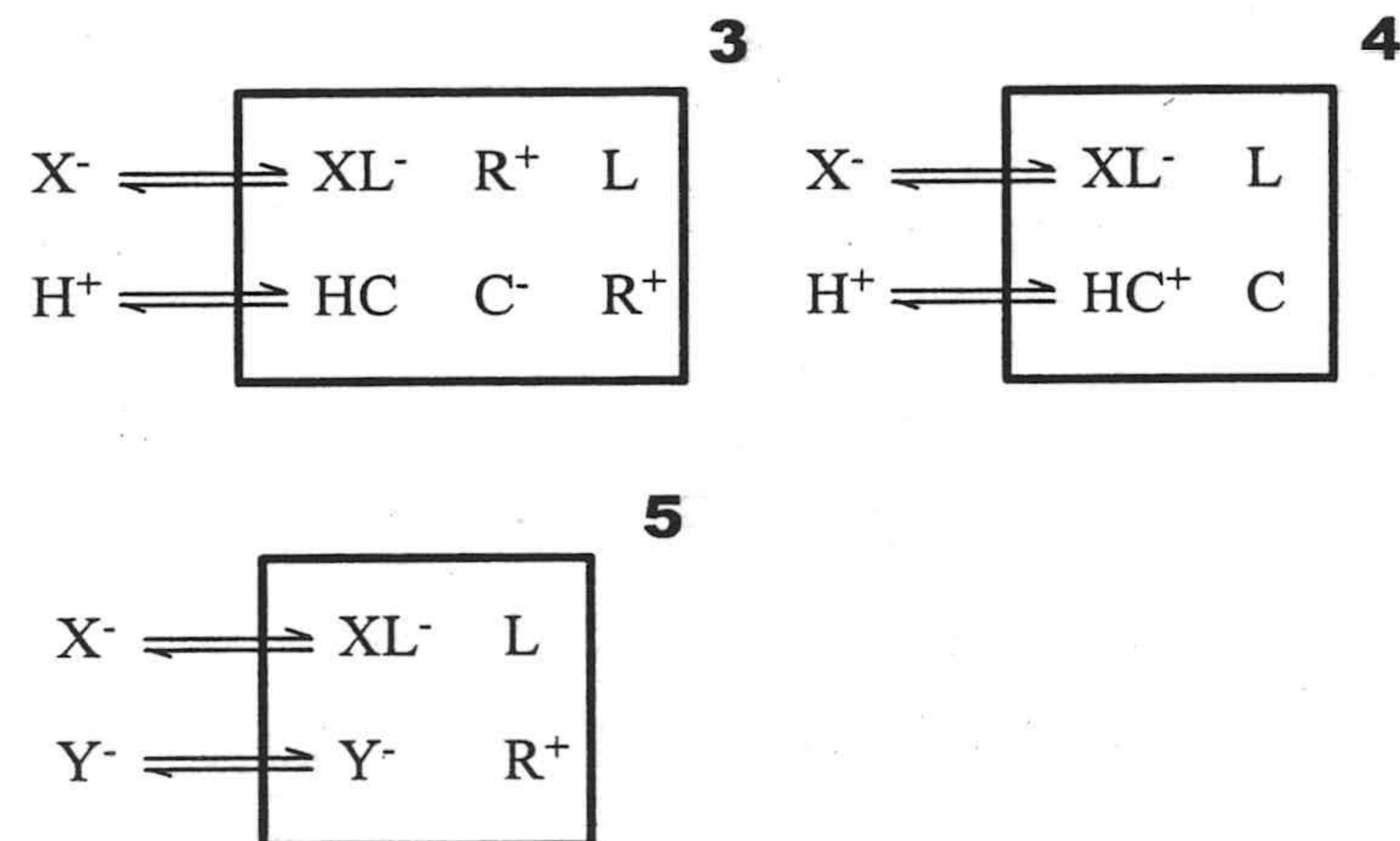
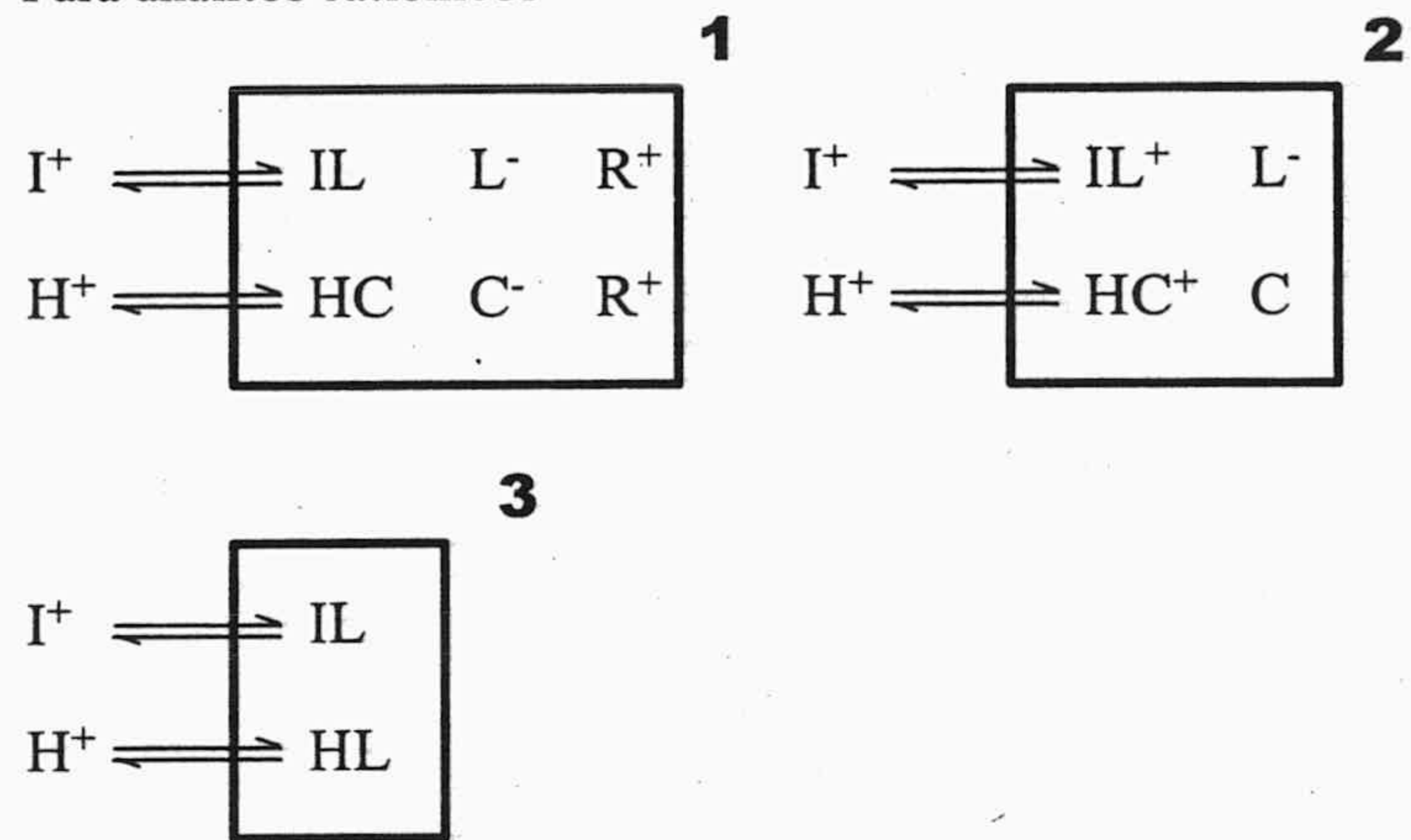


Figura 1.5. Tipos de membranas con ionóforo neutro

Para analitos catiónicos



Para analitos aniónicos

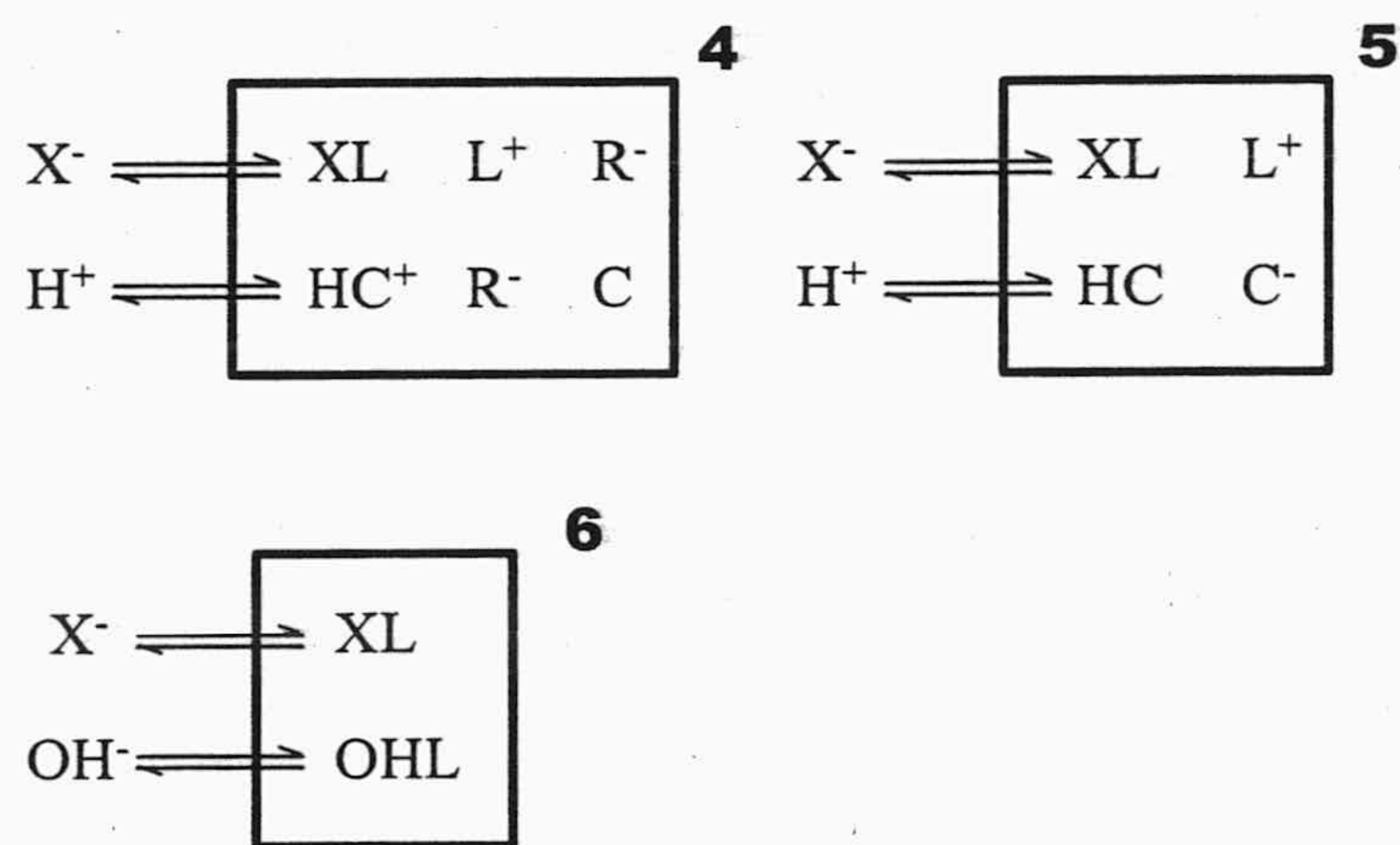


Figura 1.6. Tipos de membranas con ionóforo cargado

3.2. Sensores basados en un segundo componente para cationes

Vamos a desarrollar a continuación la teoría del mecanismo de cambio iónico que emplea ionóforos neutros, pues este tipo es el que se ha usado en esta Memoria de Doctorado, para la puesta a punto de tiras reactivas para iones alcalinotérreos. Este tipo de sensores ópticos tiene la característica de responder a la actividad del analito en contraste con otros métodos analíticos en los que se mide concentración total.

Como caso general, consideraremos que el analito es un ión I^{z+} que reacciona con un ionóforo neutro L de carácter lipofílico para originar el complejo IL_p^{z+} que se retendrá en la fase orgánica como par iónico $IL_p R_z$ con el anión lipofílico R^- . En la Figura 1.7 se muestra el modelo de tira reactiva basada en el uso conjunto de un ionóforo y un cromoionóforo básico en presencia de una sal de anión lipofílico necesaria para que se pueda dar el equilibrio de cambio iónico.

La extracción del analito desde la disolución problema a la tira reactiva se puede describir mediante un esquema de tres etapas: a) difusión del analito a través de la interfase de la muestra; b) transferencia de fase y proceso de complejación/descomplejación; y c) difusión de las especies a través de la membrana⁶².

Al introducir el sensor en una disolución que contiene el analito I^{z+} , y para mantener la electroneutralidad en la membrana, se produce un intercambio de cationes de forma que por cada carga positiva que entre en forma de analito para complejar con el ionóforo y originar IL_p^{z+} , debe salir otra carga positiva, y la única disponible es la ligada al cromoionóforo. Así como la entrada de analito no es perceptible, la salida de cargas positivas si es susceptible de transducción óptica mediante la variación de la absorbancia del cromoionóforo al desprotonarse.

⁶² Seiler, K. y Simon, W., Anal. Chim. Acta, 266, 73 (1992).

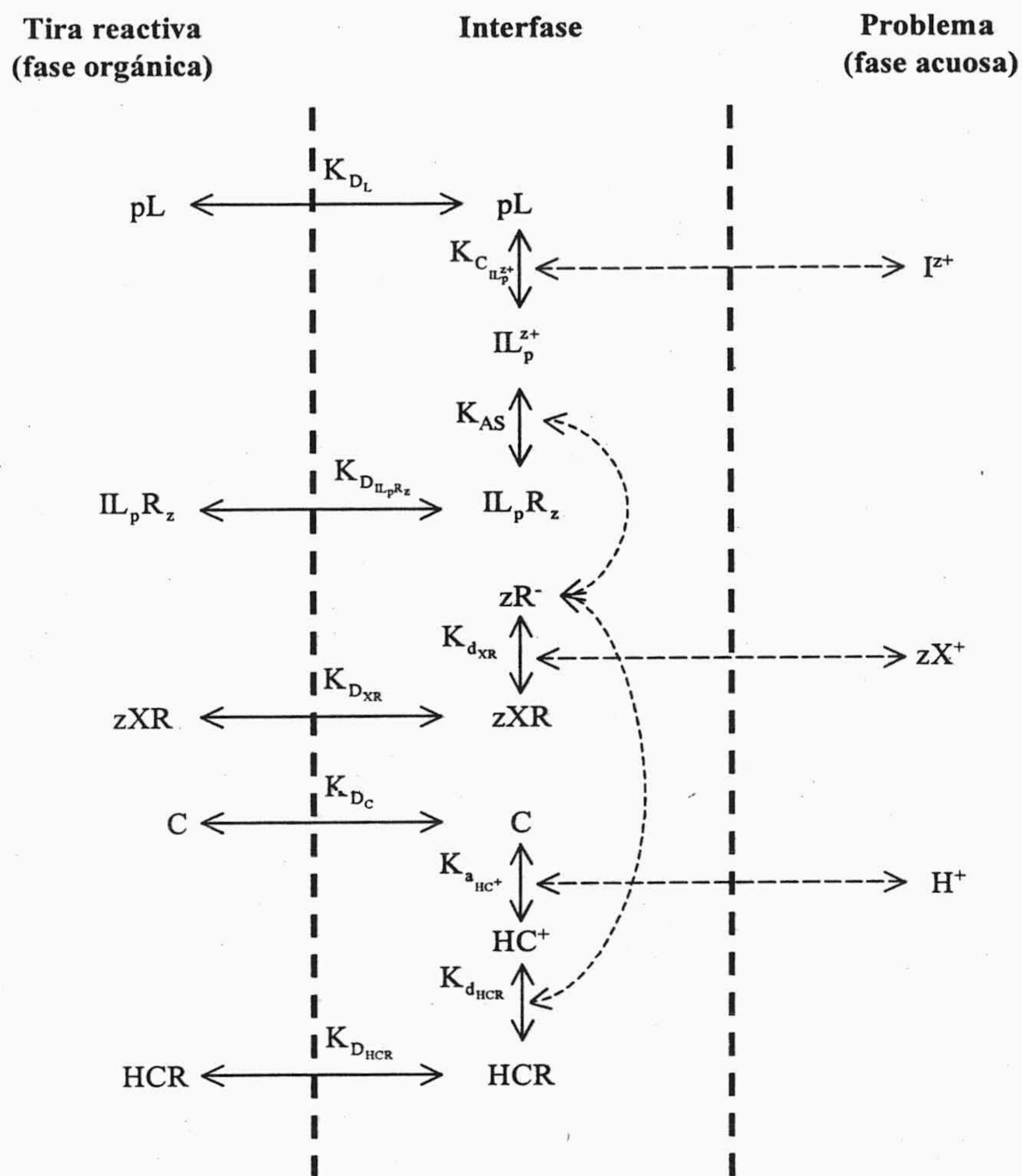
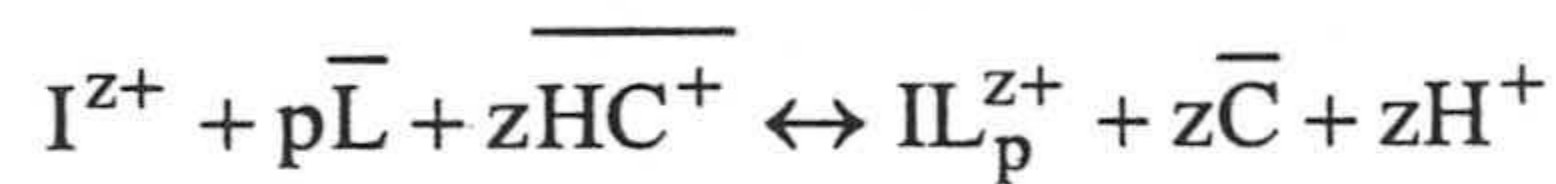


Figura 1.7. Modelo de tira reactiva basada en un ionóforo y un cromoionóforo básico

Los diferentes equilibrios involucrados según el modelo antes indicado en la Figura 1.7 se rigen por las siguientes constantes: constantes de distribución entre ambas fases del ligando K_{DL} , de la sal lipofílica K_{DzXR} , del complejo como par iónico $K_{DIL_pR_z}$, de la forma básica del cromoionóforo K_{DC} y de la forma ácida del cromoionóforo como par iónico K_{DHCR} ; constante global de formación del complejo $K_{C_{IL_p^{z+}}}$, constante de disociación de la sal lipofílica $K_{d_{zR^-}}$, constante de asociación del par iónico complejo-anión lipofí-

lico K_{AS} , constante de acidez del cromoionóforo $K_{a_{HC^+}}$, y constante de disociación del par iónico forma ácida del cromoionóforo- anión lipofílico $K_{d_{HCR}}$.

El equilibrio global de cambio iónico que tiene lugar entre la muestra y la tira reactiva será:



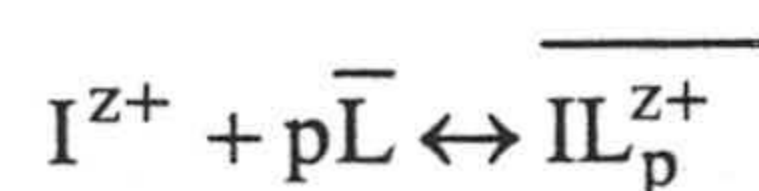
en el que no se han introducido los aniones lipofílicos ya que no intervienen en el intercambio de cargas, solo lo permiten. Ese equilibrio viene gobernado por la constante $K_e^{IL_p}$

$$K_e^{IL_p} = \frac{a_{H^+}^z [C]^z [IL_p^{z+}]}{a_{I^{z+}} [HC^+] [L]^p} \quad (1.10)$$

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

Esta constante $K_e^{IL_p}$ será función de la constante de estabilidad del complejo, de la constante de acidez del cromoionóforo y de las lipofilicidades relativas del analito $K_{I^{z+}}$ y del protón K_{H^+} .

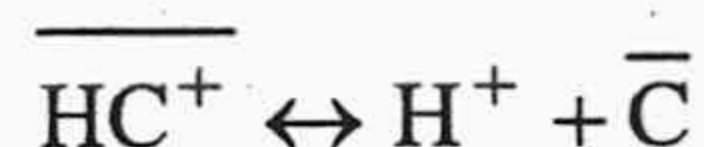
La constante de complejación se refiere al equilibrio:



y viene dada por $\beta_{IL_p^{z+}} = \frac{a_{IL_p^{z+}}}{a_{I^{z+}} a_L^p}$. Esta constante realmente simplifica el modelo formal que hemos presentado en la figura 1.7, aunque se relaciona con él de acuerdo con:

$$\beta_{IL_p^{z+}} = \frac{K_{DIL_pR_z} K_{AS} K_C K_{IL_p^{z+}} K_{dXR}^z}{K_{DL}^p K_{DXR}^z} \quad (1.11)$$

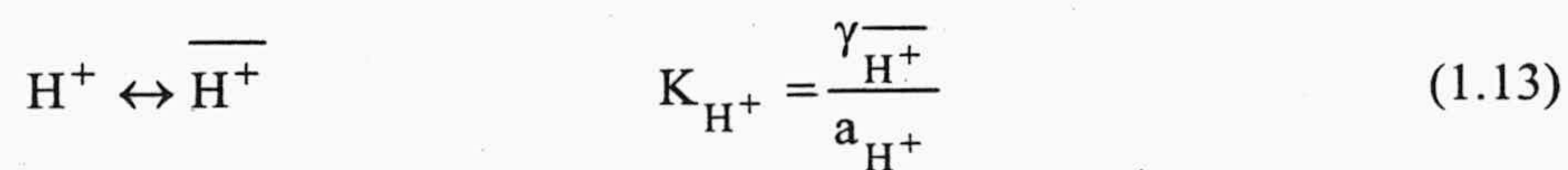
La constante de acidez del cromoionóforo, por su parte, responde al equilibrio:

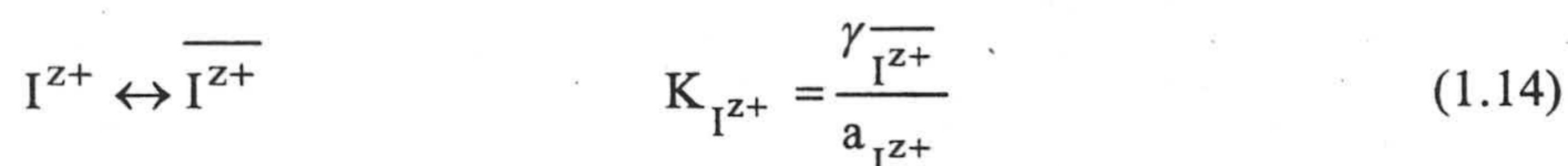


y viene dada por $K_a = \frac{a_{H^+} a_C}{a_{HC^+}}$. Como en el caso anterior también se relaciona con el modelo según:

$$K_a = \frac{K_{DC} K_{a_{HC^+}} K_{dHCR} K_{DXR}}{K_{dXR}} \quad (1.12)$$

Las lipofilicidades relativas del analito $K_{I^{z+}}$ y del protón K_{H^+} se pueden describir mediante a los equilibrios:





Si sustituimos actividades por las correspondientes concentraciones y coeficientes de actividad en las cuatro constantes que acabamos de definir y, a su vez, operamos en la $K_e^{IL_p}$ (ec. 1.10) resulta que la constante de intercambio se relaciona con las constantes de formación del complejo, de acidez del cromoionóforo y las lipofilicidades de los iones principal y de referencia, así como con los coeficientes de actividad en fase membrana, según:

$$K_e^{IL_p} = \frac{K_{I^{z+}} \beta_{IL_p^{z+}} K_a^z}{K_{H^+}^z} \left(\frac{\gamma_{HC^+}}{\gamma_C} \right)^z \frac{(\gamma_L)^z}{\gamma_{IL_p^{z+}}} \quad (1.15)$$

Como vemos las actividades de todas las especies involucradas controlan el equilibrio, pero solo la concentración del cromoionóforo será accesible a través de medidas ópticas. En consecuencia, es esencial que los coeficientes de actividad permanezcan constantes en todo el rango de medida. Para una membrana dada del tipo que estamos considerando, la fuerza iónica dentro de ella se debe mantener virtualmente constante, pues está definida por la concentración de sal lipofílica, lo que, de acuerdo con la teoría de Debye-Hückel, debe originar un coeficiente de actividad medio constante en fase membrana. En una primera aproximación, los coeficientes de actividad de las especies cargadas serán despreciables y el cambio en los coeficientes de actividad de las especies neutras se supone que será relativamente pequeño dentro del rango de calibración, si su concentración total se mantiene baja. Cuando la cantidad de alguno se incrementa, así de ionóforo por razones de selectividad, se observa un cambio en el coeficiente de actividad y, por tanto, en la constante de equilibrio

$K_e^{IL_p}$ ⁶³. Eso significa que las concentraciones en fase orgánica son proporcionales a las actividades. En resumen, la expresión anterior queda reducida a:

$$K_e^{IL_p} = \frac{K_{I^{z+}} \beta_{IL_p^{z+}} K_a^z}{K_{H^+}^z} \quad (1.16)$$

Para expresar la constante de equilibrio $K_e^{IL_p}$ en función de parámetros experimentales, realizaremos un balance de cargas en la membrana, llamando C_R a la concentración analítica de anión lipofílico:

$$C_R = [HC^+] + z[IL_p^{z+}] \quad (1.17)$$

y los correspondientes balances de masas respecto a ionóforo (C_L concentración analítica de ionóforo) y cromoionóforo (C_C concentración analítica de cromoionóforo):

$$C_L = [L] + p[IL_p^{z+}] \quad (1.18)$$

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

⁶³ Seiler, K.; Wang, K.; Bakker, E.; Morf, W. E.; Rusterholz, B.; Spichiger-Keller, U. E. y Simon, W., Clin. Chem., 37, 1350 (1990).

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

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

luego

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

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

Sustituyendo resulta:

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

Si combinamos las ecuaciones 1.16, 1.17, 1.18, 1.19 y 1.22 obtendremos la función respuesta de la membrana sensora para el ión I^{z+} :

$$K_e^{ILp} = \frac{1}{a_{I^{z+}}} \left(\frac{a_{H^+} \alpha}{1 - \alpha} \right)^z \frac{C_R - (1 - \alpha)C_C}{z \left(C_L - \frac{p}{z} (C_R - (1 - \alpha)C_C) \right)^p} \quad (1.23)$$

$$a_{I^{z+}} = \frac{1}{K_e^{ILp}} \left(\frac{a_{H^+} \alpha}{1-\alpha} \right)^z \frac{C_R - (1-\alpha)C_C}{z \left(C_L - \frac{p}{z} (C_R - (1-\alpha)C_C) \right)^p} \quad (1.24)$$

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

Si representamos la actividad del analito frente al grado de protonación según la ecuación citada obtendremos la curva representada en la. Figura 1.8, la cual no nos ofrece mucha información salvo que la usemos en forma logarítmica.

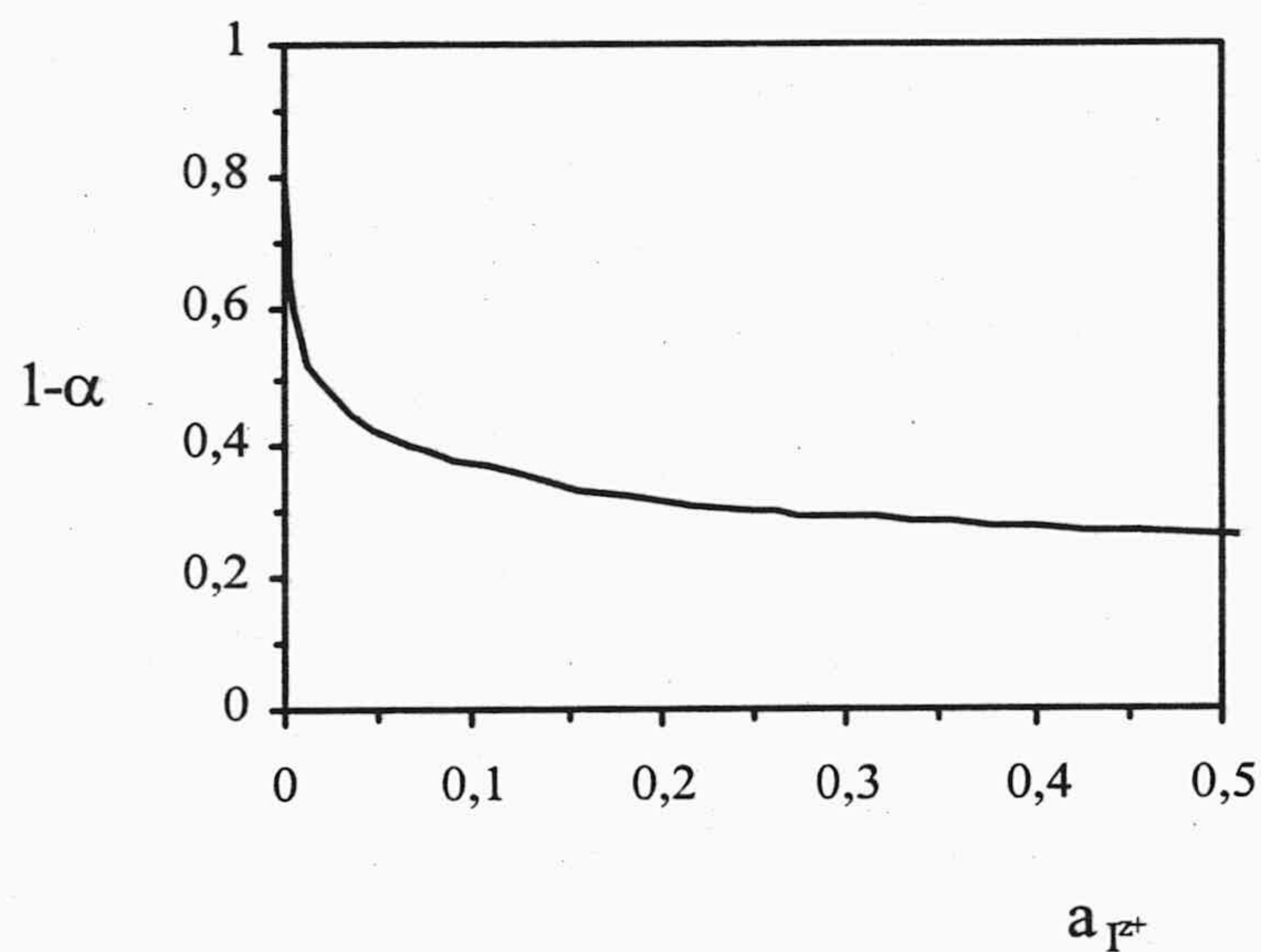


Figura 1.8. Actividad del analito vs. grado de protonación

Si tomamos logaritmos en la ecuación anterior y establecemos como variable independiente $\log a_{I^{z+}}$ y como variable dependiente $1-\alpha$ y las renombramos como X é Y, res-

pectivamente, llegamos a la ecuación 1.25, cuya inversa $Y=f(X)$ podemos observar en la Figura 1.9.

$$X = \log \left\{ \frac{1}{K_e^{ILp}} \left(\frac{a_{H^+} (1-Y)}{Y} \right)^z \frac{C_R - YC_C}{z \left(C_L - \frac{p}{z} (C_R - YC_C) \right)^p} \right\} \quad (1.25)$$

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

Esto es, resulta una respuesta, y en consecuencia un modelo de tipo sigmoideal, ya que usualmente se suele representar en función de $\log a_{I^{z+}}$ tal como se muestra en la Figura 1.9, pues como hemos dicho la variación de $1-\alpha$ con la actividad del analito no ofrece información interesante por el gran número de décadas que implica. Por ello, se usa la representación frente al logaritmo decimal de la actividad. Este modelo no tiene la sencillez de un modelo lineal, pero permite, de una manera fácil, la determinación experimental de la actividad del analito.

De manera similar se han desarrollado expresiones, que resultan ser análogas, para el caso de sensores basados en un segundo componente que utilizan en vez de un cromoionóforo, un fluoroionóforo, esto es un indicador ácido-base fluorescente de tipo lipofílico⁶⁴.

⁶⁴ Shortreed, M. R.; Bakker, E. y Kopelman, R., *Anal. Chem.*, 68, 2656 (1996).

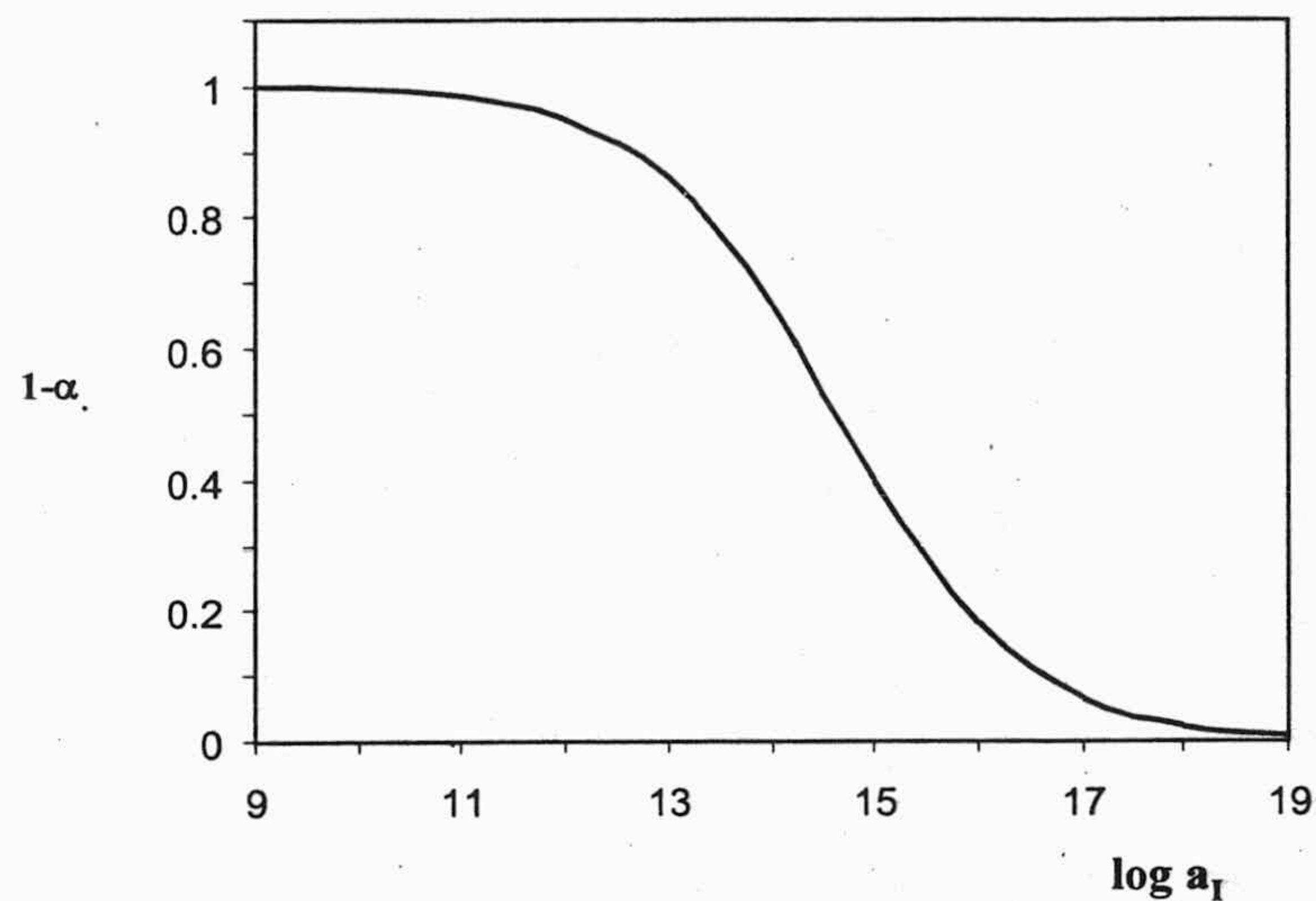


Figura 1.9. Modelo sigmoide de respuesta en sensores basados en un segundo componente

En algunas ocasiones el cromoióforo presente no se puede protonar de forma completa, lo que se puede deber a diversas causas, así por ejemplo que la concentración de cromoióforo sea mayor que la de sal lipofílica por razones de selectividad o bien a que el pH de trabajo no lo permita. Esto hace que no se pueda determinar A_0 y, por tanto, tampoco α como indica la ecuación 1.22. Para resolver el problema se utiliza un valor de α efectivo, α_{ef} , que señalará el grado de protonación en esas concretas condiciones de concentración de sal lipofílica o de pH⁶⁵. En la presente Memoria de Doctorado se usa de manera habitual α_{ef} por esta segunda razón, lo que nos permite conocer el grado de protonación con respecto a disoluciones reguladoras dadas:

$$1 - \alpha_{ef} = \frac{A - A_C}{A_{\text{tampón}} - A_C} \quad (1.26)$$

⁶⁵ Bakker, E.; Buhlmann, P. y Pretsch, E., Chem. Rev., 97, 3083 (1997).

3.2.1. Factores que influyen en la respuesta de los sensores basados en un segundo componente para cationes

Como hemos visto más arriba, en la ecuación 1.24, en los sensores para cationes basados en un segundo componente, la variable independiente, esto es la actividad del ión a analizar, se relaciona con la variable dependiente de tipo óptico $1-\alpha$ a través de unos parámetros (C_C , C_R , C_L , p , z , a_{H^+} , $K_e^{IL_p}$) que deberán permanecer constantes durante la realización de la medida y que influyen de diversa manera sobre la forma de la curva sigmoideal –de la misma manera que los parámetros a y b lo hacían sobre la función de calibrado en el modelo lineal-. Vamos a discutir a continuación la influencia de los factores anteriormente mencionados

Las concentraciones analíticas de ionóforo (C_L), cromoionóforo (C_C) y sal lipofílica (C_R) están relacionadas entre sí, por lo que para establecer su influencia usaremos el cociente de sus concentraciones. En la Figura 1.10 se muestra la influencia de la concentración analítica de ionóforo sobre la curva sigmoideal. En ella se han mantenido constantes todos los demás parámetros y se ha dado a los índices estequiométricos el valor 1. Observamos que cuando C_L/C_R es menor que 1, falta ionóforo y, en consecuencia, no entrarán en la membrana suficientes cargas positivas en forma de complejo IL_p^{z+} como para que salgan todos los protones ligados al cromoionóforo. Por ello, no será posible desplazar totalmente el cromoionóforo a su forma básica y $1-\alpha$, que es el grado de protonación del cromoionóforo, no llegará a anularse por completo y, en consecuencia, la curva sigmoideal no llega a tocar al eje de abscisas. Cuando C_L/C_R es ≥ 1 , suponiendo $C_R=C_C$, la curva apenas varía su morfología por el hecho de quedar ionóforo libre en el interior de la membrana sin intervenir en los equilibrios.

El efecto de la concentración de cromoionóforo se muestra en la Figura 1.11. Ahora ocurre que al haber un exceso de cromoionóforo solo se pueden complejar en tanto en cuanto hayan aniones lipofílicos suficientes para contrarrestar esas cargas positivas.

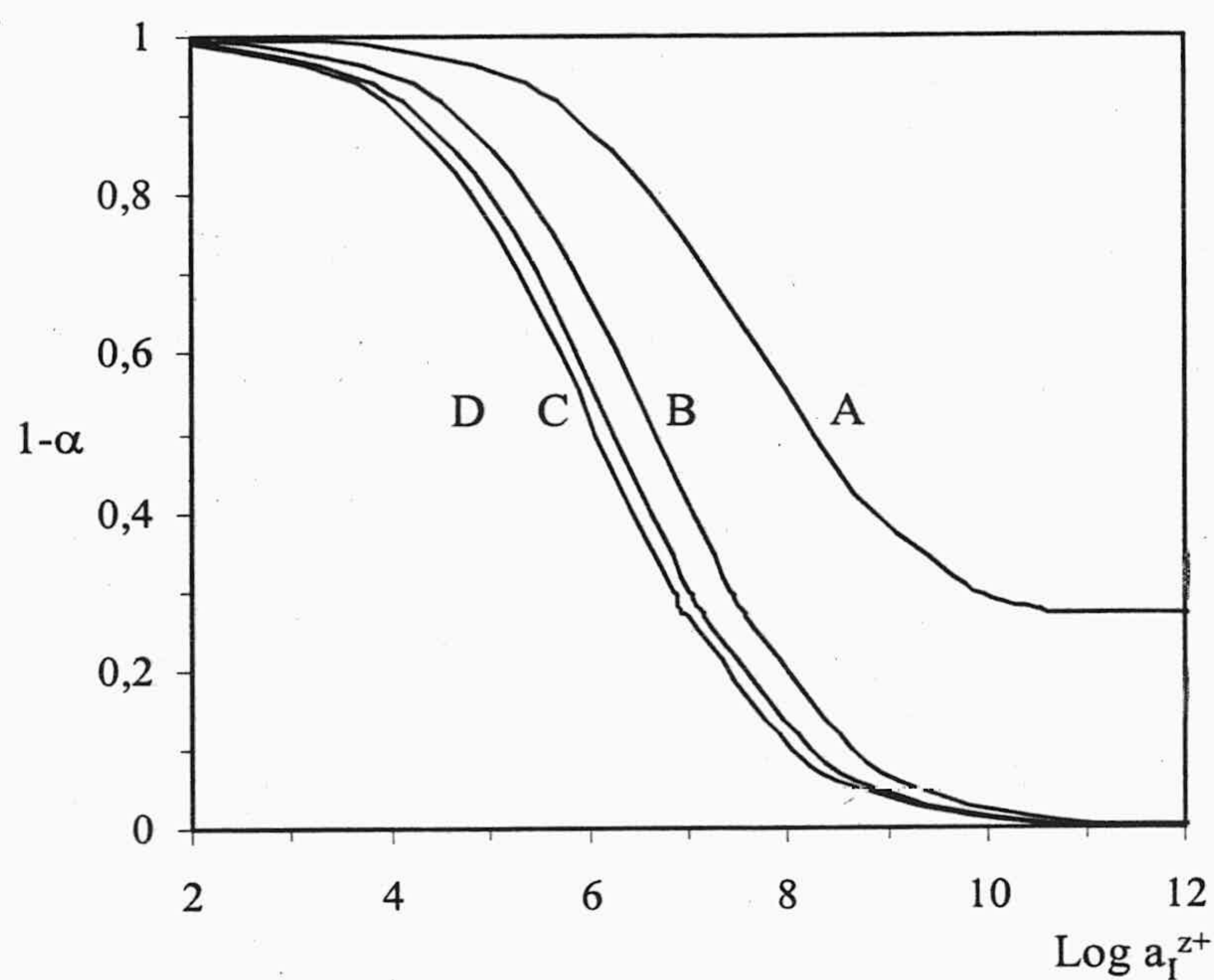


Figura 1.10. Influencia de la concentración de ionóforo. C_I sigue la secuencia $D > C > B > A$.

En el caso de la sal lipofílica (Figura 1.12) ocurren los dos fenómenos vistos con anterioridad, es decir, si hay defecto de aniones lipofílicos es como si hubiese exceso de cromoióforo y queda una fracción de este sin complejarse. Por el contrario, si están en exceso, entrarán tantas cargas positivas aportadas por el analito como ionóforo exista y además quedara cromoióforo complejoado –protonado– para compensar ese déficit de cargas positivas.

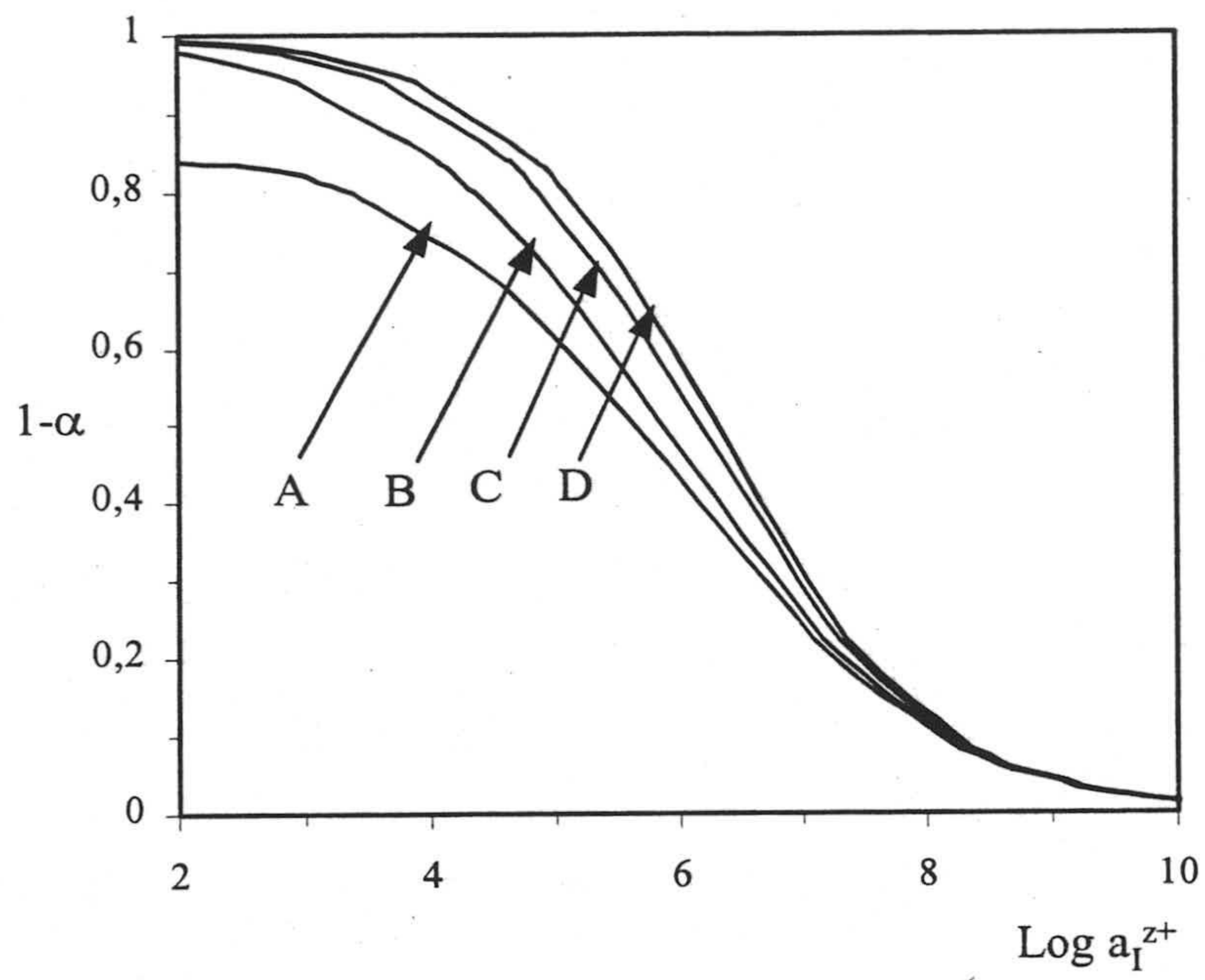


Figura 1.11. Influencia de la concentración de cromioionóforo. C_C crece según la secuencia $A > B > C > D$.

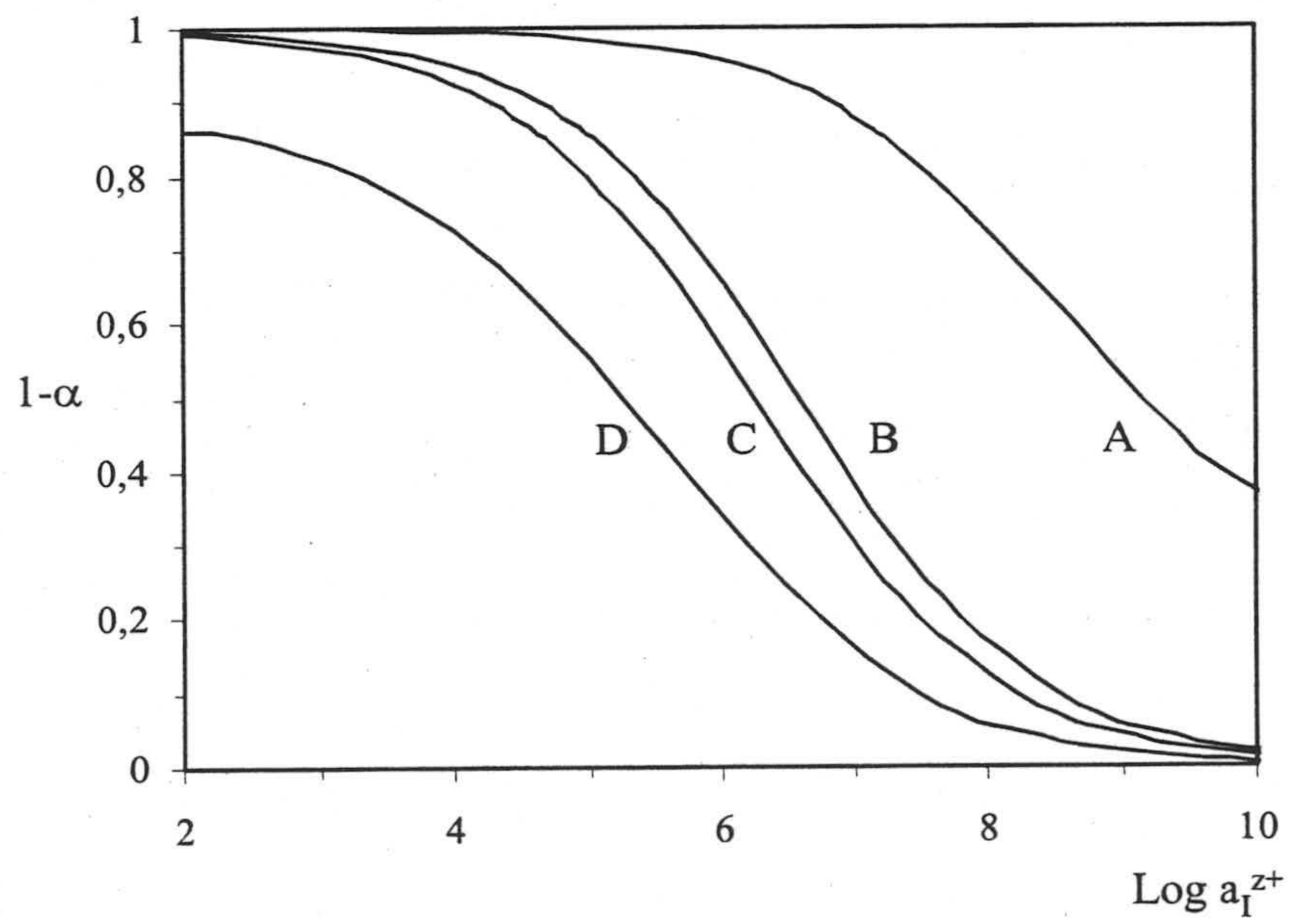


Figura 1.12. Influencia de la concentración de sal lipofílica. C_R crece según la secuencia $A > B > C > D$.

La influencia del valor de la constante de equilibrio global del proceso K_e^{ILp} en la morfología de la curva sigmoideal, es decir desde el punto de vista matemático y no químico, se muestra en la Figura 1.13, donde como vemos se observa un desplazamiento aunque sin alterar la forma de la curva, de manera que esta se desplaza a la derecha a medida que K_e^{ILp} aumenta. El equilibrio de cambio iónico se puede desplazar modificando el valor de la constante de la constante de intercambio, que como más arriba hemos visto depende de un conjunto de reacciones y procesos –ver ecuación 1.12-. Los principales factores usados para modificar esta constante son: seleccionar un nuevo ionóforo que origine un complejo de diferente constante de estabilidad y/o un nuevo cromoionóforo con diferente constante de acidez.

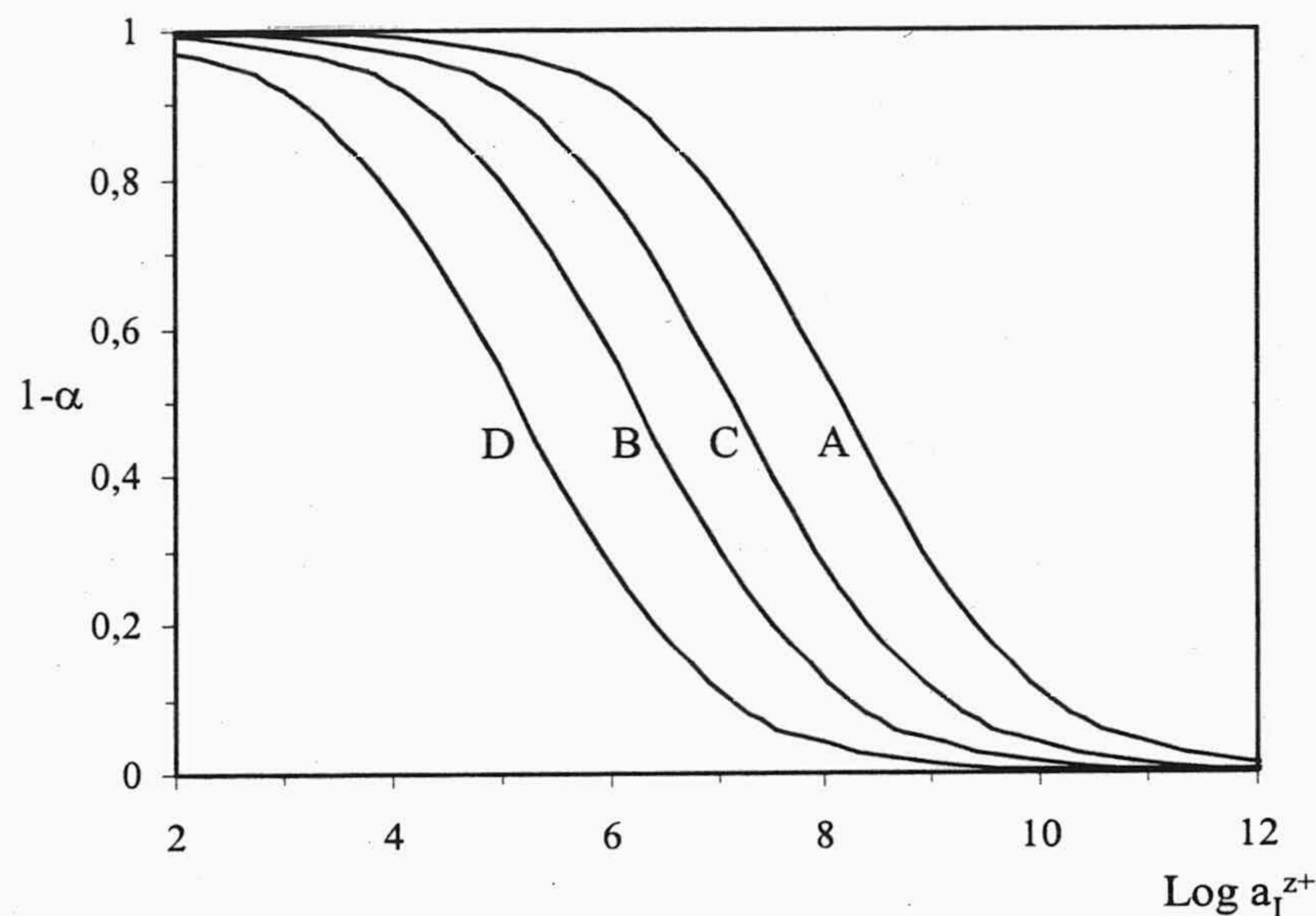


Figura 1.13. Influencia del valor de K_e^{ILp} sobre la forma de la curva sigmoideal. K_e^{ILp} crece según $A > B > C > D$.

La influencia del pH es muy considerable sobre la respuesta del sensor, pues esta depende del cociente de actividades analito/protón (Figura 1.14). Esto significa que para de-

terminar la concentración de analito, el pH se debe mantener constante y deberá ser conocido, por ejemplo mediante el uso de una disolución reguladora o bien deberá medirse la actividad protónica simultáneamente de manera independiente y exacta, así potenciométricamente. Por otra parte, esta dependencia del pH se puede utilizar con diferentes objetivos. Por ejemplo, se puede usar para ajustar el rango de respuesta del sensor para el analito de interés. Así, cuando el valor del pH se aproxima al del pK_a del cromoióforo el rango de respuesta del sensor se desplaza hacia menores concentraciones y cuanto más se aleja, el sensor responde a mayores concentraciones de analito. Por otra parte, la influencia del pH se puede utilizar para aumentar la selectividad del sensor para el analito de interés, como luego veremos. Así la selectividad de un sensor de este tipo hacia iones monovalentes se puede aumentar disminuyendo el pH de la muestra.

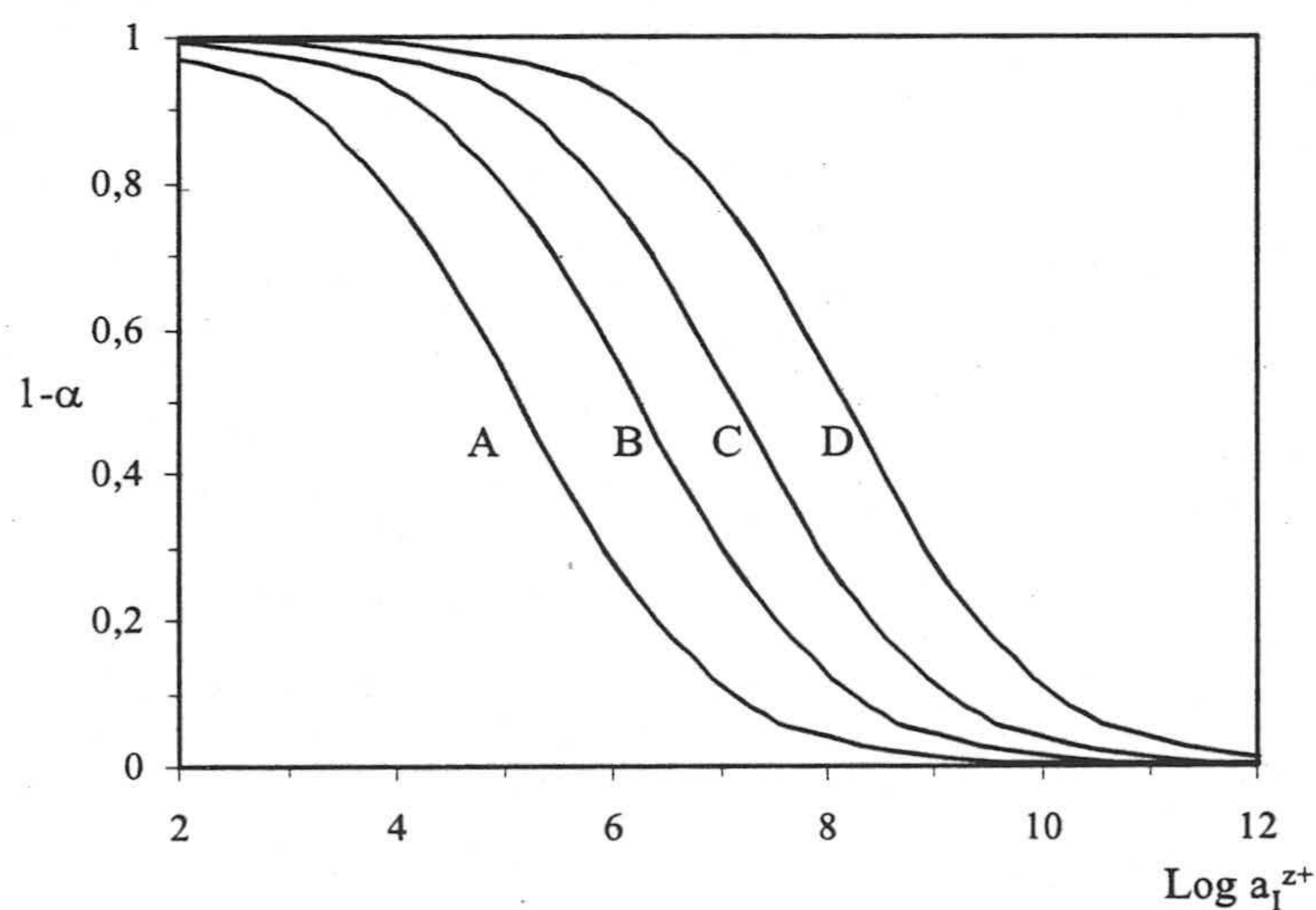


Figura 1.14. Efecto que produce la variación de a_{H^+} en la curva sigmoide. Donde los valores de a_{H^+} crecen según la secuencia $A > B > C > D$.

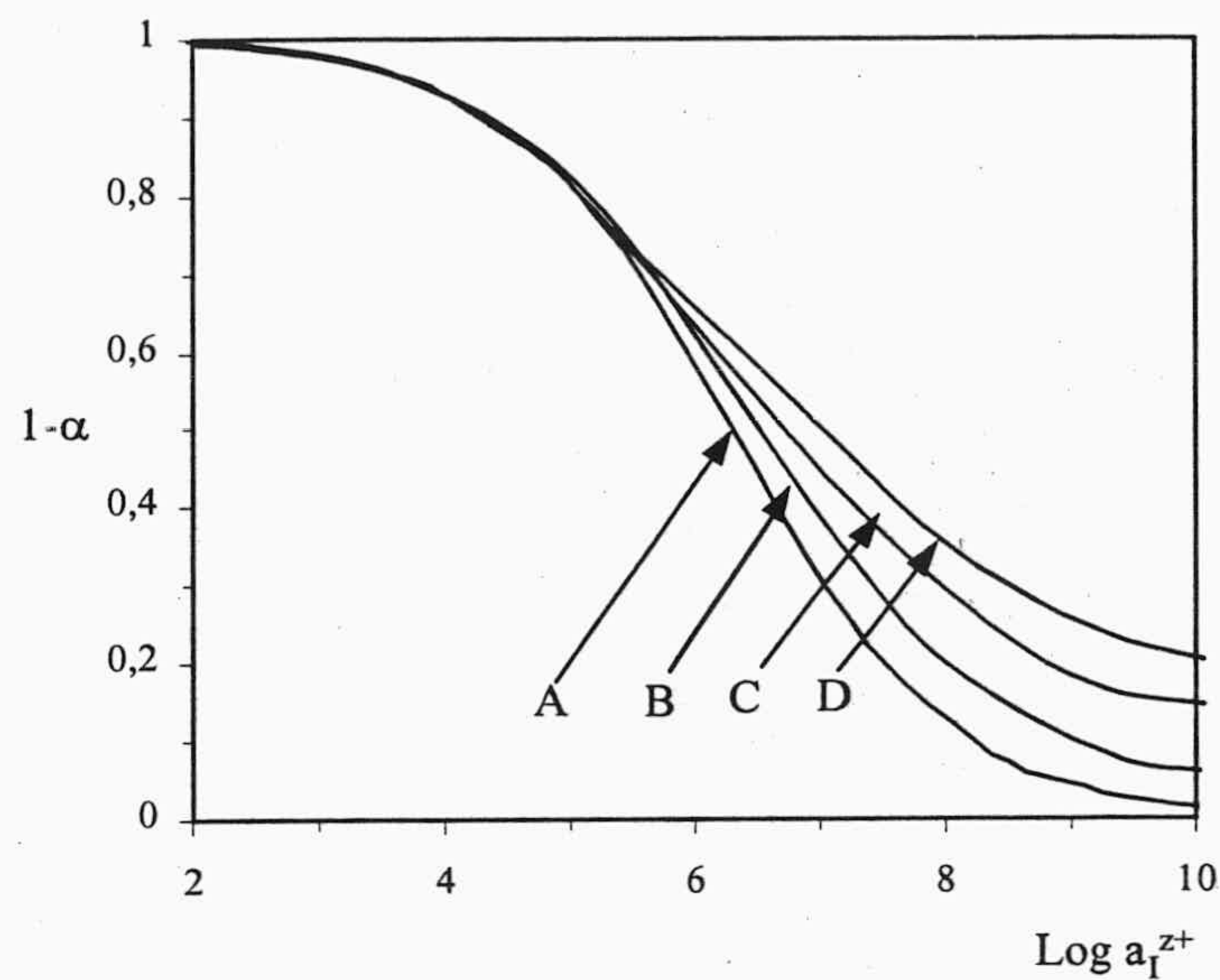


Figura 1.15. Influencia de la estequiometría sobre la forma de la curva sigmoideal. A: 4:1; B: 2:1; C: 1:1; D: 1:2 (M:L)

Quedan por comentar la influencia de dos factores, la estequiometría del complejo formado con el ionóforo, que viene dado por p , ya que la estequiometría del complejo del cromoionóforo con el protón la consideramos 1; y la carga del analito z , ya que la del ión de referencia –el protón– es 1.

La variación de estequiometría del complejo desplaza la función y modifica la pendiente tal como se ve en la Figura 1.15. La carga del analito, por el contrario, desplaza la función pero la modificación de la curva es de manera simétrica como muestra la Figura 1.16.

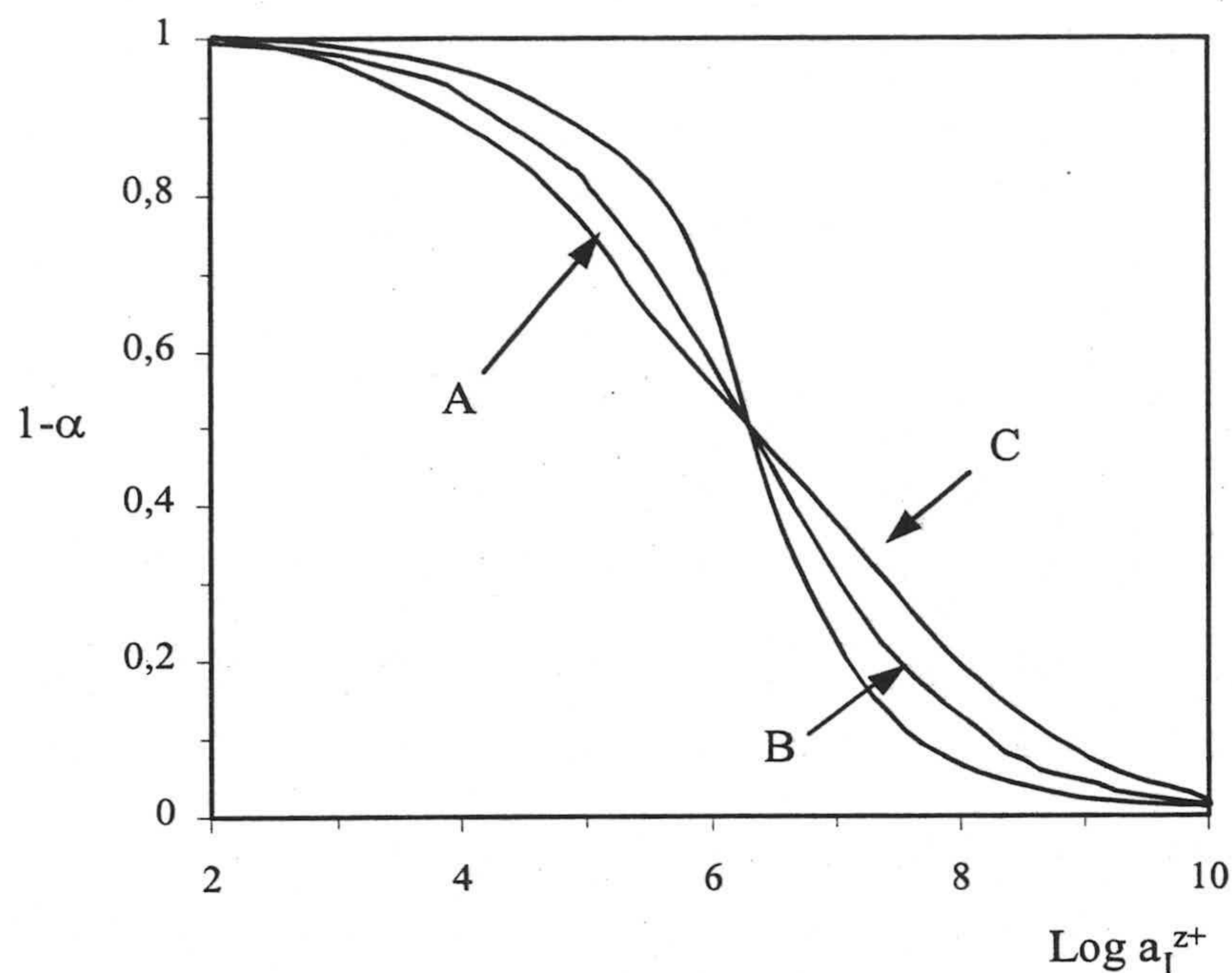


Figura 1.16. Influencia de la carga del analito sobre la forma de la curva sigmoideal

3.2.2. Selectividad en sensores basados en un segundo componente para cationes

Las diferentes características analíticas de los sensores de un solo uso serán definidas y comentadas más adelante en los capítulos correspondientes de esta Memoria de Doctorado. Ahora solo vamos a tratar un aspecto, la selectividad, por la gran importancia que tiene en el desarrollo de sensores en general y de tiras reactivas en particular. Se denomina selectividad, a la capacidad de una membrana sensora para extraer información relacionada exclusivamente con el analito o una clase de analitos y para discriminar especies interferentes que respondan originando el mismo tipo de señal. Se define mediante el coeficiente de selectividad K_{ij}^{opt} , en forma análoga a los sensores de tipo electroquímico. Así, un coeficiente de selectividad de 0,01 significa que la especie interferente es discriminada por un factor de 100 y que

esta especie contribuye en un 1% a la señal del analito si ambos, analito e interferente, están presentes con la misma actividad ⁶⁶.

Vamos a suponer que junto con el analito -el ión I^{z+} - se encuentra presente el ión interferente J^{v+} que reacciona con el ionóforo L originando el complejo JL_q^{v+} . De manera análoga a lo ocurrido con el analito podremos definir una constante de intercambio K_e^{JLq} :

$$K_e^{JLq} = \frac{a_{H^+}^v [C]^v [JL_q^{v+}]}{a_{I^{v+}} [HC^+] [L]^q} \quad (1.27)$$

Si solo ocurriera intercambio entre J^{v+} y H^+ , la actividad en J^{v+} vendría dada por una función respuesta para un solo ión análoga a la ecuación 1.24:

$$a_{J^{v+}} = \frac{1}{K_e^{JLq}} \left(\frac{a_{H^+} \alpha}{1 - \alpha} \right)^v \frac{C_R - (1 - \alpha)C_C}{v \left(C_L - \frac{q}{v} (C_R - (1 - \alpha)C_C) \right)^q} \quad (1.28)$$

Si, por el contrario, se encontraran presentes I^{z+} y J^{v+} en la disolución problema y compitieran por el mismo ionóforo presente en la membrana sensora para originar los complejos IL_p^{z+} y JL_q^{v+} , los balances de carga y masa quedarían:

$$C_R = [HC^+] + z[IL_p^{z+}] + v[JL_q^{v+}] \quad (1.29)$$

⁶⁶ Spichiger-Keller, U. E., *Chemical Sensors and Biosensors for Medical and Biological Applications*, 1 ed.; Wiley-VCH: Weinheim, Capítulo 4, (1998).

$$C_L = [L] + p[IL_p^{z+}] + q[JL_q^{v+}] \quad (1.30)$$

Suponiendo que las estequiometrias de ambos complejos son 1:1, esto es IL^{z+} y JL^{v+} , se pueden deducir expresiones para la distribución de ionóforo libre $[L]$ y complejo IL^{z+} dentro de la membrana, al objeto de obtener la función respuesta para el ión primario I^{z+} en presencia del ión interferente J^{v+} ⁶⁷.

Si a partir de la ecuación 1.27 se define la fracción de complejo con el ión interferente χ como:

$$\chi = \frac{[JL^{v+}]}{L} = K_e^{JL} \left(\frac{[HC^+]}{[C]a_{H^+}} \right)^v a_{J^{v+}} \quad (1.31)$$

y si se combina con las ecuaciones 1.26 y 1.28 resulta:

$$[IL^{z+}] = \frac{1}{z} (C_R - [HC^+]) - \frac{v}{z} \chi [L] \quad (1.32)$$

Por otra parte usando las ecuaciones 1.27 y 1.32 para resolver la ecuación 1.30, obtenemos:

⁶⁷ Bakker, E. y Simon, W., Anal. Chem., 64, 1805 (1992).

$$[L] = \frac{C_L - \frac{1}{z}(C_R - [HC^+])}{1 + \left(1 - \frac{v}{z}\right)\chi} \quad (1.33)$$

Operando a partir de la ecuación 1.27, 1.32 y 1.33 resulta la función respuesta para el ión primario I^{z+} en presencia del ión interferente J^{v+}

$$a_{I^{z+}} + k_{IJ}^{opt} a_{J^{v+}} = \frac{1}{K_e^{ILp}} \left(\frac{a_{H^+} \alpha}{1 - \alpha} \right)^z \frac{C_R - (1 - \alpha)C_C}{z \left(C_L - \frac{1}{z}(C_R - (1 - \alpha)C_C) \right)} \quad (1.34)$$

siendo el factor de selectividad k_{ij}^{opt}

$$k_{IJ}^{opt} = \frac{v}{z} \frac{K_e^{JLq}}{K_e^{ILp}} \left(\frac{a_{H^+} \alpha}{1 - \alpha} \right)^{z-v} \frac{C_L - \frac{1}{v}C_R - (1 - \alpha)C_C}{C_L - \frac{1}{z}C_R - (1 - \alpha)C_C} \quad (1.35)$$

Teniendo en cuenta las ecuaciones 1.24 y 1.28 podemos simplificar la ecuación 1.35 como:

$$k_{IJ}^{opt} = \frac{a_{I^{z+}}}{a_{J^{v+}}} \quad (1.36)$$

La anterior ecuación 1.34 es exacta cuando hay exceso de ionóforo y la estequiometría de los complejo es 1:1, pero, en el caso de que las estequiometrias sean superiores y/o diferentes, esta aproximación se pueden generalizar de la forma⁶⁷.

$$a_{I^{z+}} + \sum_j k_{IJ}^{\text{opt}} a_{J^{v+}} = f(a_{I^{z+}}) = \frac{1}{K_e^{\text{ILp}}} \left(\frac{a_{H^+} \alpha}{1-\alpha} \right)^z \frac{C_R - (1-\alpha)C_C}{z \left(C_L - \frac{p}{z} (C_R - (1-\alpha)C_C) \right)^p} \quad (1.37)$$

donde:

$$k_{IJ}^{\text{opt}} = \frac{a_{I^{z+}}}{a_{J^{v+}}} = \frac{v}{z} \frac{K_e^{\text{JLq}}}{K_e^{\text{ILp}}} \left(\frac{a_{H^+} \alpha}{1-\alpha} \right)^{z-v} \frac{\left(C_L - \frac{q}{v} C_R - (1-\alpha)C_C \right)^q}{\left(C_L - \frac{p}{z} C_R - (1-\alpha)C_C \right)^p} \quad (1.38)$$

Tal como indica la ecuación 1.36 en forma logarítmica:

$$\log k_{IJ}^{\text{opt}} = \log(a_{I^{z+}}) - \log(a_{J^{v+}}) \quad (1.39)$$

el coeficiente de selectividad se puede estimar gráficamente^{67,68,69} representando las funciones respuesta obtenidas para cada ión I^{z+} y J^{v+} por separado, esto es $(1-\alpha)$ vs $\log a_M$ ($M = i, j$). Si el pH se mantiene constante, el coeficiente de selectividad viene dado por la distancia horizontal entre las dos curvas para un grado de protonación dado tal como lo muestra la Figura 1.17 (distancia d). Este procedimiento de cálculo de los coeficientes de selectividad es el denominado método de las disoluciones separadas.

⁶⁸ Lerchi, M., Bakker, E., Rusterholz, B. y Simon, W., Anal. Chem., 64, 1534 (1992).

⁶⁹ Lerchi, M., Reitter, E., Simon, W., Pretsch, E., Chowdhury, A. y Kamata, S., Anal. Chem., 66, 1713 (1994).

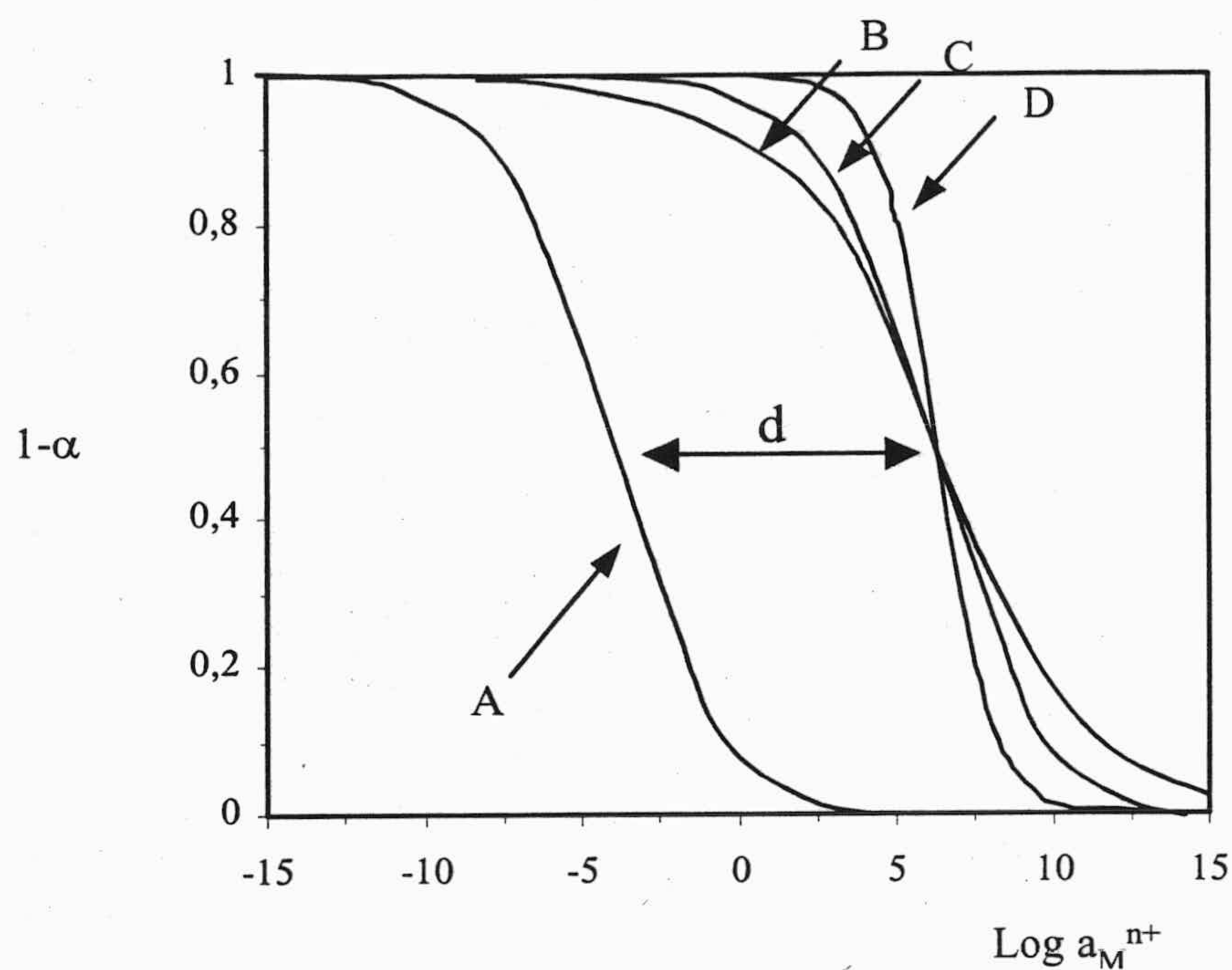


Figura 1.17. Influencia de la carga del ión interferente sobre la medida del coeficiente de selectividad. B, C y D son las curvas teóricas de interferentes con distintas cargas y A es la curva teórica del analito

Si observamos la ecuación 1.39 comprobaremos que el coeficiente de selectividad es función del grado de protonación ($1-\alpha$). Por lo tanto para poder comparar coeficientes de selectividad de diferentes interferentes, debemos de normalizar ese parámetro refiriéndolo siempre al mismo valor. Para ello, tomamos como valor fijo $1-\alpha = 0,5$, ya que para ese valor no influye la carga del ión interferente, aunque si influye la estequiometría.

En el caso que el ión interferente tenga la misma carga que el analito ($z=v$) y forme complejo de igual estequiometría con el ionóforo ($p=q$), la ecuación 1.39 queda reducida a:

$$k_{IJ}^{\text{opt}} = \frac{a_{I^{z+}}}{a_{J^{v+}}} = \frac{K_e^{JLq}}{K_e^{ILp}} \quad (1.40)$$

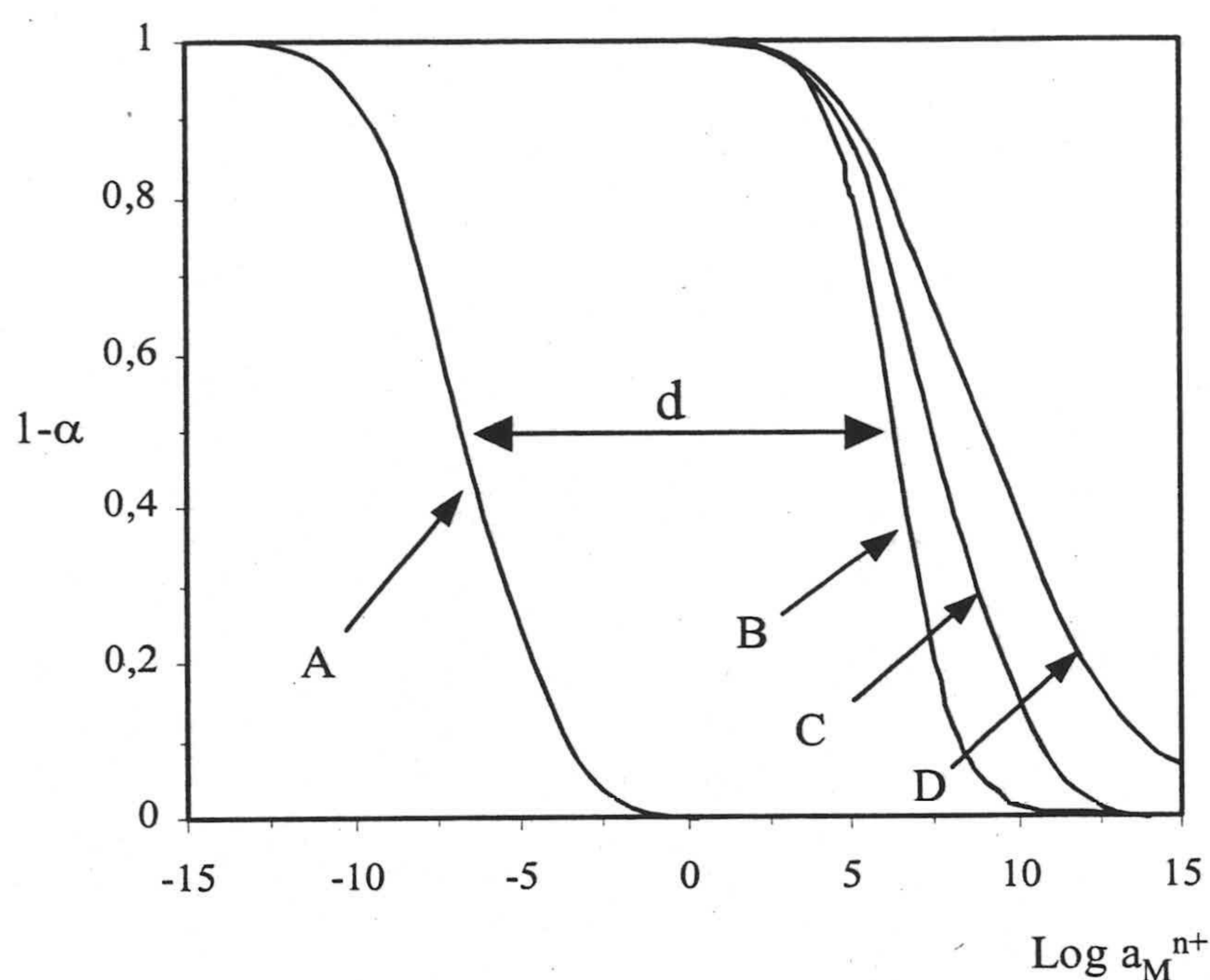


Figura 1.18. Influencia de la estequiometría del ión interferente sobre la medida del coeficiente de selectividad. B, C y D son las curvas teóricas de interferentes con distintas estequiometrías y A es la curva teórica del analito

Para iones de carga diferente, el factor de selectividad k_{IJ}^{opt} depende considerablemente del pH de la muestra y del grado de protonación del cromoionóforo, lo cual presenta ventajas de cara a la optimización de una membrana sensora dada, aunque, por otra parte, hace que la comparación de datos de selectividad sea difícil. Una solución es formular los coeficientes de selectividad de sensores para cationes basados en intercambio iónico, de forma análoga a los coeficientes de Nicolskii para electrodos selectivos de iones⁷⁰. De acuerdo con la teoría de Nicolskii-Eisenman el término de actividad de la ecuación de Nernst se sustituye por la suma de actividades de los iones presentes ponderadas con los coeficientes de selectividad

⁷⁰ Bakker, E.; Buhlmann, P. y Pretsch, E., Chem. Rev., 97, 3083 (1997).

$$K_{IJ}^{\text{opt}} = \left(k_{IJ}^{\text{opt}} \right)^{v/z} a_{I^{v+}}(I)^{1-(v/z)} \quad (1.41)$$

donde $a_{I^{v+}}(I)$ es la actividad del ión primario en la muestra sin interferencia de otros iones de la muestra. Si sustituimos en la ecuación 1.41 las ecuaciones 1.26 y 1.39 resulta:

$$K_{IJ}^{\text{opt}} = \frac{\left\{ vK_e^{JLq} \left(C_L - \frac{q}{v} (C_R - (1-\alpha)C_C) \right)^q \right\}^{z/v}}{zK_e^{ILp} \left(C_L - \frac{p}{z} (C_R - (1-\alpha)C_C) \right)^p} \{ C_L - (1-\alpha)C_C \}^{1-(z/v)} \quad (1.42)$$

Este coeficiente de tipo Nicolskii se puede determinar experimentalmente mediante el método de las disoluciones separadas, midiendo independientemente la actividad de ión primario y de ión interferente que inducen un valor de α determinado. Esas dos actividades, junto con sus respectivos valores de pH, denotados con (I) y (J) si son diferentes, se introducen en la ecuación:

$$K_{IJ}^{\text{opt}} = \frac{a_I(I)}{a_J(J)^{z/v}} \left(\frac{a_H(J)}{a_H(I)} \right)^z \quad (1.43)$$

Este coeficiente es igual, si el pH es igual para ambos iones, al coeficiente de Nikolskii definido para electrodos selectivos de iones

$$K_{IJ}^{\text{pot}} = \frac{a_I(I)}{a_J(J)^{z/v}} \quad (1.44)$$

Sin embargo, y a diferencia de lo que ocurre en electrodos selectivos de iones, el coeficiente de selectividad es dependiente de la señal medida (α), debido a que los cambios en absorbancia o fluorescencia medidos están acoplados a cambios en la concentración de la especie activa dentro de la membrana sensora, tal como se ve en la Figura 1.17 y Figura 1.18. Como solución se suele definir el valor de K_{IJ}^{opt} para un valor de α determinado, generalmente 0,5. Por esta razón, es habitual que las selectividades en sensores ópticos se expresen como k_{IJ}^{opt} junto con los valores de K_e determinados, pues son suficientes para una completa caracterización de la selectividad de un sensor dado.

3.2.3. Ionóforos y otros componentes de la membrana

Para que un compuesto actúe como ionóforo y sea capaz de transportar iones a través de una membrana por un gradiente de potencial, es necesario un balance entre las energías libres de interacción ión-ligando y de hidratación del ión. La selectividad de un ión dado, definida por la constante de intercambio, K_{IJ} , de los iones I y J en equilibrio entre una fase acuosa y orgánica, generalmente corresponde a diferencias de energía libre del orden de pocas decenas de kJ/mol, mientras que las energías libres de hidratación y complejación dentro de cada fase se encuentran entre cientos y miles de kJ/mol. Esto significa que la selectividad para un ión supone una pequeña diferencia de energía entre dos grandes efectos.

Inicialmente, se pensó que para que un ionóforo pudiera actuar era necesario que la energía libre de complejación fuera del mismo orden de magnitud que la de hidratación, lo que no es correcto, pues la concentración total de cationes en la membrana no viene determinada por la fuerza de la interacción catión-ligando, sino por la cantidad de aniones incorporados a la membrana y que permanecen en ella debido a su lipofilidad. El rango adecuado de constantes de formación de complejos en la membrana cubre varios órdenes de magnitud,

así para una estequiometría 1:1 desde 10^4 hasta 10^9 kg/mol⁷¹. El límite inferior viene dado por la necesidad de que los iones se encuentren predominantemente en forma complejada, mientras que el superior está determinado por el hecho de que los contraiones de la muestra no entren en la membrana sensora, pues la coextracción del analito junto con su contraión a la membrana sensora deteriora la respuesta tanto de sensores ópticos como potenciométricos. Para un ligando dado, el límite de coextracción está influenciado por la actividad del ión a medir y por la lipofilicidad del contraión de la muestra, así como por la composición de la membrana. Si los complejos son muy estables puede ocurrir interferencia de iones muy hidrofílicos así como si la concentración de sitios iónicos en la membrana es baja^{72,73,74}.

La selectividad en sensores tanto eléctricos como ópticos está definida por las constantes de intercambio, las cuales dependen de las energías libres estándar de los respectivos iones en fase acuosa y orgánica así como de la selectividad de la complejación. Esta última, se puede modificar en cierta extensión mediante la elección de un adecuado plastificante, aditivo aniónico y polímero matriz para la fase orgánica. No obstante, la forma más adecuada para obtener sensores muy selectivos es usar ligandos que complejen fuertemente al analito y solo débilmente a los demás.

En interacciones huésped-aceptor se considera que una buena estabilidad requiere una considerable preorganización de acuerdo con el principio de que "cuanto más organizados estén los huéspedes y los aceptores para la unión y menor solvatación previa a la complejación tenga que ocurrir, tanto más estables serán los complejos"⁷⁵. Este principio se puede considerar bajo diferentes aspectos. Bajo el punto de vista geométrico, un ligando se puede considerar preorganizado si su estructura se parece a la de sus complejos. Bajo el punto de vista termodinámico, significa que la diferencia de energía libre entre las conformaciones de

⁷¹ Bakker, E., Willer, M., Lerchi, M., Seiler, K. y Pretsch, E. *Anal. Chem.*, 66, 516 (1994).

⁷² Bühlmann, P., Yajima, S., Tohda, K. y Umezawa, Y., *Electrochim. Acta*, 40, 3021 (1995).

⁷³ Toth, K., Lindner, E., Pungor, E., Zippel, E. y Kellner, R., *Fresenius J. Anal. Chem.*, 331, 448 (1988).

⁷⁴ Thoma, A. P., Viviani-Nauer, A., Arvanitis, S., Morf, W. E. y Simon, W., *Anal. Chem.*, 49, 1567 (1977).

⁷⁵ Cram, D. J. y Lein, G.M., *J. Am. Chem. Soc.*, 107, 3657 (1985).

las dos formas es pequeña, incluso aún cuando sus geometrías sean muy diferentes, como es el caso de la valinomicina que se puede considerar preorganizada a pesar de que su estructura cambia sustancialmente por complejación^{76,77}. De la misma manera, gran número de ionóforos no macrocíclicos muy selectivos no muestran una considerable preorganización geométrica. De forma general, los ligandos usados en sensores deben poseer gran flexibilidad conformacional, esto es, una limitada preorganización geométrica, al objeto de garantizar una cinética rápida. Así se ha demostrado que la muy rápida complejación, próxima al límite impuesto por la difusión, entre iones alcalinos y ionóforos de tipo antibiótico, se justifica suponiendo que las moléculas de agua solvatantes se reemplazan paso a paso por las posiciones de coordinación del ionóforo⁷⁸. En el caso de la valinomicina, se demuestra que la etapa limitante de velocidad, es el cambio conformacional del ligando que tiene lugar durante la sustitución de moléculas del solvato de la esfera de coordinación del metal por los grupos coordinantes del ligando flexible⁷⁹.

No solo pueden actuar de ionóforos los compuestos capaces de formar complejos, ya que se puede usar cualquier reacción reversible que involucre la formación de enlaces covalentes, siempre que el equilibrio se alcance de forma suficientemente rápida. Esto ocurre con el sensor óptico usado para la determinación de SO₂ basado en el empleo como ionóforo de un derivado lipofílico del benzaldehído^{80,81}.

Las membranas usadas para la fabricación de sensores, tanto de tipo sonda, como de flujo o de gota plana, generalmente se basan en una matriz que contiene alrededor de un 33% en peso de cloruro de polivinilo y de un 66% de disolvente de membrana o plastifican-

⁷⁶ Pinkerton, M., Steinrauf, L. K. y Dawkins, P., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 35, 512 (1969).

⁷⁷ Steinrauf, L. K., Hamilton, J. A. y Sabesan, M. N., J., *Am. Chem. Soc.*, 104 (1982).

⁷⁸ Bakker, E., Buhlmann, P. y Pretsch, E., *Chem. Rev.*, 97, 3083 (1997).

⁷⁹ Grell, E. y Oberbäumer, I. *Molecular Biology, Biochemistry and Biophysics*, Pecht, I. y Rigler, R., Eds.; Springer-Verlag: Berlin, (1977).

⁸⁰ Kuratli, M., Badertscher, M., Rusterholz, B. y Simon, W., *Anal. Chem.*, 65, 3473 (1993).

⁸¹ Kuratli, M. y Pretsch, E., *Anal. Chem.* 66, 85 (1994).

te⁸². Un plastificante se puede considerar como un disolvente aprótico de polaridad variable. Como plastificantes se han usado éteres como el *o*-NPOE (*o*-nitrofeniloxiléter), ésteres de ácidos carboxílicos como el DOS (bis(2-etilhexil)sebacato), ésteres del ácido fosfórico como el TEHP (trisetilhexilfosfato) o ésteres de ácidos sulfónicos como el ETH-2485 (2-nitrofenil ester del ácido hexadecanosulfónico) entre otros.

Con el uso de estos plastificantes, se consiguen membranas con buenas propiedades físicas que permiten una movilidad relativamente alta de los constituyentes presentes. Por otra parte, el disolvente de membrana debe ser físicamente compatible con el polímero, esto es, debe tener propiedades plastificantes, solubilidad en la membrana polimérica; es decir, no cristalizar en la membrana y no exudar de la misma, esto es, que forme sistemas de una fase; pues la exudación hace que su composición sea inestable y sus propiedades variables. El plastificante tiene influencia sobre la selectividad del sensor debido a diversas razones. Si la membrana no contuviera ionóforo y, por tanto, no hubiera interacciones específicas, la selectividad vendría determinada por la diferencia entre las energías libres estándar de los iones en fases acuosa y orgánica, lo cual está influenciado por el plastificante. Esa secuencia de selectividad es lo que usualmente se conoce como serie de Hofmeister⁸³. En el caso de que la membrana contenga ionóforo, la selectividad también está fuertemente influida por el plastificante, lo que se justifica como debido a la polaridad del mismo, lo que se estima mediante su constante dieléctrica o, más correctamente, su permitividad⁸⁴.

La relación entre selectividad y constante dieléctrica del plastificante se ha explicado usando la ecuación de Born^{85,86}; lo que justifica hechos como el incremento de discriminación de Ca(II) con respecto a Mg(II) al sustituir el plastificante por otro de mayor ϵ , debido a

⁸² Moody, G. J., Oke, R. B. y Thomas, J.D.R., *Analyst*, 95, 910 (1970).

⁸³ Marcus, Y. *Biophys. Chem.*, 51, 111 (1994).

⁸⁴ Eugster, R., Rosatzin, T., Rusterholz, B., Aebersold, B., Pedrazza, U., Rüegg, D., Schmid, A., Spichiger-Keller, U. E. y Simon, W., *Anal. Chim. Acta*, 289, 1 (1994).

⁸⁵ Spichiger-Keller, U. E. *Chemical Sensors and Biosensors for Medical and Biological Applications*, 1 ed.; Wiley-VCH: Weinheim, Capítulo 4, (1998).

⁸⁶ Spichiger-Keller, U. E., Eugster, R., Haase, E., Rumpf, G., Gehrig, P., Schmid, A., Rusterholz, B. y Simon, W., *Fresenius J. Anal. Chem.*, 341, 727 (1991).

la mayor estequiometría del complejo y mayor radio iónico del primero o la discriminación de iones divalentes con respecto a monovalentes al aumentar la ϵ del plastificante⁸⁷.

La presencia de sales lipofílicas, generalmente sales de amonio cuaternario o boratos orgánicos, dependiendo de que sean necesarios grupos catiónicos o aniónicos en la membrana, es necesaria, como hemos visto más arriba, para permitir el proceso de intercambio iónico, que es la base del proceso de reconocimiento. La concentración de sal lipofílica afecta de forma considerable a la selectividad de la membrana, pues controla la concentración de iones intercambiables y, además, por influenciar la concentración de ionóforo libre para la complejación de iones. La relación óptima sal lipofílica/ionóforo es función de las cargas de los iones y de las estequiometrías de los complejos exclusivamente, no afectando los valores de los coeficientes de distribución ni las constantes de estabilidad de los complejos^{88,89,90,91}.

3.2.4. Tipos de tiras reactivas para cationes basadas en un segundo componente

Las tiras reactivas desarrolladas para iones metálicos, especialmente para alcalinos y alcalinotérreos, usualmente se han basado en reacciones con ionóforos y su campo de aplicación generalmente ha sido la química clínica. Los diferentes métodos desarrollados y, en algunos casos, comercializados, para el diagnóstico rápido de iones se basan en los principios mas arriba comentados y difieren en la forma en la que se llevan a cabo. La determinación de la concentración se hace habitualmente midiendo la reflectancia difusa con ayuda de fotómetros o espectrofotómetros de reflectancia, tanto de propósito general como diseñados específicamente.

⁸⁷ Spichiger-Keller, U. E., Dinten, O., Eugster, R., Gehrig, P. y Simon, W., Proc. Am. Chem. Soc. Div. Polymeric Materials: Science and Engineering, 358 (1991).

⁸⁸ Morf, W. E., Kahr, G. y Simon, W., Anal. Lett., 7, 9 (1974).

⁸⁹ Morf, W. E., Ammann, D. Simon, W., Chimia, 28, 65 (1974).

⁹⁰ Eugster, R., Gehrig, P., Morf, W. E., Spichiger-Keller, U. E. y Simon, W., Anal. Chem., 63, 2285 (1991).

⁹¹ Zhang, W., Jenny, L. y Spichiger-Keller, U. E., Anal. Sci., 16, 11 (2000).

Una primera condición que deben cumplir es que cuando se pongan en contacto con la disolución problema conteniendo el analito, el proceso de reconocimiento y respuesta sea muy rápido.

Las tiras reactivas para cationes basadas en ionóforos y un segundo componente presentan apariencia seca y poseen una o varias matrices que están constituidas por materiales absorbentes o sustancias capaces de hincharse en contacto con el problema. Deben presentar dos fases inmiscibles, una hidrófila y otra hidrófoba que contengan todos los componentes necesarios. Estas fases son: a) una fase hidrófoba que consiste en un líquido orgánico relativamente poco volátil o bien en un polímero hidrofóbico plastificado con los reactivos necesarios disueltos y b) una fase hidrofílica conteniendo reactivos como puede ser la disolución reguladora y que puede estar dispersa o situada sobre un sustrato poroso hidrofílico.

La fase hidrófoba suele contener además del ionóforo y el indicador de pH lipofilizado o cromoionóforo, algunos otros reactivos como pueden ser ácidos orgánicos muy lipofílicos del tipo fenoles o naftoles altamente lipofilizados⁹² o espesantes para mejorar la consistencia de la película como la etilcelulosa o la hidroxipropilcelulosa. Por su parte, la fase hidrófila debe contener una disolución reguladora de pH que cumpla la condición de no contener iones que interfieran en el ensayo. Por ello, se usan mucho compuestos como el ácido N,N-bis-(hidroxietil)-aminoetanosulfónico, el ácido 3-(N-trishidroximetil)-metilamino-hidroxipropano sulfónico o el ácido N-hidroxipiperacina-N-propanosulfónico. Además, puede contener otros constituyentes. Por ejemplo, si la reacción con el ionóforo no es suficientemente selectiva, se puede añadir algún agente complejante para enmascarar interferentes; como ocurre en algunas tiras reactivas para sodio en las que la interferencia de calcio se reduce añadiendo EDTA a la composición. También se suelen añadir agentes humectantes para mejorar el mojado de la tira reactiva por parte de la disolución problema. Al igual que antes, es necesario que no interfieran en la reacción, por ello se suelen usar compuestos no iónicos como los éteres o ésteres del polietilenglicol o zwitteriónicos como el n-decil-N,N-dimetil-3-amonio-1-propanosulfonato.

⁹² Rittersdorf, W., Guethlein, W., Thym, D. y Vogel, P. Method for the determination of an ion with increased sensitivity, use of substances which are suitable for this and a corresponding agent. Patente US 5,215,924 (1993).

Ambas fases generalmente se preparan mezcladas formando una pasta, como veremos a continuación, y se sitúan sobre un soporte por deposición con ayuda de una espátula o, lo que es más habitual, con uso de diferentes sistemas mecanizados. Tras el secado se cortan, si es necesario, como un pequeño rectángulo de varios milímetros de lado y, generalmente con la ayuda de un adhesivo, se fija en el extremo de un soporte que sirve para manejar la tira reactiva. El espesor habitual de la zona sensora suele ser de 20 a 500 μm y preferiblemente de 20 a 150 μm . El soporte, que puede ser opaco o transparente, está fabricado con polímeros plásticos de diverso tipo entre los que se encuentran acetato de celulosa, polietileno tereftalato, policarbonato o poliestireno.

Se han desarrollado diversas estrategias para conseguir que el contacto con el problema permita una rápida penetración del mismo en la capa reactiva, seguida de la disolución de componentes hidrofílicos y una rápida transferencia del analito a la fase orgánica. A continuación, indicamos algunas representativas.

a) Tiras reactivas sin fase hidrofílica. En este caso el ionóforo se incorpora en una matriz no porosa y no polar, generalmente PVC plastificado situado sobre un soporte opaco o transparente. Cuando se pone en contacto con la muestra a la que se ha adicionado previamente el cromoionóforo o fluoroionóforo y la disolución reguladora, o bien solo la disolución reguladora, se desencadenan los procesos y reacciones que con anterioridad hemos presentado, pudiéndose medir la absorbancia por reflexión⁹³ o transmisión, si el soporte lo permite⁹⁴. En este caso, la matriz que contiene el ionóforo es hidrófoba y no porosa, no permitiendo la entrada de agua y suele estar fabricada con cloruro de polivinilo, copolímero cloruro de vinilo/ acetato de vinilo o copolímero cloruro de vinilideno/ acrilonitrilo, entre otros.

b) Uso de partículas sólidas impregnadas o recubiertas con los reactivos. Las partículas inertes pueden ser tanto inorgánicas como orgánicas, en general, suelen presentar forma irregular, para poder retener mecánicamente líquidos, con un tamaño de partícula entre 0,1 y

⁹³ Charlton, S. C. Ion specific test method. Patente US 4,734,375 (1988).

⁹⁴ Capitán-Vallvey, L. F., Alvarez de Cienfuegos, P., Fernández-Ramos, M. D. y Avidad-Castañeda, R., *Sens. Actuators B*, 71, 140 (2000).

200 μm y un índice de aceite —que es una medida de la interacción entre las partículas y el medio y que se define como la cantidad de aceite de linaza que necesitan 100 g de partículas para formar una masa coherente por amasado— entre 80 y 200. Como material se ha utilizado tierra de diatomeas tanto natural como calcinada, kieselguhr, celulosa y dióxido de titanio, entre otros ⁹⁵. La finalidad de estas partículas puede ser doble. Por una parte, permitir un rápido contacto del problema con la membrana, por aumentar la superficie de contacto, pues el ionóforo y el cromoionóforo se deberán encontrar presentes en un film que es impermeable al agua. Por esto, se llaman a esas partículas *film openers*. Otra misión de ese sólido, es reflejar la radiación que llega a la tira reactiva y, en consecuencia, mejorar la medida de reflectancia difusa. Por ello, se persigue que las partículas tengan un alto índice de refracción y una forma irregular para aumentar la dispersión de la radiación incidente y, consecuentemente, la señal analítica de reflectancia difusa.

Se han utilizado diferentes estrategias para disponer ese material sólido particulado junto con los reactivos necesarios para la formación de la zona sensora de la tira reactiva. Una de ellas es producir una película conteniendo los reactivos hidrófobos sobre las partículas mediante inmersión en una disolución de ellos en un disolvente orgánico y tras evaporación recubrir con los constituyentes acuosos por inmersión o rociado y posterior eliminación de disolvente mediante evaporación, liofilización u otro tratamiento. Así Anand ⁹⁶ propone mantener juntas las partículas mediante un polímero de adhesión, por ejemplo acetato de celulosa, que sea permeable al analito. Previamente se cubren superficialmente las partículas reflectantes, de TiO_2 , ZnO , BaSO_4 u otros, con una disolución de ionóforo y cromoionóforo en un disolvente de baja presión de vapor y, posteriormente, se recubren con la disolución acuosa de reactivos. El tiempo de respuesta suele ser mayor de cinco minutos. Alternativamente, Fritz *et al.* ⁹⁷ proponen eliminar el agente aglutinante usando una fase hidrofóbica

⁹⁵ Rittersdorf, W., Guethlein, W., Thym, D. y Vogel, P., Method for the determination of an ion with increased sensitivity, use of substances which are suitable for this and a corresponding agent. Patente US 5,215,924 (1993).

⁹⁶ Anand, K. y Koon-Wah, L., Reflective particle-containing analysis composition and device. Patente EP 0141647 (1985).

⁹⁷ Walter, B., Anal. Chem., 55, 498A (1983).

conteniendo un polímero formador de película junto con el plastificante, el ionóforo, el cromoionóforo y partículas homogéneamente dispersas de tierra de diatomeas u otros sólidos.

Una segunda posibilidad, es recubrir las partículas con una fase acuosa que contenga la disolución reguladora y otros componentes necesarios y solubles en agua, secar mediante evaporación o liofilización y, a continuación, añadir esas partículas a una disolución orgánica de los componentes hidrofóbicos. Vogel *et al.* proponen preparar la membrana reactiva para iones alcalinos como una membrana orgánica inmiscible en agua que contiene un polímero hidrofóbico, por ejemplo copolímero de acetato de vinilo y laurato de vinilo o dibutiléster del ácido maléico, en mezcla homogénea con un líquido de baja volatilidad, que actúa como plastificante, en el que están disueltos ionóforo y cromoionóforo. Esta mezcla, a su vez, contiene partículas sólidas inertes, de naturaleza inorgánica u orgánica, así tierra de diatomeas, que permiten un rápido contacto con el problema haciendo que entre una cierta cantidad de problema en el interior. Esas partículas inertes previamente han sido recubiertas con la fase acuosa conteniendo la disolución reguladora, agentes complejantes auxiliares y otros, si es necesario. La pasta así conseguida es la que se deposita sobre el soporte donde forma la zona reactiva de la tira. El tiempo de respuesta es del orden de un minuto y la reproducibilidad de las medidas de reflectancia es del 2%^{98,99}.

c) Uso de una matriz porosa impregnada con una fase orgánica e hidrofóbica conteniendo el plastificante, el ionóforo y el cromoionóforo. Al ser porosa la matriz se permite que la muestra acceda de forma rápida al ionóforo y demás reactivos contenidos en la fase hidrofóbica. Una de las matrices más habituales es el papel, aunque se han usado otras como celulosa modificada, cerámica porosa, materiales poliméricos sintéticos porosos. La matriz debe contener una sustancia tamponadora que al disolverse con el problema da al medio un valor de pH determinado, que permite la determinación del analito como hemos visto más arriba. Entre otras, se han usado como sustancias tamponadoras bis(2-hidroxietil)-imino-tris(hidroximetil)metano, ácido 3-propanosulfónico o N,N-bis-(2-hidroxietil)glicina⁵⁷. Para

⁹⁸ Vogel, P., Thym, D., Fritz M. y Mosoiu, D., Test carrier for the determination of ions. Patente US 5,211,914 (1993).

⁹⁹ Vogel, P., Thym, D., Fritz, M. y Mosoiu, D., Test carrier for the determination of ions. Patente US 5,302,346 (1993).

la preparación de la zona reactiva se impregna alternativamente, tras secar adecuadamente, el papel soporte en disoluciones acuosas de la disolución reguladora y en disolución de reactivos hidrófobos en un disolvente orgánico. Otro portador hidrofílico usado, son composiciones de papel/gelatina embebidas de la fase hidrofóbica orgánica en forma de pequeñas gotitas dispersas que contienen los reactivos. Para su preparación se usa una emulsión de una disolución de ionóforo y cromoionóforo en un plastificante como dioctilfosfato u *o*-nitrofeniloctiléter en una matriz portadora hidrofílica, como por ejemplo, disolución de gelatina tamponada. Con esa emulsión se recubre el soporte de la tira reactiva dejando evaporar el agua quedando de esta manera el polímero hidrofílico con los pequeños glóbulos hidrofóbicos incluidos. Alternativamente se puede depositar la emulsión sobre papel de filtro, que tras secar, se corta y pega en sobre un soporte plástico. Presentan estas emulsiones problemas de reproducibilidad en la fabricación y de almacenamiento durante periodos de tiempo largos. El tiempo de respuesta suele ser mayor de dos minutos ^{100,101,102}.

d) Uso de emulsiones de ambas fases. Así, se han distribuido polímeros orgánicos hidrofílicos conteniendo una disolución reguladora y otros reactivos necesarios como una fase discontinua –como pequeñas partículas– en un polímero orgánico hidrofóbico formador de película y que contiene reactivos y plastificantes. Habitualmente los polímeros hidrofílicos están contenidos en los poros de la membrana formada por polímeros hidrofóbicos. Para la preparación del sustrato reactivo, los productos necesarios se pueden incluir de diversas formas, así por disolución en la mezcla a partir de la cual se prepara la membrana, o bien es añadida en forma de una dispersión W/O o bien es distribuida en la membrana por impregnación posterior a la polimerización. Para la preparación de las partículas de polímero hidrofílico se usa el procedimiento de polimerización de emulsión inversa (W/O) de una disolución acuosa del monómero o mezcla de monómeros (acrilamida, vinilpirrolidona, vinilcaprolac-

¹⁰⁰ Charlton, S.C., Fleming, R.L., Hemmes, P. y Lau, A.L.Y., Unified Test Means for Ion Determination. Patente US 4,645,744 (1985).

¹⁰¹ Charlton, S. C., Hemmes, P. y Lau, A.L.Y., Ion test means having a hydrophilic carrier matrix. Patente US 4,649,123 (1987).

¹⁰² Charlton, S. C., Ion test mean having a hydrophilic carrier matrix, EP 0125554 (1984).

tama, etc.) que se dispersan en la fase orgánica. Como polímero hidrófobo formador de película se usa policarbonato, poliestireno, acetato de celulosa, etc.¹⁰³.

e) Tiras reactivas sin fase hidrofóbica. En este caso no se usa una fase hidrofóbica que contiene el ionóforo y demás reactivos, sino solo una fase hidrofílica como es gelatina, aunque se pueden usar otros como copolímeros del ácido acrílico, carboximetilcelulosa, hidroxibutilcelulosa o hidroxipropilcelulosa, que contiene dispersos los reactivos necesarios como ionóforo, cromoionóforo y otros^{104,105}. Aunque no prepara tiras reactivas, sino un ensayo en disolución, Gibbons¹⁰⁶ propone no usar una fase hidrofóbica para disolver y aislar el ionóforo y cromoionóforo, sino solubilizarlos en una disolución acuosa en forma de micela preparada a partir de colato ó hidroxicolato sódico junto con un estabilizante.

Además de los constituyentes indicados, la mayoría de las tiras reactivas que acabamos de comentar suelen ser de tipo multicapa, pues poseen una serie de capas adicionales que cumplen diversas funciones auxiliares, así capas de distribución, transporte, reflexión o barrera. No trataremos aquí acerca de la disposición, tipos y funciones de estas capas auxiliares.

Estas tiras reactivas basadas en ionóforos se usan casi con exclusividad para la determinación de iones alcalinos y alcalinotérreos en fluidos biológicos, pues solo su alto consumo permite un precio suficientemente bajo y justifican su complejo desarrollo y manufacturación por parte de empresas.

1.6.5. Determinación de calcio, magnesio y dureza

¹⁰³ Piejko, K. E., Boemer, B., Bartl, H. y Frank, G., Water-absorbing essentially water-free membrane for reagent substrates and methods of preparing the same. Patente US 4,780,411 (1988).

¹⁰⁴ Charlton, S.C., Method, device and composition for the assay of ions. Patente US 5,300,439 (1985).

¹⁰⁵ Charlton, S.C., Method and device for the assay of ions. Patente EP 0475045 (1985).

¹⁰⁶ Gibbons, I., Method for detecting a metal ion in an aqueous environment. Patente US 4,820,647 (2002).

A continuación indicamos de forma resumida, los sistemas más habituales para la determinación de los alcalinos objeto de estudio así como de dureza.

La presencia de altas concentraciones de iones de iones alcalinotérreos, especialmente calcio y magnesio, en aguas crea problemas severos tanto en el hogar y en la industria, debido entre otras cosas, a la formación de depósitos de sus carbonatos. Además, desde el punto de vista fisiológico, estos iones junto con los alcalinos, son el factor más importante en enfermedades cardiovasculares y pueden potencialmente afectar a la salud tanto de personas como de animales.

La forma de determinar la denominada dureza total, suma de calcio y magnesio, en agua es mediante complexometría empleando el ácido etilendiaminotetraacético (AEDT) como agente valorante¹⁰⁷. El procedimiento es barato, aunque requiere alguna destreza, consume tiempo y esta sujeto a errores operacionales.

Para la determinación de estos iones alcalinotérreos, tanto individualmente como combinados en dureza total se han empleado diversas aproximaciones instrumentales como son espectrofotometría UV-Vis¹⁰⁸, fluorescencia¹⁰⁹, fotometría de llama, espectrofotometría de absorción atómica o espectrometría de emisión atómica con plasma acoplado inductivamente¹¹⁰.

Especial interés ha suscitado el empleo de electrodos selectivos de iones potenciométricos^{111,112}. Se han publicado diversos artículos relativos al diseño de ionóforos y optimiza-

¹⁰⁷ W. Fresenius, K. E. Quentin y W. Schneider (eds.), *Water Analysis*, Springer-Verlag, Berlin, 1988, pp.294-298.

¹⁰⁸ Ma, H.M., *Anal. Lett.*, 32, 799 (1999).

¹⁰⁹ Kepner, B., *Hercules D.*, *Anal. Chem.*, 35, 1238 (1963).

¹¹⁰ Franson, M.A.H (ed.), *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 18th ed., American Public Health Association and Water Pollution Control Federation, Washington, DC, 1992.

¹¹¹ Fischbach, F.T., *Laboratory and Diagnostic Test*, 4th ed. Lippincott, Philadelphia USA, 1992

¹¹² Diamond, D., Sáez de Viteri, F.J., *Ion Selective Electrodes and Optrodes*. In: D. Diamond, ed. *Principles of Chemical and Biological Sensors*, Wiley and Sons Inc., New York, 1998.

ción de la composición de la membrana para diferentes aplicaciones^{113,114,115,116}. Actualmente existen disponibles comercialmente algunos ionóforos para calcio¹¹⁷, dentro de ellos los más empleados son el dietil N, N'-[(4R, 5R)-4, 5-dimetil-1, 8-dioxo-3, 6-dioxaoctamethylene]bis(12-metilamino-dodecanoato) (ETH 1001)^{118 119 120}, el N,N, N', N'-Tetraciclo-3-oxapentanodiamida (ETH 129)¹²¹.

También se han desarrollado ISFETs selectivos para calcio^{122,123}, aunque todavía no ha sido resuelto el desarrollo de un electrodo de referencia miniaturizado para sensores de iones potenciométricos.

Recientemente se ha desarrollado un microsensar conductimétrico para la determinación de calcio¹²⁴. En él la detección se realiza mediante medida de conductividad, empleando electrodos integrados de platino y una delgada membrana polimérica conteniendo un ionóforo comercial¹²⁵, de forma que la conductividad se puede relacionar con el contenido en ión primario de la disolución analizada. Esta forma de determinación de calcio ofrece la ventaja de presentar un diseño completo en estado sólido, lo que hace potencialmente posible minia-

¹¹³ Anker, P., Wieland, E., Ammann, D., Dohner, R.E., Asper, R. y Simon, W. *Anal. Chem.*, 53, 1970 (1981).

¹¹⁴ Anker, P. Ammann, D., Meier, P.C. y Simon, W., *Clin. Chem.*, 30, 454 (1984).

¹¹⁵ Schefer, U., Ammann, D., Pretsch, E., Oesch, U. y Simon, W. *Anal. Chem.*, 58, 2282 (1986).

¹¹⁶ Suzuki, K., Watanabe, K., Matsumoto, Y., Kobayashi, M., Sato, S., Siswanta, D. y Hisamoto, H. *Anal. Chem.*, 67, 324 (1995).

¹¹⁷ Fluka Química, Selectophore® Ionophores Membranes Mini-ISE (1996).

¹¹⁸ Morf, W.E., Seiler, K., Rusterholz, B. y Simon, W., *Anal. Chem.* 62, 738 (1990).

¹¹⁹ Spichiger-Keller, U.E., Freiner, D., Bakker, E., Rosatzin, T. y Simon, W., *Sens. Actuators B*, 11, 263 (1993).

¹²⁰ Werner, E., Seiler, K., Rusterholz, B. y Simon, W., *Anal. Chem.*, 62, 738 (1990).

¹²¹ Schefer, U., Ammann, D., Pretsch, E., Oesch, U., Simon, W., *Anal. Chem.*, 58, 2282 (1986).

¹²² Wakida, S.I., Yamane, M., Higashi, K., Hiro, K. y Ujida, Y. *Sens. Actuators B*, 1, 412 (1990).

¹²³ Van der Wal, P.D., Van den Berg, A. y de Rooij, N.F., *Sens. Actuators B*, 18, 200 (1994).

¹²⁴ Trebbe, U., Niggemann, M., Cammann, K., Fiaccabrio, G.C., Koudelka-Hep, M., Dzyadevich, S. y Shulga, O., *Fresenius J. Anal. Chem.*, 371, 734 (2001).

¹²⁵ Fluka Química, Selectophore® Ionophores Membranes Mini-ISE (1996)

turizar e integrar en verdaderos circuitos integrados dentro de la tecnología de microsistemas, aunque presenta el inconveniente de emplear ionóforos de elevado precio.

Actualmente existen bastantes ionóforos para calcio^{126,127}, tales como éteres corona¹²⁸, agentes quelantes^{129,130}, entre ellos derivados del ácido etilendiaminotetraacético¹³¹ y calixarenos^{132,133}. Kürner *et al*¹³⁴ han presentado un sensor para calcio basado en medida de absorbancia. La membrana de hidrogel usa un derivado del 1,3-bis(indoanilina)-2,4-bis-[(etilcarbonil)metoxil]-calix[4]arene como receptor, que una vez atrapado en el gel no se elimina con facilidad, aunque no es muy estable. Por complejación con calcio, se produce un efecto batocrómico de 70 nm con un incremento de absorbancia.

Otra alternativa es el empleo de diferentes sensores con transducción óptica^{135,136,137,138,139} que ofrecen una buena reproducibilidad y selectividad. Se ha empleado un sensor óptico para la determinación selectiva de calcio fabricado mediante inmovilización electrostática de calciocromo (2,8,8'-trihidroxi-1,1'-azonaftaleno-3,6,3',6'-ácido tetrasulfó-

¹²⁶ Bühlmann, P., Pretsch, E. y Bakker, E., *Chem. Rev.*, 98, 1593 (1998).

¹²⁷ Spichiger-Keller, U.E., *Chemical Sensors and Biosensors for Medical and Biomedical Applications*, Wiley-VCH, Weinheim, 1998.

¹²⁸ Ashworth, D.C., Huang, H.P. y Narayanaswamy, R., *Anal. Chim. Acta*, 213, 251 (1988).

¹²⁹ Chau, L.K. y Porter, M.D., *Anal. Chem.*, 62, 1964 (1990).

¹³⁰ Kawabata, Y., Tahara, R., Imasaka, T. y Ishibashi, N., *Anal. Chim. Acta*, 212, 267 (1988).

¹³¹ Minta, A., Kao, J.P.Y. y Tsien, R.Y., *J. Biol. Chem.*, 264, 8171 (1989).

¹³² Ogata, M., Fujimoto, K. y Shinkai, S. *J. Am. Chem. Soc.*, 116, 4505 (1994)

¹³³ Kobo, Y., Tokita, S., Kojima, Y., Osano, Y.T. y Matsuzaki, T., *J. Org. Chem.*, 61, 3758 (1996).

¹³⁴ Kürner, J.M. y Werner, T., *Fresenius J. Anal. Chem.*, 368, 759 (2000).

¹³⁵ Hisamoto, H., Watanabe, K., Nakagawa, E., Siswanta, D., Shichi, Y. y Suzuki, K., *Anal. Chim. Acta*, 299, 179 (1994).

¹³⁶ Suzuki, K., Tohda, K., Tanda, Y., Ohzora, H., Nishihama, S., Inoue, H. y Shirai, T., *Anal. Chem.*, 61, 382 (1989).

¹³⁷ Morf, W., Seiler, K., Rusterholz, B. y Simon, W., *Anal. Chem.*, 62, 738 (1990).

¹³⁸ Spichiger, U.E., Freiner, D., Bakker, E., Rosatzin, T. y Simon, W., *Sens. Actuators B*, 11 263 (1993)

¹³⁹ Werner, E., Séller, K., Rusterholz, B. y Simon, W., 62, 738 (1990).

nico)¹⁴⁰ sobre una película polimérica porosa de intercambio aniónico. Los cambios en las propiedades ópticas del reactivo inmovilizado fueron registradas mediante reflexión difusa en la región espectral del visible, destacando su corto tiempo de equilibración, gran selectividad y fácil construcción, aunque el proceso de inmovilización altera el carácter ácido y la fuerza de complejación del indicador.

La determinación individual de magnesio, por otra parte, es más complicada que la de calcio, porque en la mayoría de los casos, hay interferencias de otros iones alcalinotérreos, y especialmente calcio. Por esta razón se han desarrollado pocos electrodos selectivos para magnesio. Entre ellos podemos citar el electrodo selectivo basado en dimetil aspartamida (ETH 2220)¹⁴¹ que presenta una notable interferencia debida a protones. Otro sensor descrito es el electrodo basado en el par iónico tetrafenil borato de Mg-4,7-difenil-1,10-fenantrolina (1:3) en una matriz de PVC y que usa *o*-nitrooctilfeniléter como plastificante. Este electrodo es diez veces más selectivo para magnesio que para calcio. El electrodo selectivo que emplea óxido de bis(ditolil)fosfina como ionóforo¹⁴² presenta un rango de aplicación entre $6,0 \cdot 10^{-5}$ y $1,0 \cdot 10^{-1}$ M con buena discriminación para calcio. Se han desarrollado diversos ISES usando ionóforos del tipo octametileno bis y tris (diamidas de ácidos malónicos) en PVC empleando *o*-nitrooctilfeniléter como plastificante¹⁴³. Otros ionóforos usados son: 1,3,5-tris [9-(1-adamantil)-6,8-dioxo-5,9-diazadecil]benceno (ETH 5504), el 1,3,5-tris[10-(1-adamantil)-7,9-dioxo-6,10-diazaundecil]benceno (ETH 5506), 1,3,5-tris(10-metil-7,9-dioxo-6,10-diazoheptadecil)benceno (ETH 3832), N,N'-dimetil-N,N'-diadamantilmalonamida (ETH 2001), N-metil-N,N'-diamantilmalonamida (ETH 2003) o el 4,-13-[bis(N-adamantilcarbamoil)acetil]-1,7,10,16-tetraoxa-4,13-diazaciclooctadecano (K22B5)^{144,145,146,147}. De todos estos ionóforos el K22B5, ETH 5506 y ETH 5504 son los que presen-

¹⁴⁰ Chau, L. y Porter, M., Anal. Chem., 62, 1964 (1990).

¹⁴¹ Rouilly, M.V., Badertscher, M., Pretsch, E., Suter, G. y Simon, W., Anal. Chem., 60, 2013 (1988).

¹⁴² Saleh, M.B., J. Electroanal. Chem., 373, 89 (1994).

¹⁴³ Donnel, J., Rusterholz, B., Aebersold, B., Ruegg, D., Simon, W. y Presch, E., Microchim. Acta, 113, 45 (1994).

¹⁴⁴ Zhang, X., Fakler, A. y Spichiger, U.E., Electroanalysis, 10, 1174 (1998).

¹⁴⁵ Zhang, X., Fakler, A., Demuth, C. y Spichiger-Keller, U.E., Anal. Chim. Acta, 375, 211 (1998).

tan mejor selectividad para magnesio, aunque al tener estos baja lipofilidad, no son muy útiles para la monitorización continua en muestras de plasma o suero. Por otra parte, los electrodos presentan tiempos de vida cortos. El ETH 5504 ha demostrado ser el más adecuado para la preparación de microelectrodos. El grupo de Suzuki publicaron un sensor óptico para Mg basado en un ionóforo más lipofílico el K22B1B5¹⁴⁸ que no ha sido ensayado en electrodos selectivos a iones.

Se han empleado éteres corona como el benzo-15-corona 5¹⁴⁹ como ionóforo con un rango de aplicación de $1,0 \cdot 10^{-5}$ hasta $1,0 \cdot 10^{-1}$ M de magnesio. Se han preparado membranas para electrodos selectivos utilizando macrociclos del tipo 4,11-dimetil-2,4,9,11-tetraetil-1,5,8,11-tetraaza ciclotetradeca 1,8-dieno y 4,11-dioxa-2,9-dimetil-1,5,8,12-tetraaza ciclotetradeca-1,8-dieno como material sensor¹⁵⁰, aunque la mayoría de los electrodos desarrollados presentan rangos de trabajo estrechos, así como severas interferencias debidas a calcio.

Otra alternativa, para monitorizar analito en tiempo real empleando sensores químicos, es el uso de sensores de tipo fluorescente, los cuales presentan las ventajas de ser muy sensibles, de bajo coste, fácil de realizar y versátiles. Para la medida de calcio se han desarrollado múltiples indicadores fluorescentes^{151,152,153}. Sin embargo solo se han desarrollado unos pocos para determinar magnesio¹⁵⁴ y presentan una pobre selectividad para magnesio frente a calcio, siendo solo útiles cuando las concentraciones de magnesio son mucho más altas que las de calcio. No obstante, hay un sensor que es efectivo para magnesio,

¹⁴⁶ Spichiger-Keller, U.E. y Fakler, A., *Electrochim. Acta*, 42, 3137 (1997).

¹⁴⁷ Zhang, W., Jenny, L. y Spichiger, U.E., *Anal. Sci.*, 16, 11 (2000).

¹⁴⁸ Siswanta, D., Hisamoto, H., Sato, S., Matsumoto, Y., Koike, Y., Yamamori, S. y Suzuki, K., *Anal. Sci.* 13, 429 (1997).

¹⁴⁹ Gupta, V.K., Chandra, S. y Mangla, R., *Sens. Actuators B*, 4331, 1 (2002).

¹⁵⁰ Baniwal, S., Chandra, S., Panwar, A., y Singh, A.K., *Talanta*, 50, 499 (1999).

¹⁵¹ de Silva, A.P., Gunaratne, H.Q.N., Gunnlaugsson, T., Huxley, A.J.M., McCoy, C.P., Rademacher, J.T. y Rice, T.E., *Chem. Rev.*, 97, 1515 (1997).

¹⁵² Henquin, C., Tamagawa, T., Nenquin, M. y Cogneau, M., *Nature*, 301, 73 (1983).

¹⁵³ Grynkiewicz, G., Poenie, M. y Tsien, R.Y., *J. Biol. Chem.*, 260, 3440 (1985).

¹⁵⁴ Morelle, B., Salmon, J.M., Vigo, M. y Viallet, P., *Photochem. Photobiol.*, 58, 795 (1993).

basado en el diaza-18-corona-6 con dos grupos 5-cloro-8-hydroxiquinolina-7-il¹⁵⁵ y del que se ha señalado que tiene buenas posibilidades para ser usado en la determinación de magnesio en disoluciones acuosas.

La necesidad de realizar un gran número de determinaciones conjuntas de calcio y magnesio, como dureza total, en aguas, tanto a nivel público como privado, así en control de depuradoras municipales o privadas, ha hecho que se hayan desarrollado diferentes estrategias analíticas para su determinación mediante sistemas automáticos y sistemas rápidos. Así, varias técnicas se han adaptado a sistemas en flujo continuo, tales como espectrofotometría UV-Vis^{156,157,158,159,160}, FAAS¹⁶¹ y electrodos selectivos de iones^{162,163,164,165}.

Se han propuesto diferentes métodos espectrofotométricos UV/Vis con sistema de flujo con ventajas de simplicidad y bajo costo pero con el inconveniente de una baja selectividad. En algunos casos, un cambio en las condiciones químicas, por ejemplo pH¹⁶⁶ o uso de agentes enmascarantes¹⁶⁷ hace posible la determinación secuencial de ambos analitos. En

¹⁵⁵ Prodi, L., Bolletta, F., Montalti, M. y Zaccheroni, N., *Tetrahedron Letters*, 39, 5451 (1998).

¹⁵⁶ Gómez, E., Tomás, C., Cladera, A., Estela, J.M. y Cerdá, V., *Analyst*, 120, 1181 (1995).

¹⁵⁷ Gómez, E., Estela, J.M. y Cerdá, V., *Anal. Chim. Acta*, 249, 513 (1991).

¹⁵⁸ Blanco, M., Coello, J., Gené, J., Iturriaga, H. y Maspoch, S., *Anal. Chim. Acta*, 224, 23 (1989).

¹⁵⁹ Hernández, O., Jiménez, F., Jiménez, A.I., Arias, J.J. y Havel, J., *Anal. Chim. Acta*, 320, 177 (1996).

¹⁶⁰ Blasco, F., Medina-Hernández, M.J., Sagrado, S. y Fernández, F.M., *Analyst*, 122, 639 (1997).

¹⁶¹ Basson, W.D y Van Staden, J.F., *Fresenius' Z. Anal. Chem.*, 302, 370 (1980).

¹⁶² Foster, R.J. y Diamond, D., *Anal. Chem.*, 64, 1721 (1992).

¹⁶³ Ross, J.W., *Science* 156, 778 (1967).

¹⁶⁴ *Handbook of Electrode Technology*, Orion Research Inc. Cambridge, 1982, p. D-1.

¹⁶⁵ Maj-Zurawska, M., Rouilly, M., Morf, W.E. and Simon, W., *Anal. Chim. Acta*, 218, 47 (1989).

¹⁶⁶ J. Marcos, A. Rios and M. Valcárcel, *Analyst*, 117 (1992) 1629

¹⁶⁷ T. Yamane and E. Goto, *Talanta*, 38 (1991) 139

otros casos, el tratamiento de los datos obtenidos mediante análisis multivariante permite la determinación simultánea^{168,169,170,171,172,173}.

Para la determinación de calcio y magnesio se ha propuesto un sensor de fibra óptica fluorescente basado en un antibiótico natural, el poliéster carboxílico A23187, que presenta un buen límite de detección y selectividad, pero tiene un tiempo de respuesta largo y un corto tiempo de vida¹⁷⁴.

La dureza del agua también se puede determinar empleando directamente usando electrodos selectivos de iones divalentes basados en transportadores neutros, cuyas membranas presentan igual selectividad para calcio y magnesio y discrimina al resto de iones alcalinos^{175,176,177,178}.

También se han empleado diferentes procedimientos de ensayos rápidos para determinar la dureza total, los cuales se pueden llevar a cabo tanto en disolución como en fase sólida. Algunos test han sido comercializados por diversas compañías entre los que se pueden citar Serim[™] Water Hardness Test Strips (Serim Research Co.), EM Quant[®] Total Hardness Test (Merck) o Aquadur[®] Total Hardness (Macherey-Nagel). Todas ellas se basan en una reacción entre un indicador químico depositado en la almohadilla de la tira reactiva y

¹⁶⁸ E. Gómez, C. Tomás, A. Cladera, J.M. Estela and V. Cerdá, *Analyst*, 120 (1995) 1181

¹⁶⁹ E. Gómez, J.M. Estela and V. Cerdá, *Anal. Chim. Acta*, 249 (1991) 513

¹⁷⁰ M. Blanco, J. Coello, J. Gené, H. Iturriaga and S. MasPOCH, *Anal. Chim. Acta*, 224 (1989) 23

¹⁷¹ F. Blasco, M.J. Medina-Hernández, S. Sagrado and F.M. Fernández, *Analyst*, 122 (1997) 639

¹⁷² I. Ruisánchez, A. Rius, M.S. Larrechi, M.P. Callao and F.X. Rius, *Chem. Intell. Lab. Syst.*, 24 (1994) 55

¹⁷³ J. Saurina, E. López-Aviles, A. Le Moal, S. Hernández-Cassou, *Anal. Chim. Acta*, 464 (2002) 89

¹⁷⁴ K. Suzuki, K. Tohda, Y. Tanda, H. Ohzora, S. Nishihama, H. Inoue and T. Shirai, *Anal. Chem.*, 61 (1989) 382

¹⁷⁵ J.W. Ross, *Science* 156 (1967), 778

¹⁷⁶ *Handbook of Electrode Technology*, Orion Research (1982) D-1

¹⁷⁷ Maj-Zurawska, M., Rouilly, M., Morf, W.E. and Simon, W., *Anal. Chim. Acta*, 218 (1989) 47

¹⁷⁸ K. Toth, E. Lindner, M. Horváth, J. Jeney, E. Pungor, I. Bitter, B. Ágai and L. Töke, *Electroanalysis*, 5 (1993) 781

los iones calcio y/o magnesio de una disolución acuosa, que se pone en contacto con ella, dando como resultado un cambio de color en la almohadilla, que se compara con una escala de color, obteniéndose un resultado semicuantitativo.

Otra variante empleada son los test basados en multicapas para la determinación de iones alcalinotérreos individuales en fluidos biológicos basados en ionóforos neutros, normalmente coronados, criptanos o podanos y medidos mediante reflectancia difusa^{179,180}, de los que ya hemos hablado páginas atrás.

¹⁷⁹ M.L. Gantzer, P.R. Hemmes, R. Paul and D. Wong, US Patent 4,670,218 (1987)

¹⁸⁰ P. Vogel, D. Thym, M. Fritz and D. Mosoiu, US Patent 5,302,346 (1994)

CAPÍTULO 2
MATERIALES Y METODOLOGÍA



MATERIALES Y METODOLOGÍA

1. Reactivos, disoluciones.

1.1. Disoluciones

En este apartado se recogen todos los reactivos y disoluciones utilizados a lo largo del trabajo experimental realizado durante la presente Memoria de Doctorado.

Disoluciones Patrón: Se prepararon disoluciones 2M por pesada exacta de carbonato de calcio y carbonato de magnesio convenientemente deshidratados, disolución en la mínima cantidad de ácido clorhídrico 2M y posterior dilución con agua. Todas las disoluciones fueron conservadas a 4°C en botellas de vidrio de 1.000 ml de capacidad con tapon de rosca. A partir de ellas se prepararon las disoluciones de trabajo por dilución adecuada con agua desionizada.

Disoluciones Reguladoras: Se han empleado las siguientes disoluciones reguladoras para llevar a cabo el trabajo experimental:

Ácido acético / acetato sódico 0,2 M de pH comprendido entre 3,6 y 5,6, preparadas a partir de ácido acético glacial (Panreac, Barcelona, España PRS) e hidróxido sódico (Panreac, Barcelona, España PRS)

Dihidrógenofosfato/monohidrógenofosfato 0,2 M de pH comprendido entre 5,0 y 6,8, preparadas a partir de ácido fosfórico 84% (Prolabo) e hidróxido sódico (Panreac, Barcelona, España PRS)

Trishidroximetilaminometano (TRIS) 0,2 M de pH entre 7,0 a 9,0, preparadas a partir de TRIS (Sigma-Aldrich Química S.A.) y ácido clorhídrico del 37% (Panreac, Barcelona España PRS)

Dietanolamonio/dietanolmina 0,2 M de pH comprendido entre 7,8 y 8,9, preparada a partir de dietanolamina químicamente pura (Probus QP) y ácido clorhídrico del 37% (Panreac, Barcelona, España PA).

1.2. Disolventes

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

Se emplearon, además, los siguientes disolventes:

Diclorometano PRS (Panreac, Barcelona, España).

Triclorometano PRS (Panreac, Barcelona, España).

Tetrahidrofurano (Sigma-Aldrich Química S.A., Madrid, España).

Metanol PRS (Panreac, Barcelona, España).

Etanol PRS (Panreac, Barcelona, España).

Éter dietílico PRS (Panreac, Barcelona, España).

Hexano PRS (Panreac, Barcelona, España).

Acetato de etilo PRS (Panreac, Barcelona, España).

1.3. Reactivos

1.3.1. Reactivos empleados en la preparación de disoluciones.

Ácido nítrico, 60%, PRS (Panreac, Barcelona, España).

Ácido clorhídrico, 37%, PRS (Panreac, Barcelona, España).

Ácido acético glacial PRS (Panreac, Barcelona, España).

Amoniaco, 30%, PRS (Panreac, Barcelona, España).

Carbonato de calcio ACS (Merck, Darmstadt, Alemania).

Carbonato de magnesio ACS (Merck, Darmstadt, Alemania).

Cloruro de Zn(II) RA (Merck, Darmstadt, Alemania).

Cloruro de Mg (II) RA (Merck, Darmstadt, Alemania).

Cloruro de Sr (II) RA (Merck, Darmstadt, Alemania).

Cloruro de Ba(II) RA (Merck, Darmstadt, Alemania).

Cloruro de Na(I) RA (Merck, Darmstadt, Alemania).

Cloruro de (K) RA (Merck, Darmstadt, Alemania).

Nitrato de Fe(III) RA (Merck, Darmstadt, Alemania).

Nitrato de Al(III) RA (Merck, Darmstadt, Alemania).

Nitrato de Sr(II) RA (Merck, Darmstadt, Alemania).

Nitrato de Ba(II) RA (Merck, Darmstadt, Alemania).

Nitrato potásico RA (Merck, Darmstadt, Alemania).

Sulfato de sodio RA (Merck, Darmstadt, Alemania).

Perclorato de sodio RA (Merck, Darmstadt, Alemania).

Hidrógeno carbonato de sodio RA (Merck, Darmstadt, Alemania).

Hidróxido de sodio PRS (Panreac, Barcelona España).

Sal disódica del ácido etilendiaminotetracético dihidratada (EDTA) PRS (Panreac, Barcelona, España).

1.3.2. Reactivos empleados para síntesis

Cloruro de Azul Nilo (Sigma-Aldrich Química S.A., Madrid, España).

Hidróxido de sodio PRS (Panreac, Barcelona, España).

Hidróxido de litio (Sigma-Aldrich Química S.A., Madrid, España).

Bicarbonato de sodio PA (Panreac, Barcelona, España).

Sulfato Sódico Anhidro PA (Panreac, Barcelona, España).

Cloruro de estearoilo (Sigma-Aldrich Química S.A., Madrid, España).

1-Adamantilamina (Sigma-Aldrich Química S.A., Madrid, España).

Cloruro monometil malónico (Fluka, Madrid, España).

Trietilamina (Fluka, Madrid, España).

4-Dimetilaminopiridina (Sigma-Aldrich Química S.A., Madrid, España).

Diciclohexilcarbodiimida (Sigma-Aldrich Química S.A., Madrid, España).

1,4,10,13-Tetraoxa-7,16-diazaciclooctadecano (Fluka, Madrid, España).

Anhídrido succínico (Fluka, Madrid, España).

1.3.3. Reactivos formadores de la zona sensora.

En la Tabla 2.1 se recogen los diferentes reactivos utilizados para la puesta a punto de los sensores desarrollados en la presente Memoria tales como: ionóforos, cromoionóforos, agentes quelantes, polímeros y plastificantes.

Tabla 2.1. Ionoforos, Crmoionoforos y agentes quelantes utilizados.

Nombre	Fabricante
^A Éter 18-corona-6	Sigma-Aldrich Química S.A., Madrid, España.
^A 4,13-[Bis(N-adamantilcarbamoil)acetil]- 1,7,10,16-tetraoxa-4,13,-diazaciclooctadecano. (K22B5). ¹	Sintetizado según reza en el apar- tado 1.3.4.2
^A 4,13-[Bis(N-adamantilcarbamoil)propionil]- 1,7,10,16-tetraoxa-4,13,-diazaciclooctadecano.	Sintetizado según reza en el apar- tado 1.3.4.3 pag. 102
^B Ácido 2,7-bis-(4-cloro-2-fosfonobencenoazo)- 1,8-dihidroxinaftaleno-3,6-disulfónico (CPA III), Clorofosfonazo III	Sigma-Aldrich Química S.A., Madrid, España.
^C Azul Nilo Lipofilizado 1,2-Benzo-7- (dietilamino)-3-(octadecanoilimino)fenoxacina ²	Sintetizado según reza en el apar- tado 1.3.4.1

^A: Ionofo; ^B: Agente quelante; ^C: Cromoionóforo.

Tabla 2.2. Sales lipofilicas utilizadas.

Nombre	Fabricante
^A Bromuro de tetrakis(dodecil)amonio (TDAB).	Sigma-Aldrich Química S.A., Madrid, España.
^A Cloruro de trisdodecilmetilamonio (TDMAC).	Sigma-Aldrich Química S.A., Madrid, España.
^B Tetrakis[3,5-bis(trifluorometil)fenil]borato de sodio (NaTm(CF ₃)PB).	Fluka, Madrid, España.
^B Tetrakis(4-clorofenil)borato de potasio (TCFB),	Fluka, Madrid, España.
^C Cloruro de tricapril metilamonio (Aliquat 336®)	Sigma-Aldrich Química S.A., Madrid, España

^A: Sal de catión lipofilica ^B: Sal de anión lipofílico ^C: Resina líquida de cambio ionico

¹ Suzuki, K., Watanabe, Y., Matsumoto, Kobayashi, M. Sato, S. Siswanta, O. y Hisamoto, H. Anal. Chem. 67, 324 (1995)

² Morf, W.E., Seiler, K., Rusterholz, B. y Simon W., Anal. Chem. 62, 738 (1990).

Tabla 2.3. Plastificantes utilizados.

Reactivo	Fabricante
Tributilfosfato (TBP).	Sigma-Aldrich Química S.A., Madrid, España.
<i>o</i> -Nitrofeniloctileter (NPOE).	Sigma-Aldrich Química S.A., Madrid, España.
Bis(2-etilhexil)sebacato (DOS).	Sigma-Aldrich Química S.A., Madrid, España.
Tris(2-etilhexil)fosfato (TEHP).	Sigma-Aldrich Química S.A., Madrid, España.
Diociltalato (DOP).	Sigma-Aldrich Química S.A., Madrid, España.

Ademas de los reactivos agrupados por familias, indicados en la tablas anteriores se utilizó:

Cloruro de polivinilo (PVC) de alto peso molecular (Sigma-Aldrich Química S.A., Madrid, España). Como matriz polimérica.

Poliéster tipo Mylar en laminas de 0,25 mm de espesor, orientado biaxialmente (Goodfellow, Cambridge, Inglaterra) como soporte solido.

1.3.4. Síntesis de reactivos

Como podemos observar en la Tabla 2.1 algunos de los reactivos utilizados han sido sintetizados en el laboratorio. A continuación se van a detallar los pormenores de dichas síntesis.

1.3.4.1. Síntesis del Azul Nilo lipofilizado

El cromoióforo 1,2-benzo-7-(dietilamino)-3-(octadecanoilimino) fenoxacina, conocido como azul Nilo lipofilizado y bajo las siglas ETH 5294, se sintetizó siguiendo los

pasos descritos por W. Morf, K. Seiler, B. Rusterholz y W. Simon en 1990². Estos consisten, en primer lugar, en la preparación de la forma básica del azul Nilo, para, en una segunda etapa, introducir un grupo estearoilo que le confiere la lipofilicidad deseada, sin modificar el carácter de indicador ácido-base.

Síntesis de la forma básica del azul Nilo: A 100 ml de una disolución acuosa de cloruro de azul Nilo A (1g; 2,8 mmol) termostataada a 65°C en un baño de glicerina, se le añaden 100 ml de una disolución acuosa de hidróxido sódico 0,5 M y se agita magnéticamente durante 30 minutos. Trás dejar enfriar a temperatura ambiente, la disolución se extrae en tres ocasiones con 100 ml de Cl_2CH_2 . La fase orgánica se decanta y seca con Na_2SO_4 , se filtra y tras evaporar el disolvente, se obtienen 600 mg (1,6 mmol) de la forma básica del azul Nilo (R: 60%).

Síntesis del azul Nilo lipofilizado: A una disolución de la forma básica del azul Nilo (317 mg en 13 ml de CH_2Cl_2) se le añade poco a poco, otra de cloruro de estearoilo (242 mg en 2 ml de CH_2Cl_2), manteniendo en agitación durante 15 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo se le añaden 50 ml de CH_2Cl_2 y se lava con una disolución acuosa de hidróxido sódico 0,1 M. La fase orgánica se seca con Na_2SO_4 , se filtra y se evapora el disolvente obteniendo el cromoionóforo 1,2-benzo-7-(dietilamino)-3-(octadecanoilimino)fenoxacina. Se purifica mediante una columna de silicagel utilizando acetato de etilo como disolvente. Se obtienen 350 mg (R: 94%) del compuesto deseado cuya estructura podemos ver en la Figura 2.1.

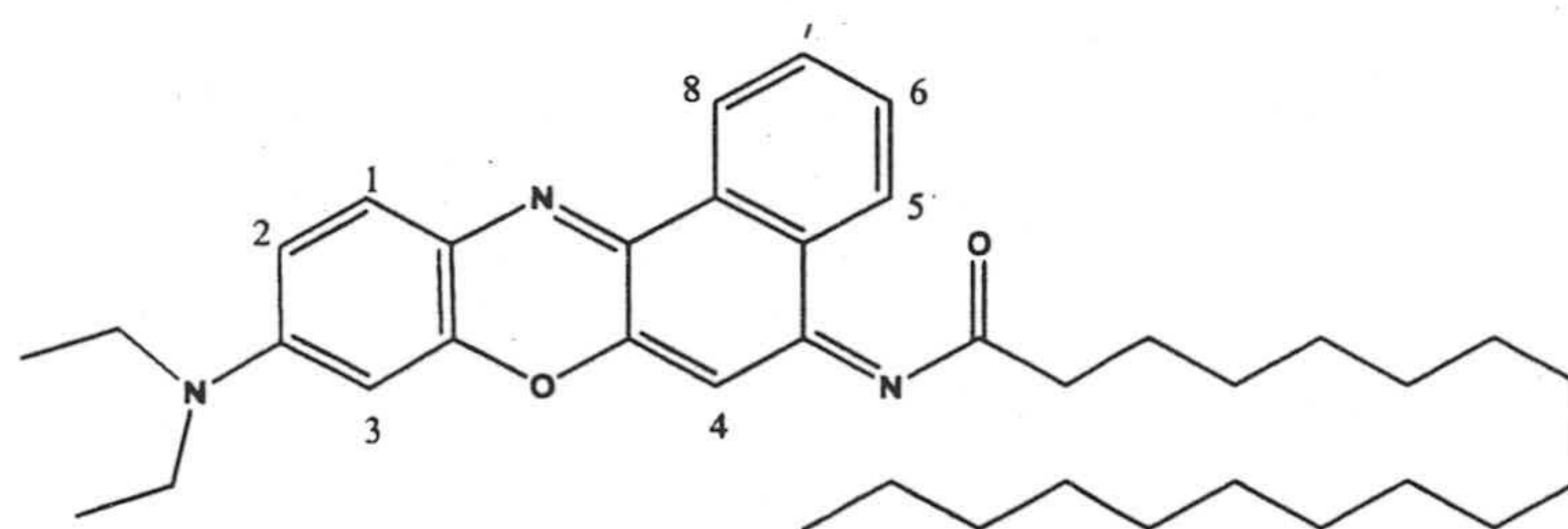


Figura 2.1. Estructura del azul Nilo lipofilizado

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

A continuación se registraron espectros de resonancia magnética nuclear de ^1H al producto sintetizado y al adquirido a Fluka S.A., con el objetivo de compararlo y corroborar que tienen la misma estructura. Estos espectros los podemos observar en Figura 2.2, Figura 2.3., Figura 2.4. y Figura 2.5.

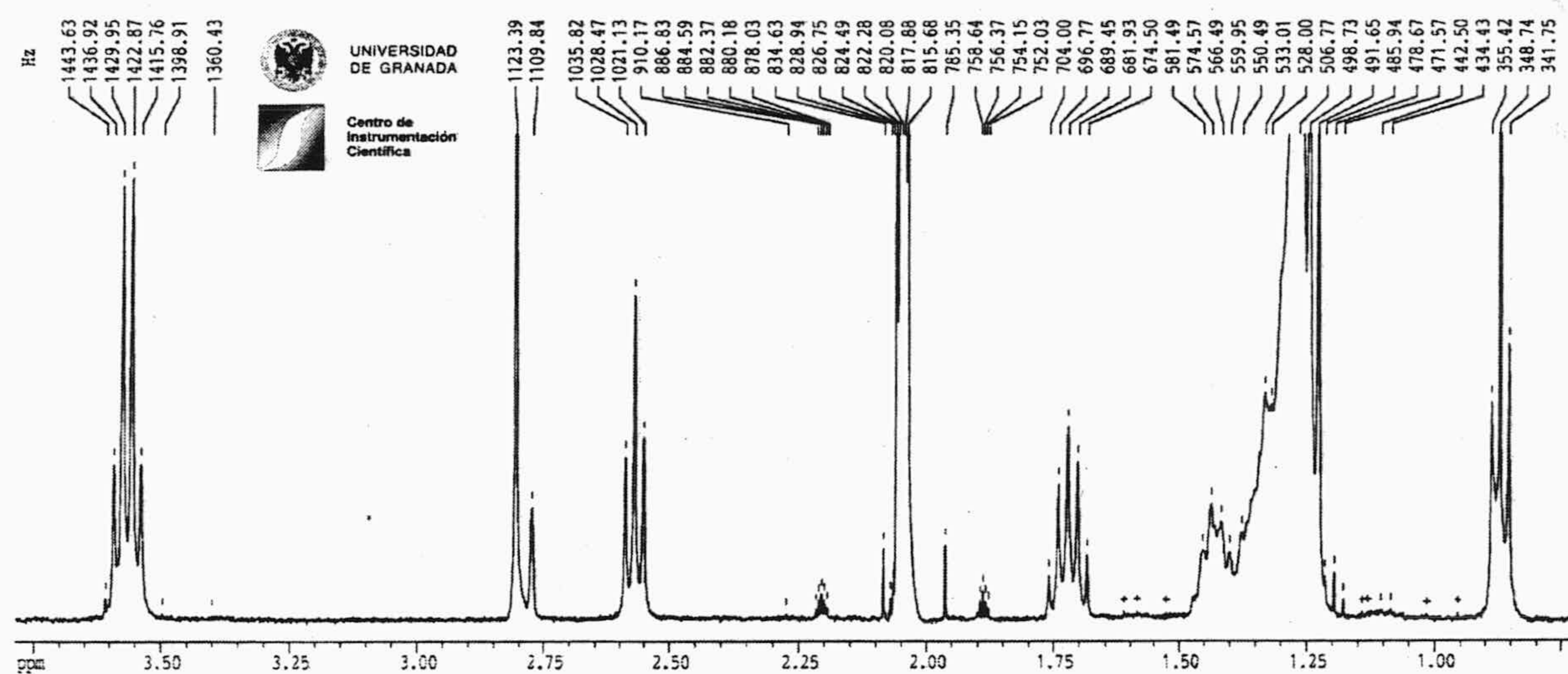


Figura 2.2. RMN ^1H del azul Nilo lipofilizado sintetizado en el laboratorio

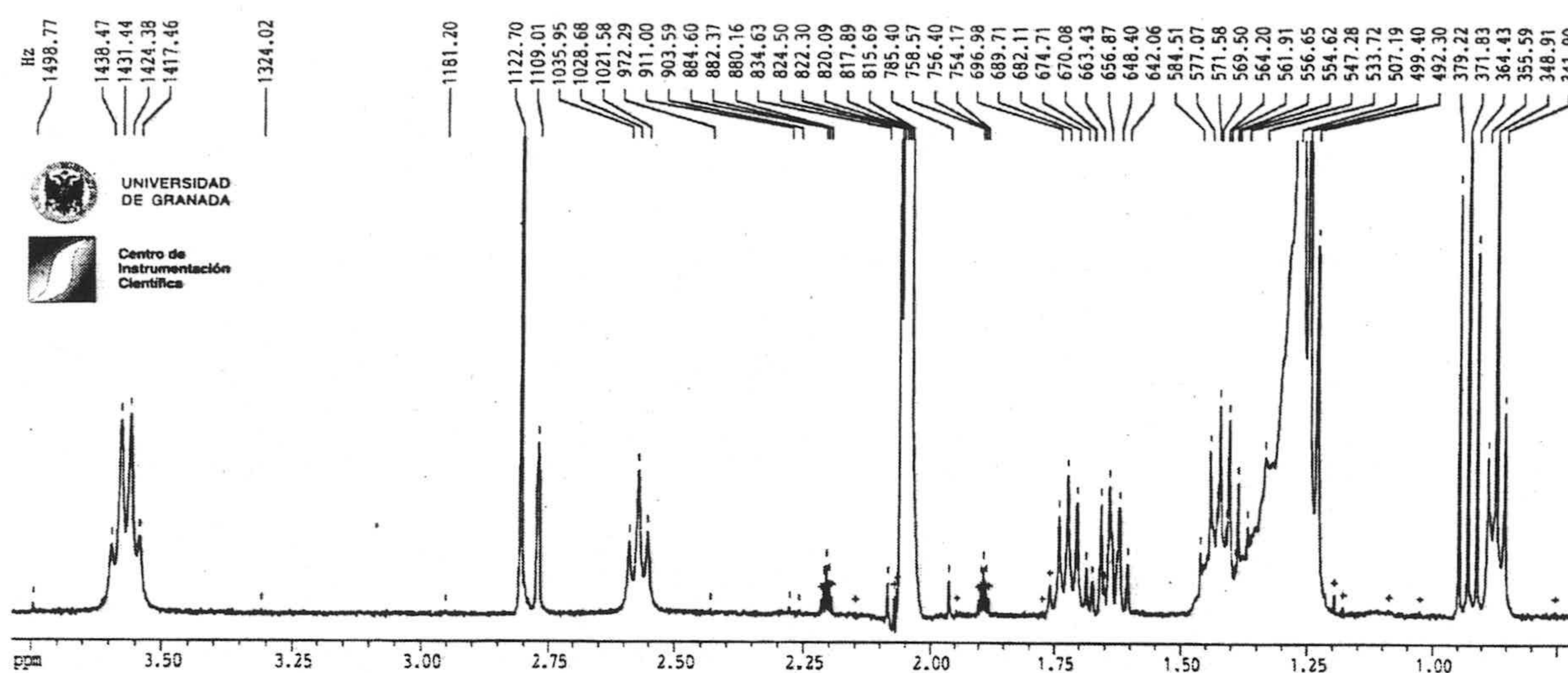


Figura 2.3. RMN ^1H del azul Nilo lipofilizado adquirido a Fluka S.A.

En el espectro se aprecian como señales características comunes un doblete a δ 8,61 ppm correspondiente al hidrógeno 5 ó 6; un doblete que resuena a δ 8,34 ppm y corresponde al hidrógeno 5 ó 8, un triplete resonando a δ 7,75 ppm correspondiente al hidrógeno 6 ó 7; otro triplete a δ 7,67 ppm debido al hidrógeno 7 ó 6; un doblete a δ 7,55 ppm que se origina en el hidrógeno 1; un doblete que resuena a δ 6,80 ppm y que corresponde al hidrógeno 2; un doblete a δ 6,55 ppm debido al hidrógeno 3; un singulete a δ 6,31 ppm originado en el hidrógeno 4; un cuatriplete a δ 3,56 ppm que tiene su origen en los 4 hidrógenos de los metilenos nitrogenados ($\text{Me-CH}_2\text{-N}$); un triplete a δ 2,57 ppm correspondiente a los dos hidrógenos adyacentes al grupo carbonilo ($\text{CH}_2\text{-CO-NH}$); un quintuplete resonando a δ 1,72 ppm debido a los dos hidrógenos separados por un metileno del grupo carbonilo ($\text{HN-COCH}_2\text{-CH}_2$); un multiplete a δ 1,50-1,20 ppm que corresponde a los hidrógenos de los grupos ($(\text{CH}_2)_{14}$) y, por último, una señal a δ 0,87 ppm que resuena como triplete y que corresponde al disolvente $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$.

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

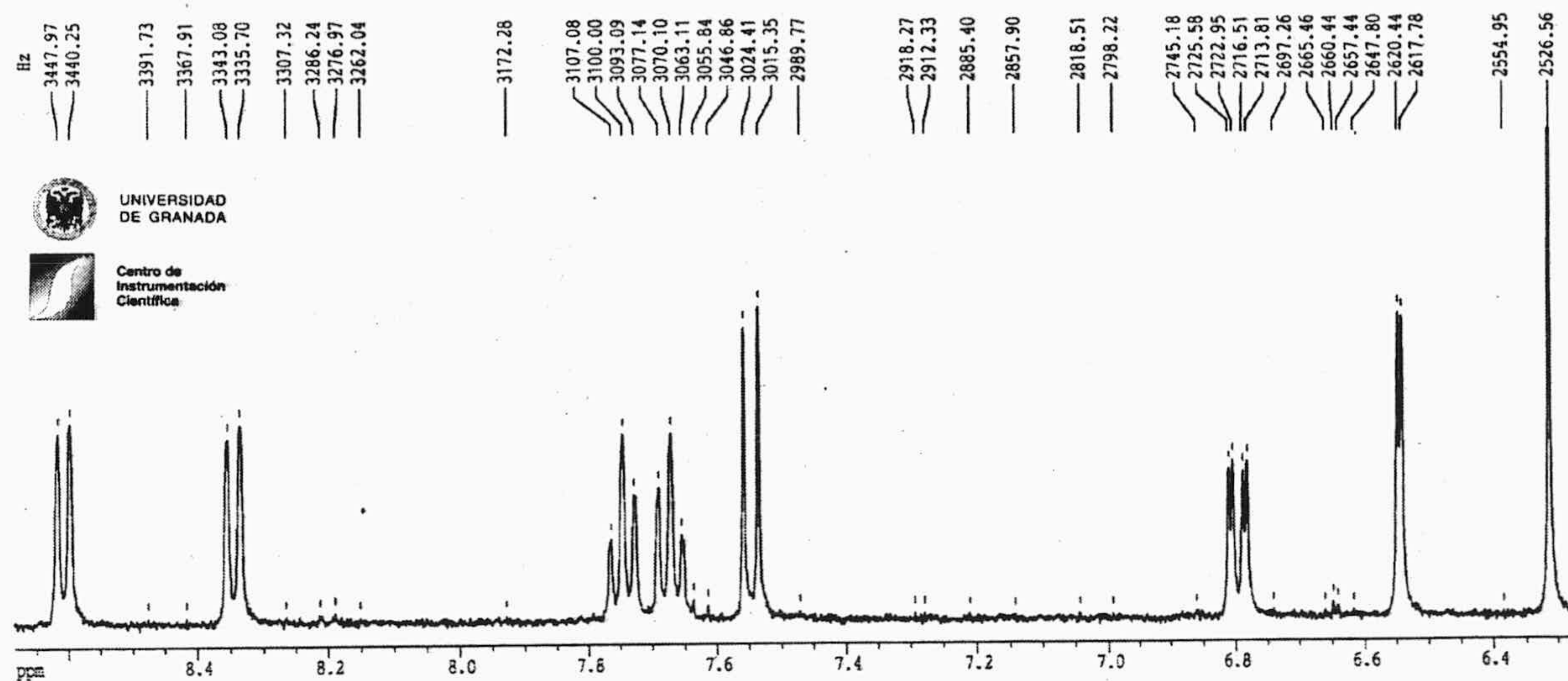


Figura 2.4. RMN ¹H ampliado del azul Nilo lipofilizado sintetizado en el laboratorio

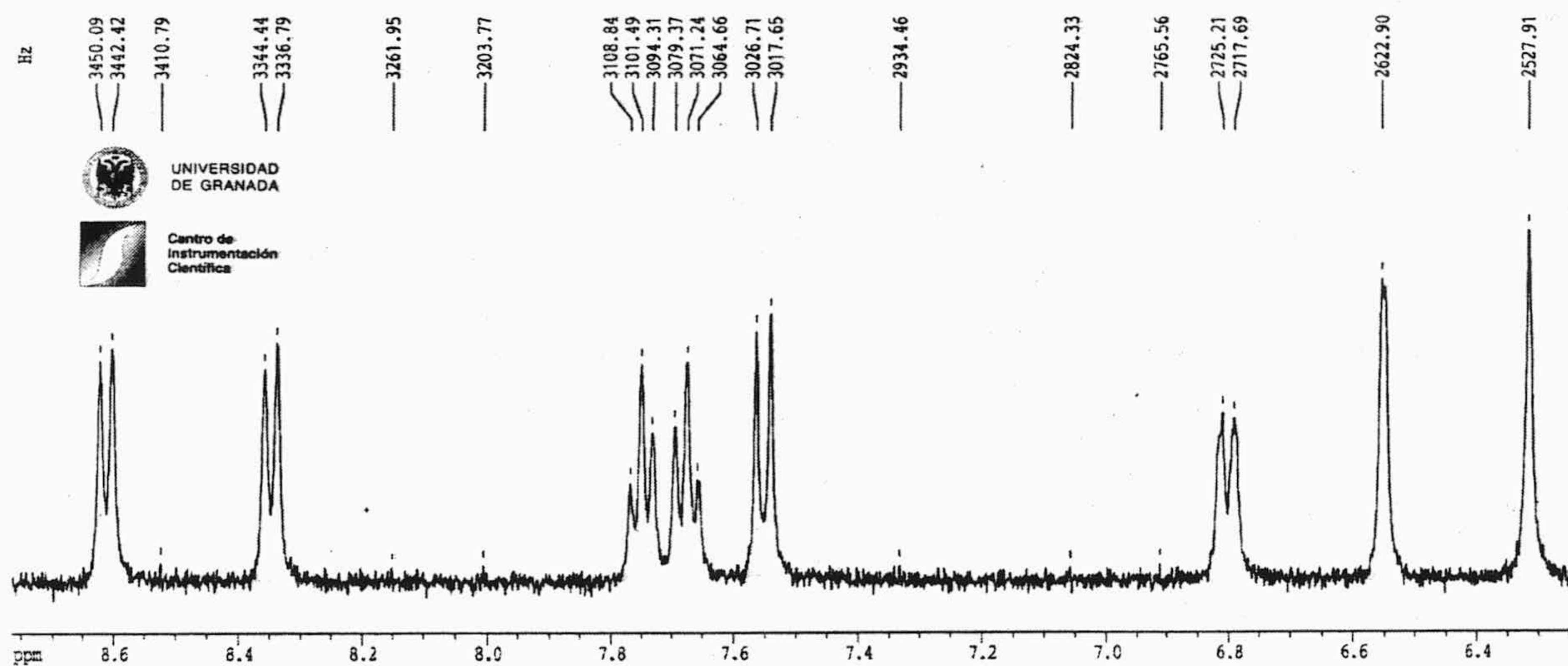


Figura 2.5. RMN ¹H ampliado del azul Nilo lipofilizado adquirido a Fluka

1.3.4.2. Síntesis del ionóforo 4,13[bis(N-adamantilcarbamoil)acetil]-1,7,10,16-tetraoxa-4,13diazaciclooctadecano

La síntesis de ionóforo 4,13[bis(N-adamantilcarbamoil)acetil]-1,7,10,16-tetraoxa-4,13diazaciclooctadecano, conocido como K22B5, fue descrita en el año 1995 por Suzuki *et al.*³, y consta de tres etapas, empleando como producto de partida adamantilamina, la sal potásica de hemiester malónico y el éter corona 1,4,10,13-tetraoxa-7,16-diazaciclooctadecano. Dado que los autores no facilitan rendimientos ni señalan cuales son las etapas de reacción ni datos físicos de las producciones intermedias y productos finales de reacción, se ha procedido a poner a punto una nueva síntesis de este compuesto, al cual de forma abreviada denominamos K22B5, manteniendo el acrónimo con el que lo describieron los autores arriba citados.

Para realizar la síntesis, hacen reaccionar la sal potásica del hemiester malónico con cloruro de tionilo para transformarla en el cloruro de ácido del hemiester malónico. Dicho cloruro de ácido lo hacen reaccionar posteriormente, con adamantilamina (I) en cloruro de metileno como disolvente, para así formar la correspondiente amida (II). Es de resaltar que los autores obtienen un bajo rendimiento, en el único caso que lo indican, que es en este caso, de solo de un 10%. Una explicación del bajo rendimiento obtenido puede ser que llevan a cabo la formación de la amida en ausencia de una base que neutralice el HCl que se forma en la reacción, y por tanto, será la amina que se debe transformar en amida, la que actúa como base originando el correspondiente clorhidrato de la amina que no se acila, como se comentará más adelante. Nosotros hemos empleado en esta etapa una amina terciaria (triethylamina), obteniendo así mejores rendimientos en la formación de la amida.

Los carbamoil esteres (II) obtenidos se transformarán en los correspondientes ácidos carboxílicos mediante tratamiento con hidróxido de litio en medios hidroalcohólicos. Finalmente, los ácidos carbamoilcarboxílicos (III) se convertirán en las diamidas (IV) correspondientes, empleando reactivos de acoplamiento. Los autores citados utilizan en

³ Suzuki, K., Watanabe, K., Matsumoto, Y., Kobayashi, M., Sato, S., Siswanta, S. y Hisamoto, H. *Anal. Chem.*, 67, 324 (1995).

concreto el cloruro de ácido N,N- bis (2-oxo-3-oxazonolidinil) fosfínico. El rendimiento que indican en esa etapa final es del 44%; es decir, rendimientos moderados.

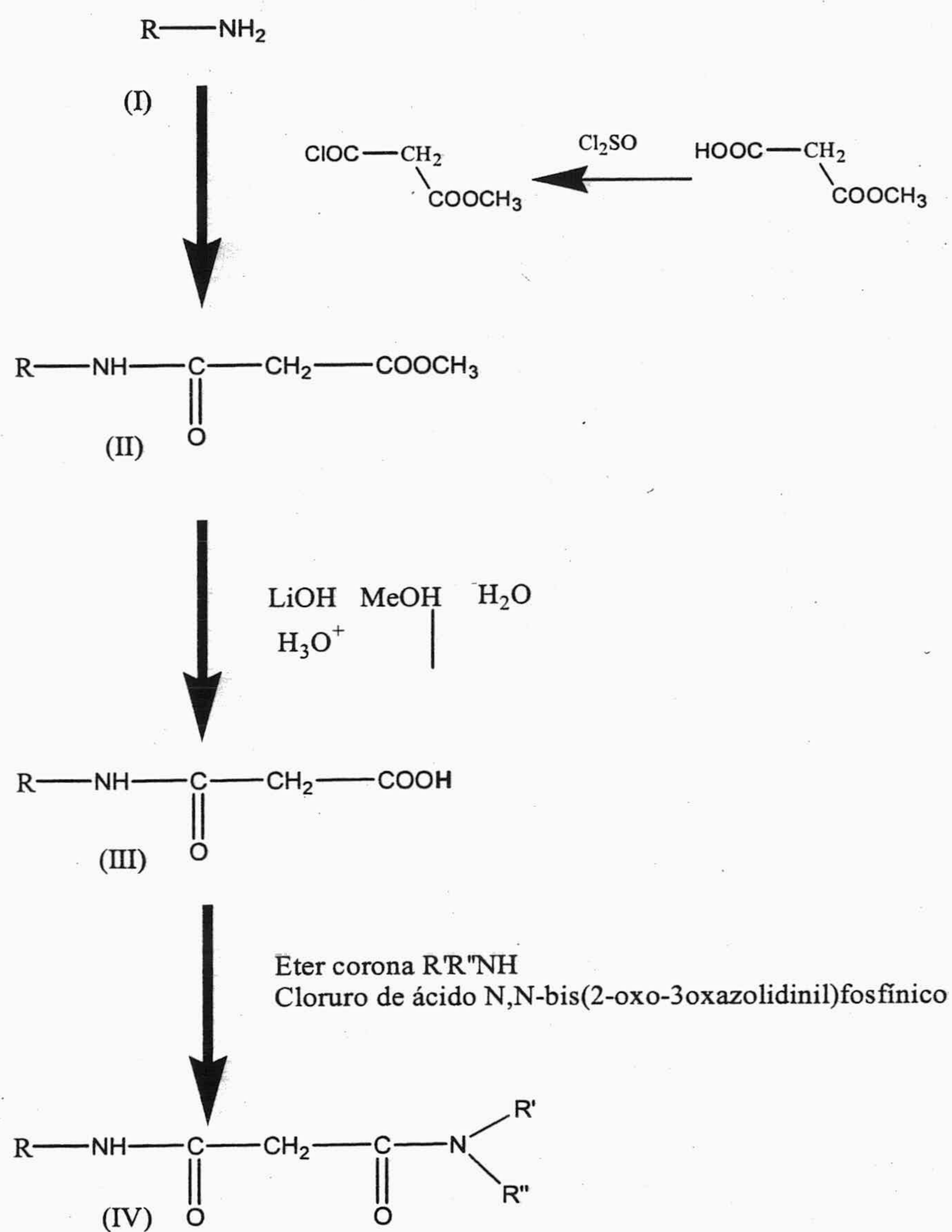


Figura 2.6. Esquema de las reacciones seguidas para la síntesis del ionóforo K22B5.

Teniendo en cuenta estos resultados se realizó la síntesis del ionóforo K22B5 modificando el procedimiento descrito, tal y como se indica a continuación y se esquematiza en la Figura 2.6.

La síntesis de la amida (II) (R= adamantil) se realizó por reacción de la adamantilamina, que es un producto comercial, con el cloruro de ácido monometilmalónico, también producto comercial, en cloruro de metileno anhidro como disolvente y en presencia de trietilamina, obteniéndose la amida (II) (R=adamantil) con un rendimiento del 71%. Tras purificación mediante cromatografía en columna, se estableció la estructura utilizando datos espectroscópicos procedentes de IR, ^1H y ^{13}C -RMN.

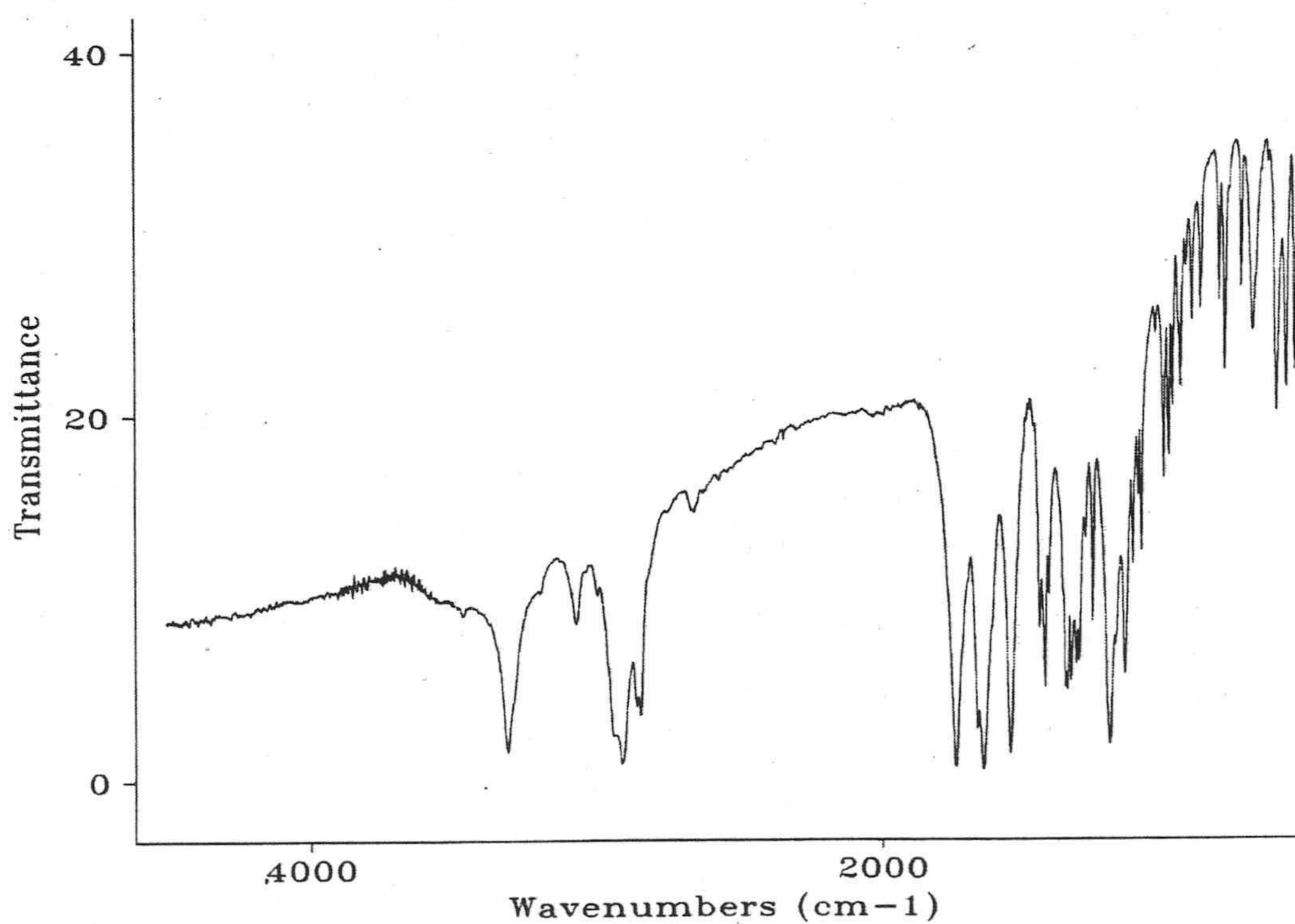


Figura 2.7. Espectro IR (KBr) de II.

Así el IR presenta las bandas características de los grupos funcionales presentes en la molécula a 3311 cm^{-1} (NH), 1743 cm^{-1} (COO), 1647 cm^{-1} (CON) y 1552 cm^{-1} (CN).

En el espectro de ^1H -RMN se puede observar el NH como singlete ancho a 6-6,65 ppm, los hidrógenos del grupo metoxi aparecen igualmente como singlete a δ 3,71 ppm, mientras que los de grupo metileno (CH_2) resuenan a δ 3,21 ppm y los hidrógenos del sistema policíclico del adamantil resuenan como singletes a δ 2,04 ppm (3CH), 1,99 ppm y 1,65 ppm (6 CH_2).

El espectro de ^{13}C -RMN es plenamente concordante con la estructura propuesta, así a campo bajo, δ 170,4 y 163,4 ppm, aparecen las señales correspondientes a los carbonos del grupo carbamoil y ester presentes en la molécula; el $\text{CH}_3\text{-O}$ aparece a δ 52,4 ppm, mientras que el carbono cuaternario de la adamantilamina que se encuentra unido al nitrógeno resuena a 52,1 ppm. El resto de las señales a 42,2, 41,5, 36,4 y 29,5 corresponden a los carbonos metilénicos presentes en la molécula.

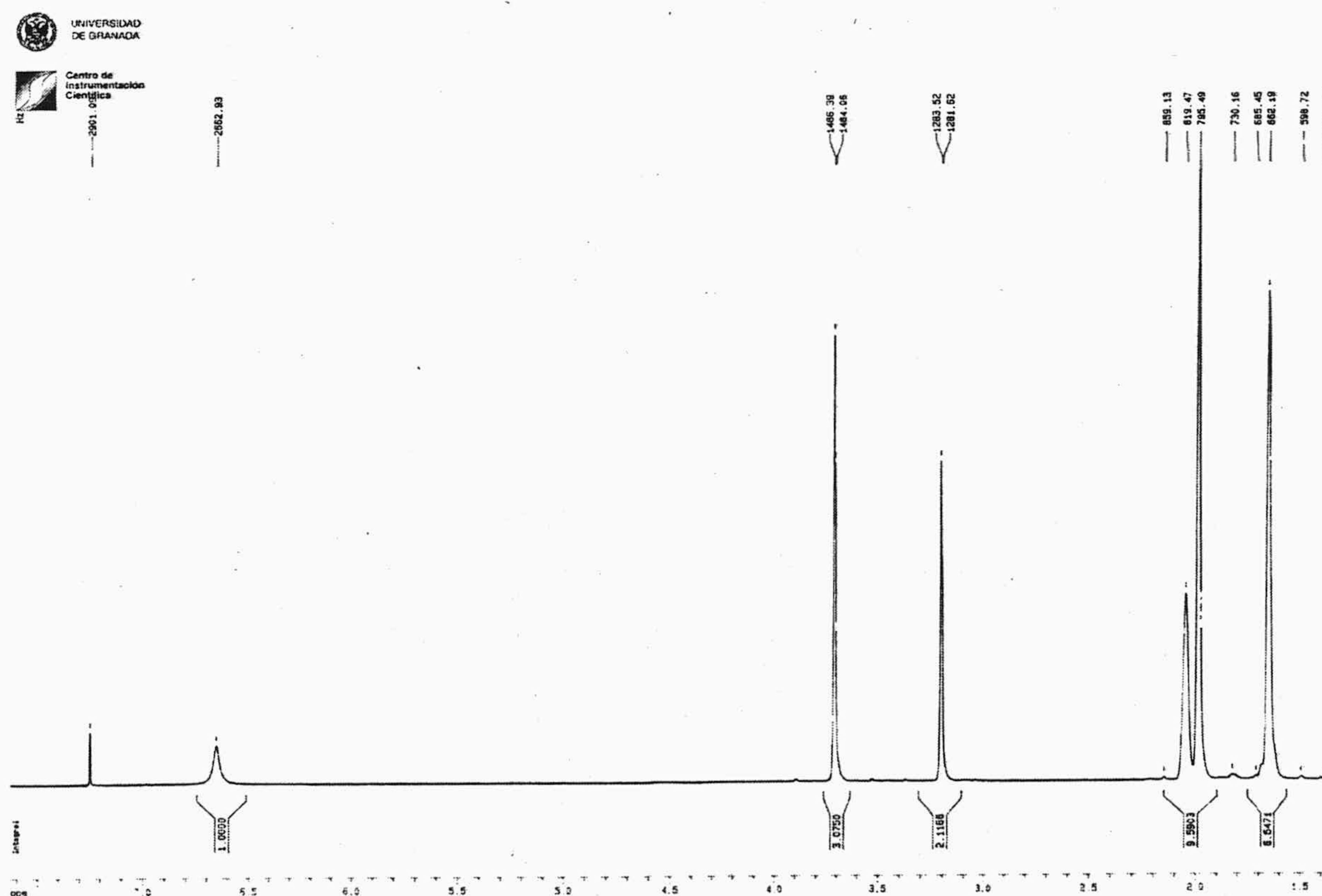
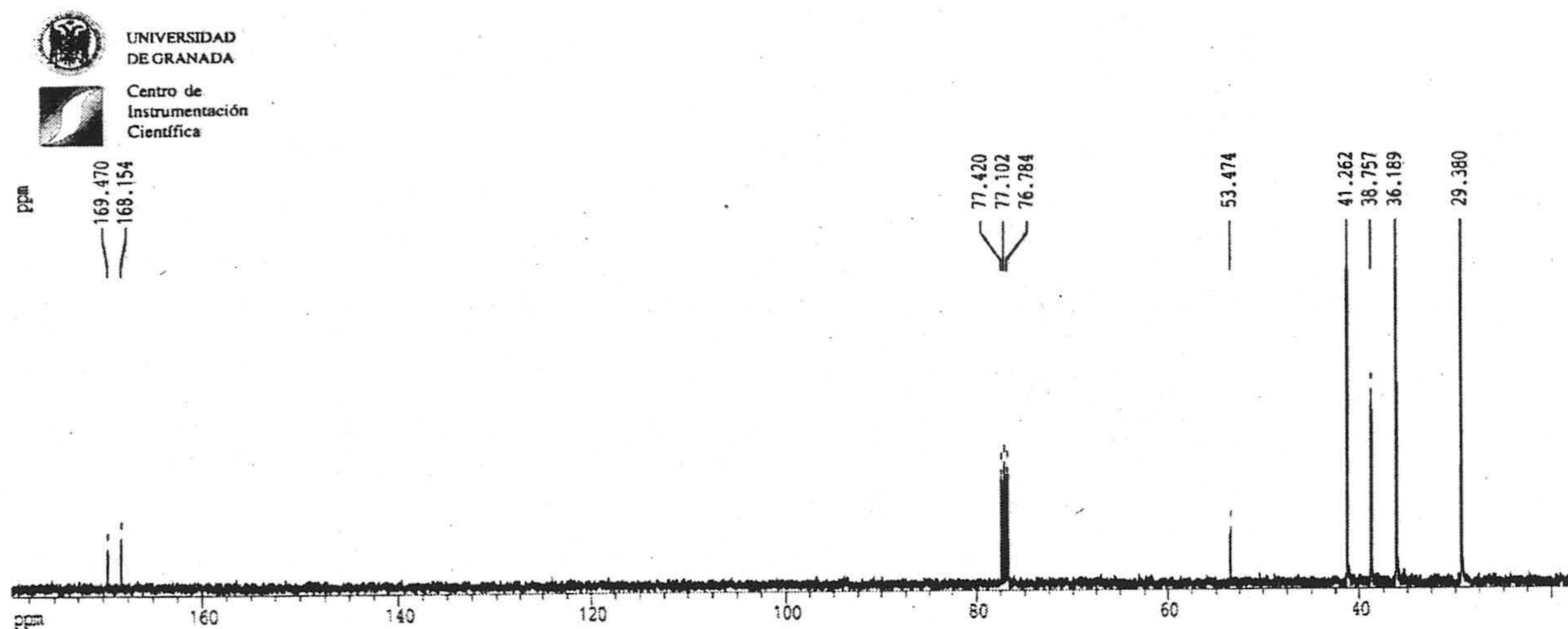


Figura 2.8. H-RMN (CDCl_3 , 400 MHz) de IIFigura 2.9. ^{13}C -RMN (CDCl_3 , 100 MHz) de II

El ester (II) ($\text{R} = \text{adamantil}$) se transformó en el correspondiente ácido carboxílico (III) ($\text{R} = \text{adamantil}$) por tratamiento con hidróxido de litio en metanol:agua (saponificación) seguido de acidulación de la sal de litio con ácido clorhídrico. El ácido (III) obtuvo con un rendimiento del 89% y su estructura se estableció en base a datos espectroscópicos de IR, ^1H -RMN, ^{13}C -RMN.

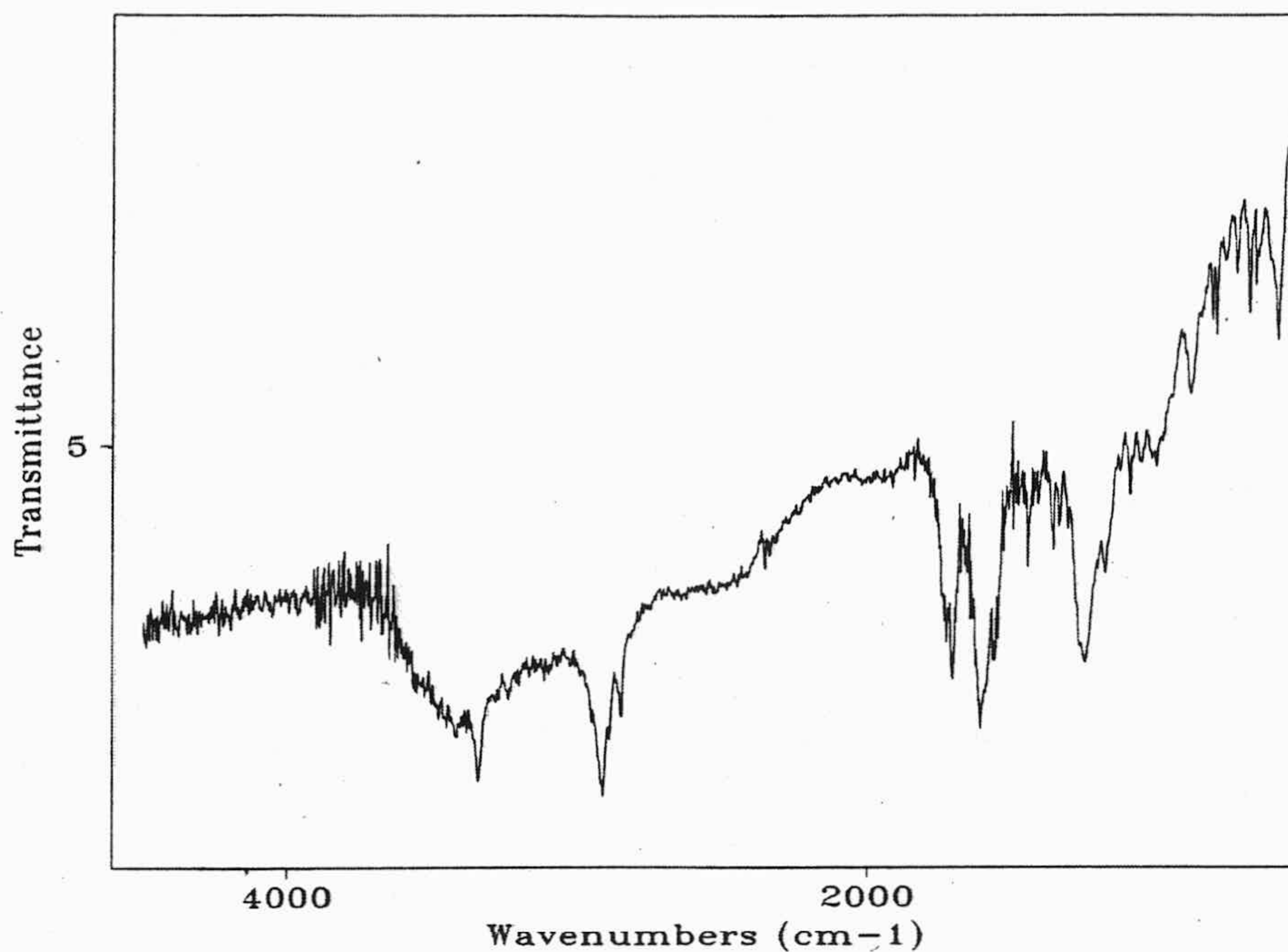


Figura 2.10. Espectro IR (KBr) de III.

El espectro de IR (Figura 2.10) presenta como bandas significativas las que aparecen a 3342 cm^{-1} (NH), $3500\text{-}2600\text{ cm}^{-1}$ (banda ancha del OH del COOH), 1709 cm^{-1} (CO) y 1614 cm^{-1} (CON).

En el espectro $^1\text{H-RMN}$ (Figura 2.11) el NH aparece como un singlete a $\delta 6,4\text{ ppm}$, los hidrógenos del metileno contiguo a ambos grupos carbonilo aparecen a $\delta 3,27\text{ ppm}$ como un singlete, mientras que los del sistema tricíclico (adamantil) aparecen como tres singletes a $\delta 2,11, 2,03, 1,70\text{ ppm}$ correspondiendo a los CH y al CH_3 , respectivamente.

La última etapa de la síntesis del ionóforo K22B5, consiste en la formación del enlace amida entre el grupo carboxílico del ácido (III) (R=adamantil) y el éter corona 1,4,10,13-tetraoxa-7,16-diazaciclo octadecano.

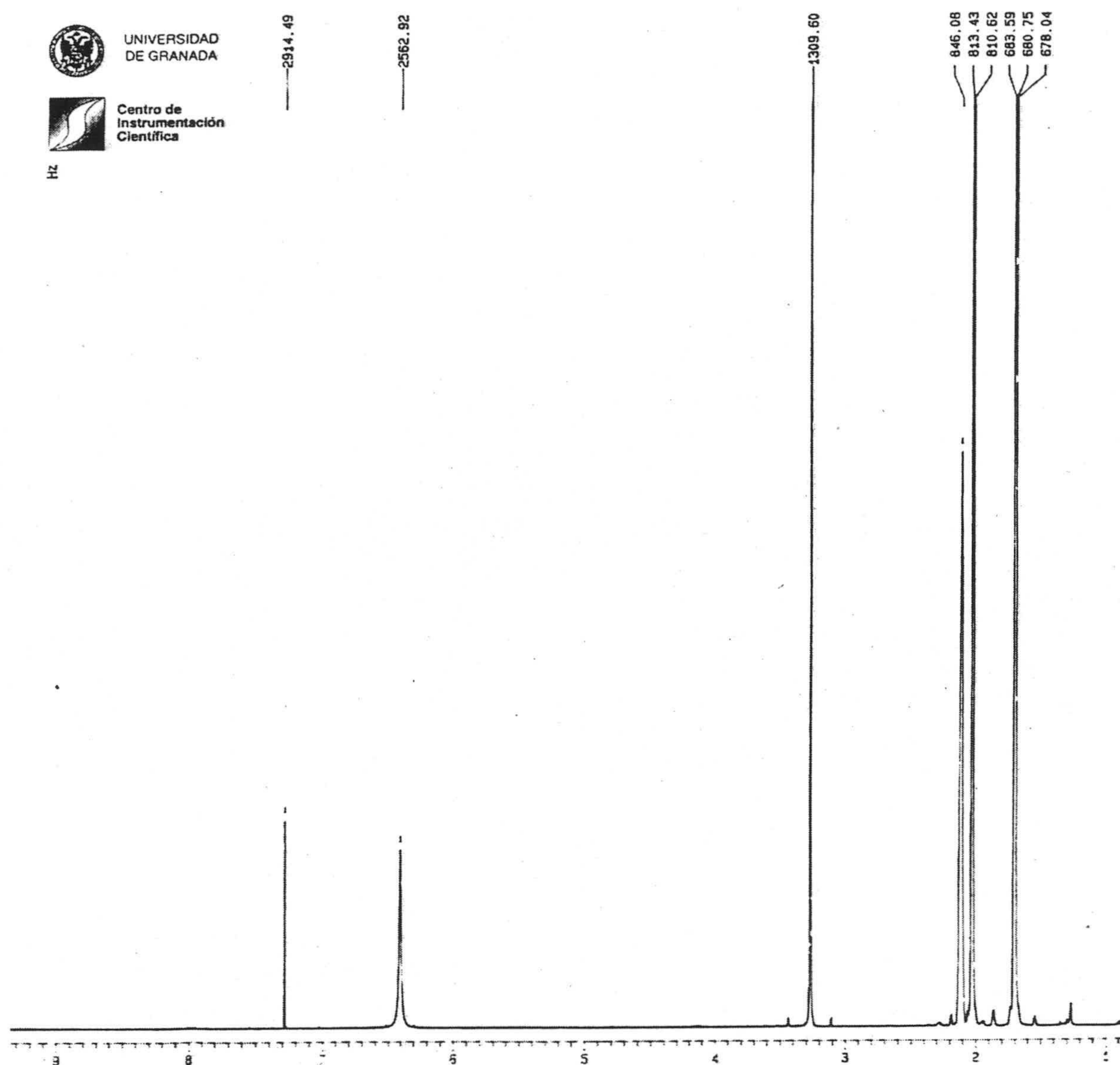


Figura 2.11. ^1H -RMN (CDCl_3 , 400 MHz) de III

La formación de la diamida IV se ha realizado empleando como reactivo de acoplamiento N,N-diciclohexilcarbodiimida (DCC) reactivo mucho más económico que el empleado por Suzuki y col. Así mismo, teniendo en cuenta que el ácido (III) se obtiene fácilmente con buenos rendimientos y a bajo costo y que el éter corona 1,4,10,13-tetraoxa-7,16-diazaciclo octadecano es caro, se ha empleado solo un exceso de 1,1 moles de dicho

ácido. El compuesto deseado K22B5 se ha obtenido con un rendimiento del 68% tras purificar el crudo de reacción mediante cromatografía preparativa en columna. La estructura del ionóforo K22B5 se ha establecido en base a sus datos espectroscópicos (masas, IR, ^1H y ^{13}C -RMN).

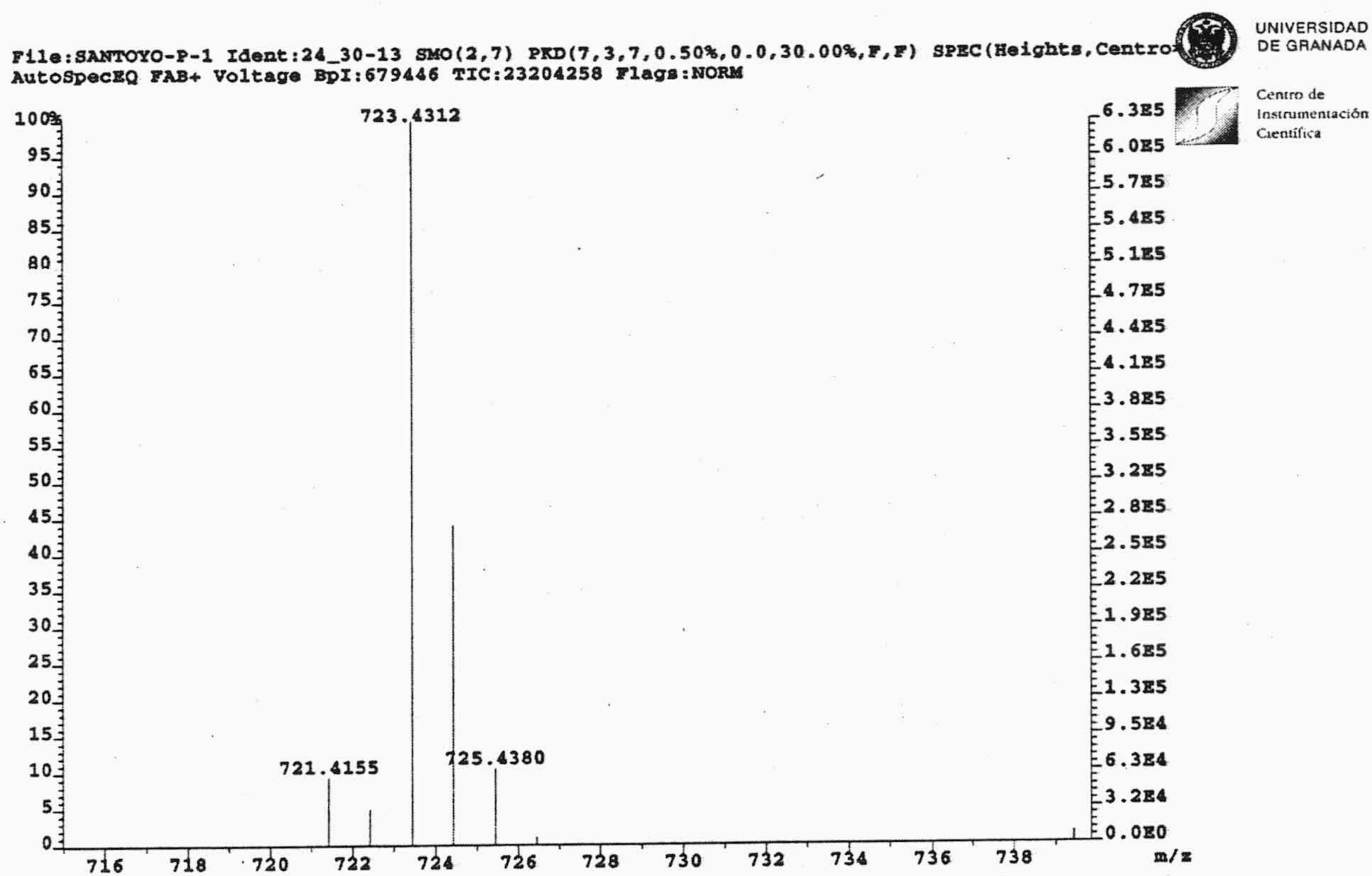


Figura 2.12. HR MS (FAB +) de K22B5 calculado para $\text{C}_{38}\text{H}_{60}\text{N}_4\text{O}_8\text{Na}$ [M+Na] 723,4308. Encontrado 723,4312.

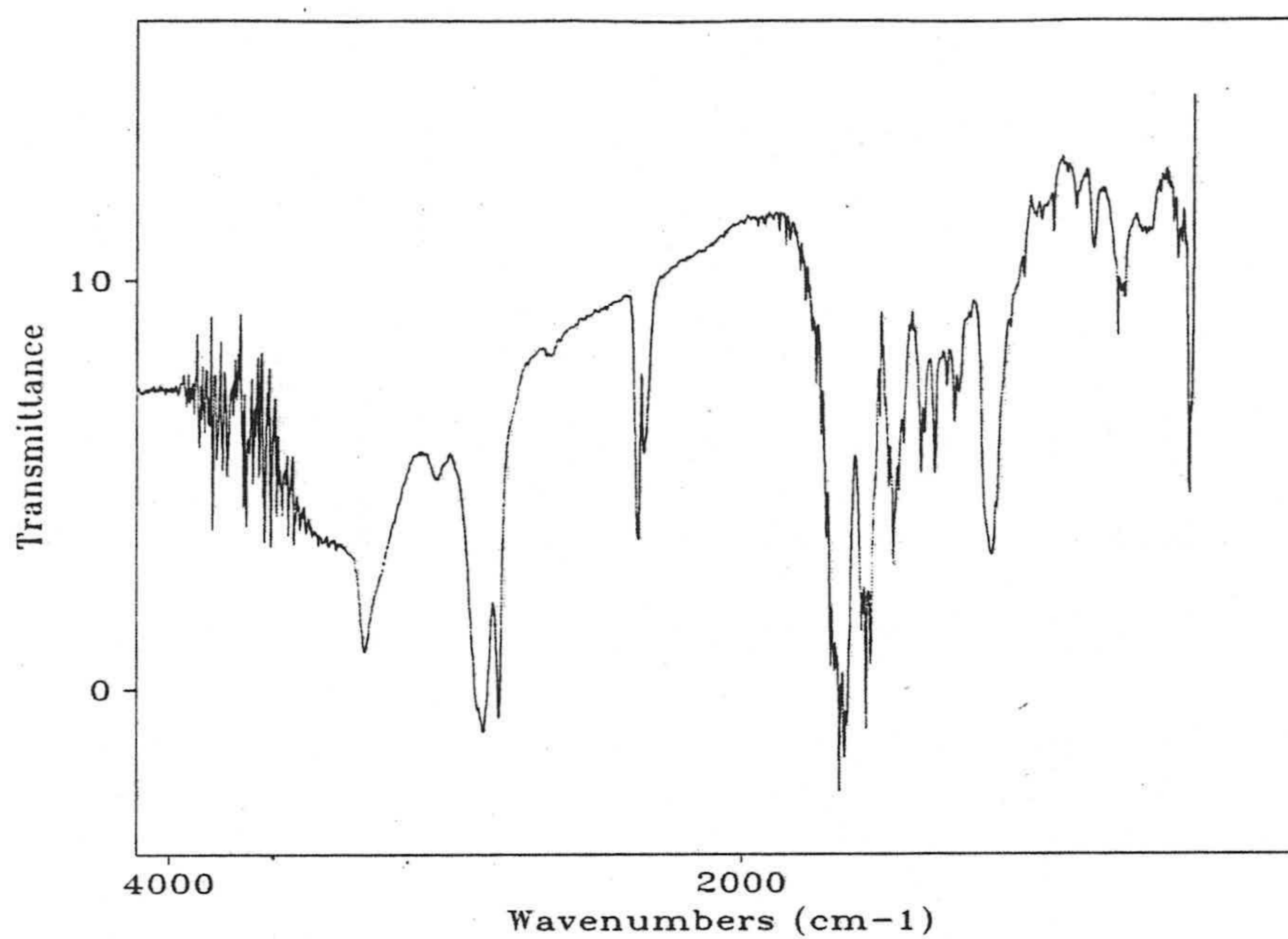


Figura 2.14. IR (KBr) de K22B5.

El espectro de masas (F.A.B.+) (Figura 2.12) presenta un ión a m/e 723,4312 que es plenamente concordante con la fórmula molecular del ionóforo $C_{38}H_{60}N_4O_8Na$ ($M + Na$)⁺ e indica que ambos grupos amino han reaccionado con el ácido carboxílico (III) (R = adamantil). El espectro IR (Figura 2.14) presenta las bandas características de los grupos funcionales presentes en la molécula a 3321 cm^{-1} (NH), 1653 cm^{-1} , 1635 cm^{-1} (CON) y 1558 cm^{-1} , 1541 cm^{-1} (CN).

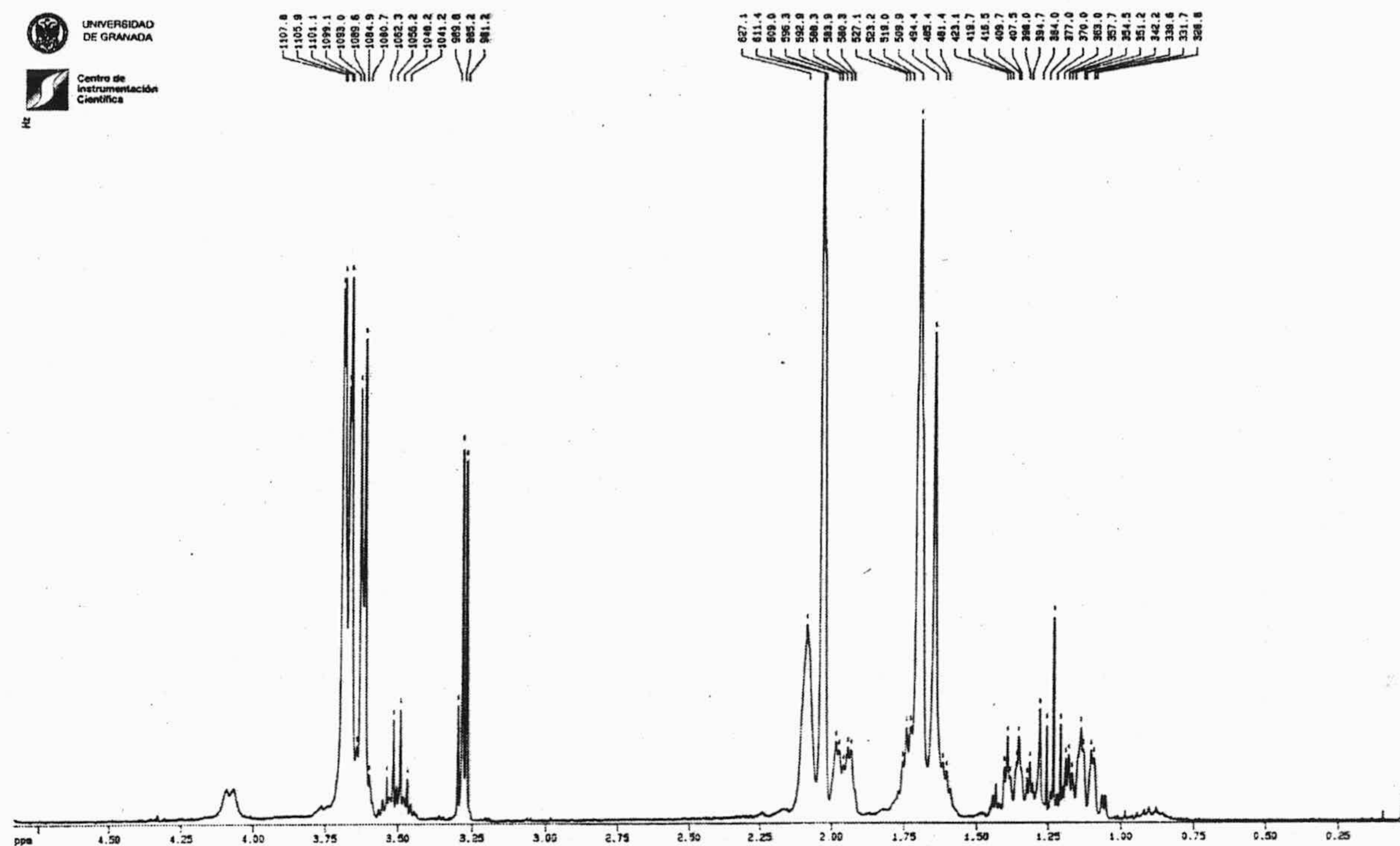


Figura 2.15. ^1H -RMN (CDCl_3 , 400 MHz) de K22B5.

El espectro de ^1H -RMN (Figura 2.15) presenta un singulete ancho a δ 6.40 ppm correspondiente al (NH), entre δ 3.60 y 3.45 ppm aparece un multiplete complejo que corresponde a los hidrógenos de los metilenos unidos al oxígeno y nitrógeno (CH_2O y CH_2N), los CH_2 contiguos a ambos grupos carbonilos no aparecen con una única señal, como cabría esperar, esto es debido a un problema rotacional propiciado por los enlaces amida presentes. Por último, los CH y CH_2 del sistema tricíclico aparecen como tres singuletes a δ 1,97 ppm (CH) 1,89 y 1,60 ppm (CH_2).

Al igual que los datos espectroscópicos anteriormente mencionados, los correspondientes al espectro ^{13}C -RMN (Figura 2.16) son también concordantes con la

estructura propuesta. En este caso, las señales de los carbonos carbonílicos no se observan, pese a que el espectro se ha realizado con un elevado número de pulsos. Las señales debidas a los carbonos unidos a oxígeno (CH_2O) son poco intensas y aparecen entre 71,05 y 69,65 ppm en lugar de las cuatro señales que deberían de aparecer si no existiese problema rotacional. Los carbonos unidos a nitrógeno (CH_2N) también aparecen como dos señales débiles a δ 49,7 y 49,63 ppm. El átomo de carbono cuaternario correspondiente al anillo adamantil que se encuentra unido a nitrógeno resuena a δ 49,3 ppm. Los carbonos metilénicos (COCH_2CO) aparecen a δ 41,7 ppm y los carbonos metilénicos del sistema tricíclico resuenan a δ 41,5 y 36,4 ppm. Por último, los CH del resto de adamantil aparecen a δ 29,5 ppm. Se ha de indicar que todas estas asignaciones han sido realizadas en base a experimentos bidimensionales de correlación protón-carbono (Figura 2.17).

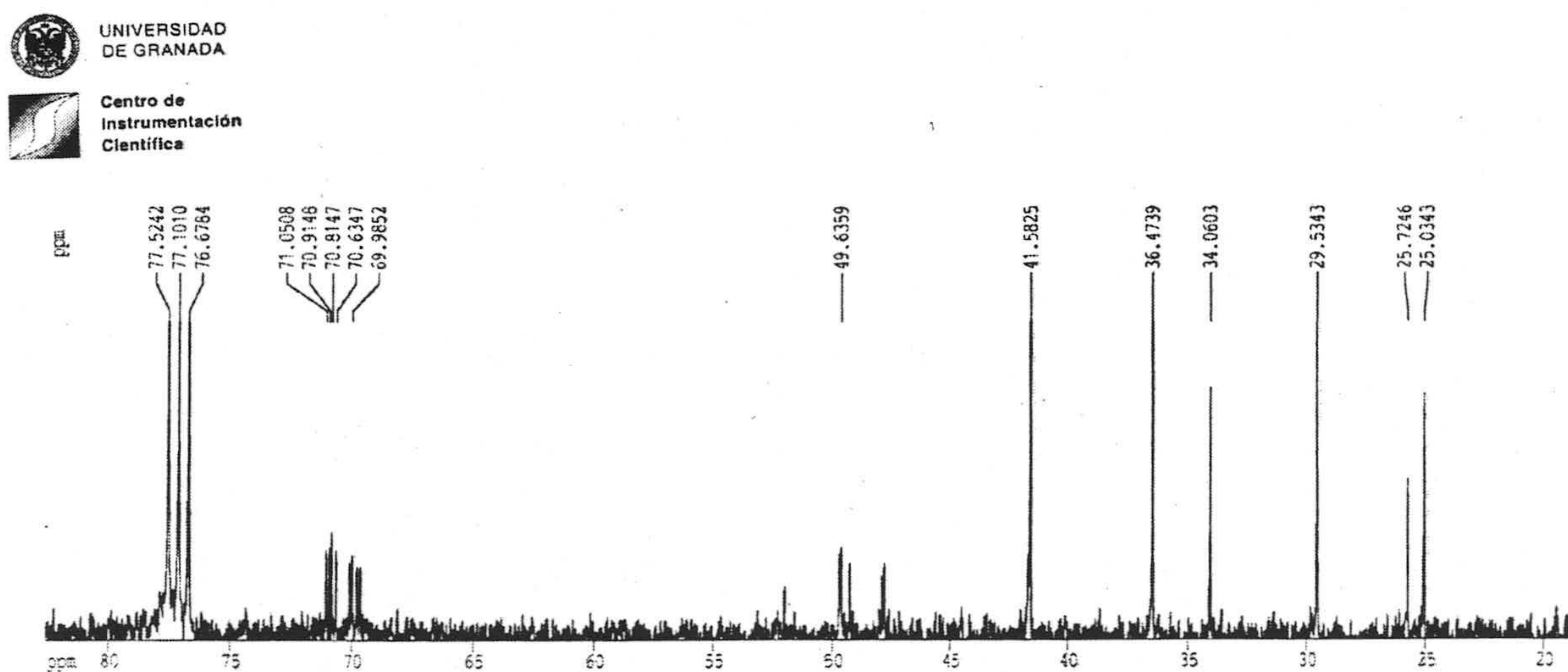


Figura 2.16. ^{13}C -RMN (CDCl_3 , 75 MHz) de K22B5.

Como conclusión podemos decir que se efectuó la síntesis del ionóforo K22B5 en tres etapas, con un rendimiento global del 43,6% (71x89x68).

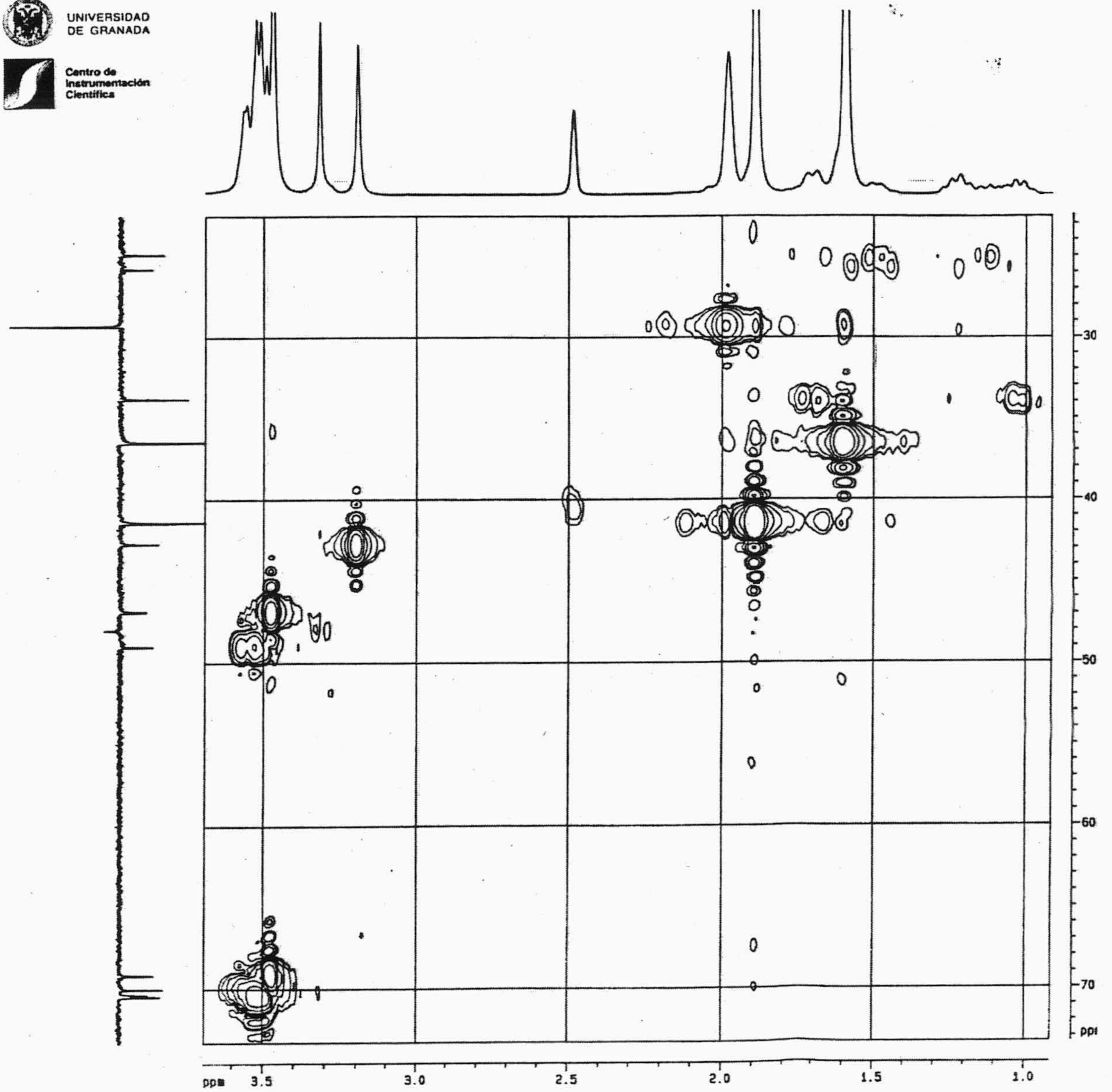


Figura 2.17. Espectro bidimensional protón-carbono del K22B5.

1.3.4.3. Síntesis de 4,13-[bis(N-adamantilcarbamoil)propionil]-1,7,10,16-tetraoxa-4,13,-diazaciclooctadecano

La síntesis del ionóforo 4,13-[bis(N-adamantilcarbamoil)propionil]-1,7,10,16-tetraoxa-4,13,-diazaciclooctadecano (SPS1) se ha realizado en dos etapas, como se indica en el esquema siguiente. Este ionóforo es de estructura similar a la del ionóforo anterior, del que se diferencia en el grupo metileno que posee de más entre ambos grupos carbamoil.

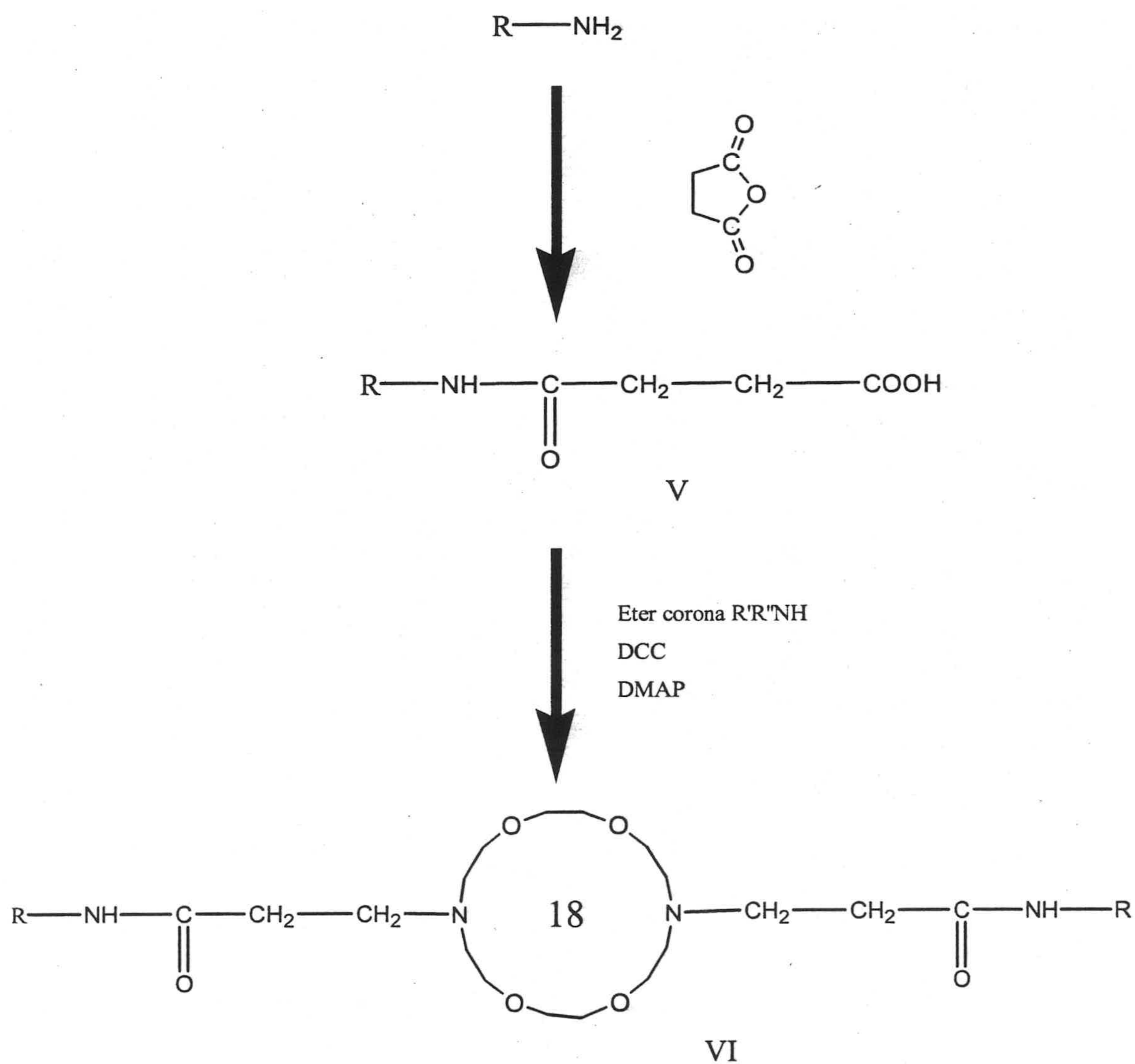


Figura 2.18. Esquema de las reacciones seguidas para la síntesis del ionóforo SPS1.

Si se compara esta síntesis con la anteriormente llevada a cabo, podemos ver que utilizando el anhídrido en lugar del hemiester, se ahorra un paso en la secuencia de síntesis

Síntesis del ácido 4,13-[bis(N-adamantilcarbamoil)propanoico (V): A una disolución de anhídrido succínico (0,8 g; 8mmol) en acetato de etilo (50 ml) se añade una disolución de 1-adamantilamina (1,2 g; 8 mmol) y trietilamina (0,8 g; 8,8 mmol) en acetato de etilo (50 ml). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos. A continuación, se filtró el sólido obtenido, se lavó con HCl (6N), $\text{pH} \approx 1$, y se purificó mediante una columna cromatográfica con eter/hexano (10:1) como eluyente. Se obtuvo 1,4 g (70%) del ácido buscado en forma de un polvo blanco con P.F. 145°C . Al igual que en casos anteriores, la estructura de este compuesto se estableció utilizando los habituales datos espectroscópicos (IR, ^1H -RMN y ^{13}C -RMN).

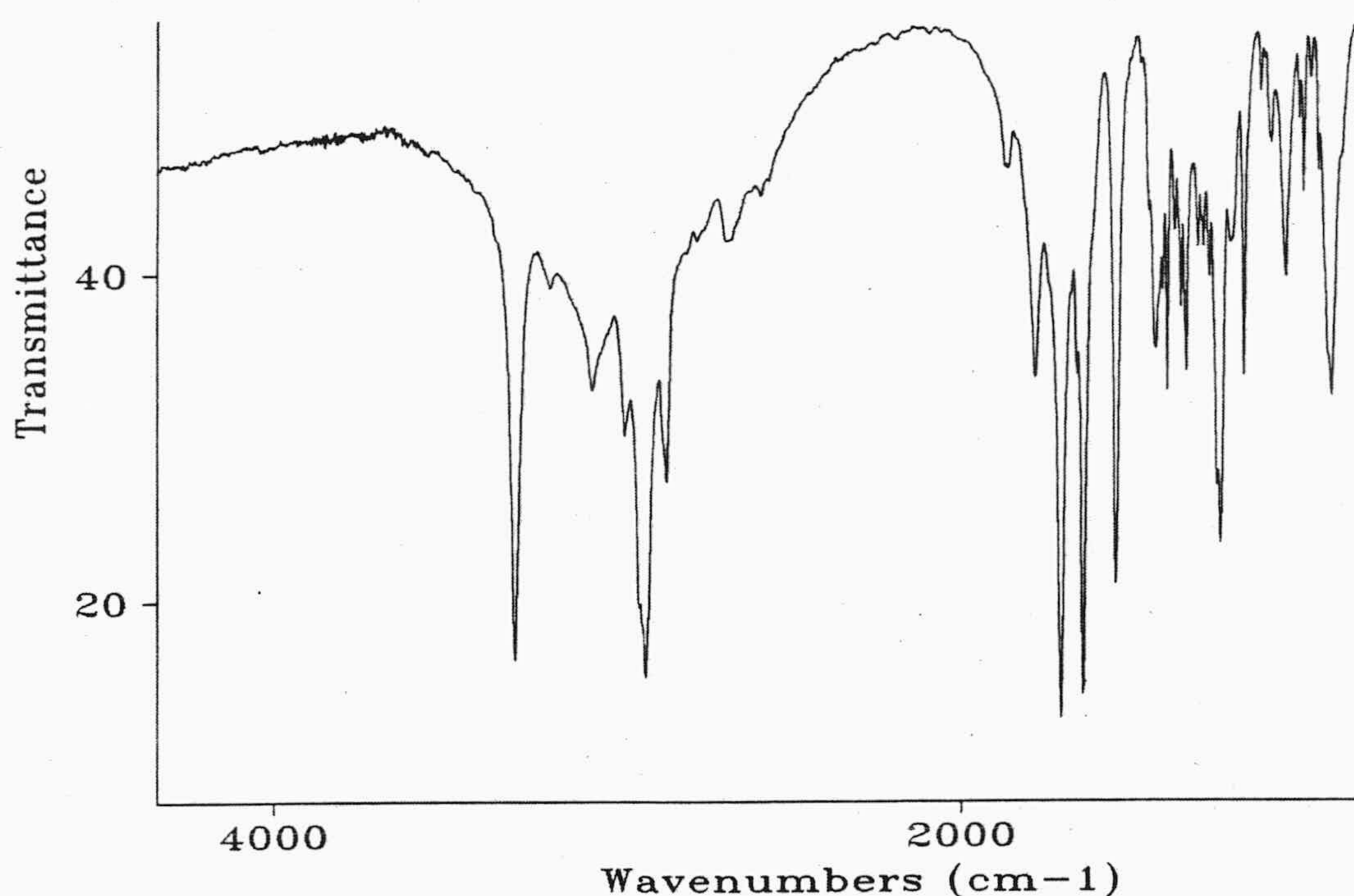


Figura 2.19. Espectro IR (KBr) de V.

El IR (Figura 2.19) presenta como bandas características las situadas a 3311 cm^{-1} (NH), 1743 cm^{-1} (COOH), 1647 cm^{-1} (CON), 1552 cm^{-1} (CN).

El espectro de ^1H -RMN (Figura 2.20) es concordante con la estructura asignada, a δ 7,23 ppm aparece un singlete ancho que corresponde a OH, a δ 5,25-4,45 ppm aparece una señal que corresponde NH y a δ 2,29 y 2,22 ppm aparecen dos multipletes que corresponden a los hidrógenos de los metilenos contiguos a carbonilo. Los metilos y metilenos del anillo de adamantil aparecen como singletes a δ 1,98, 1,89 y 1,60 ppm, respectivamente.

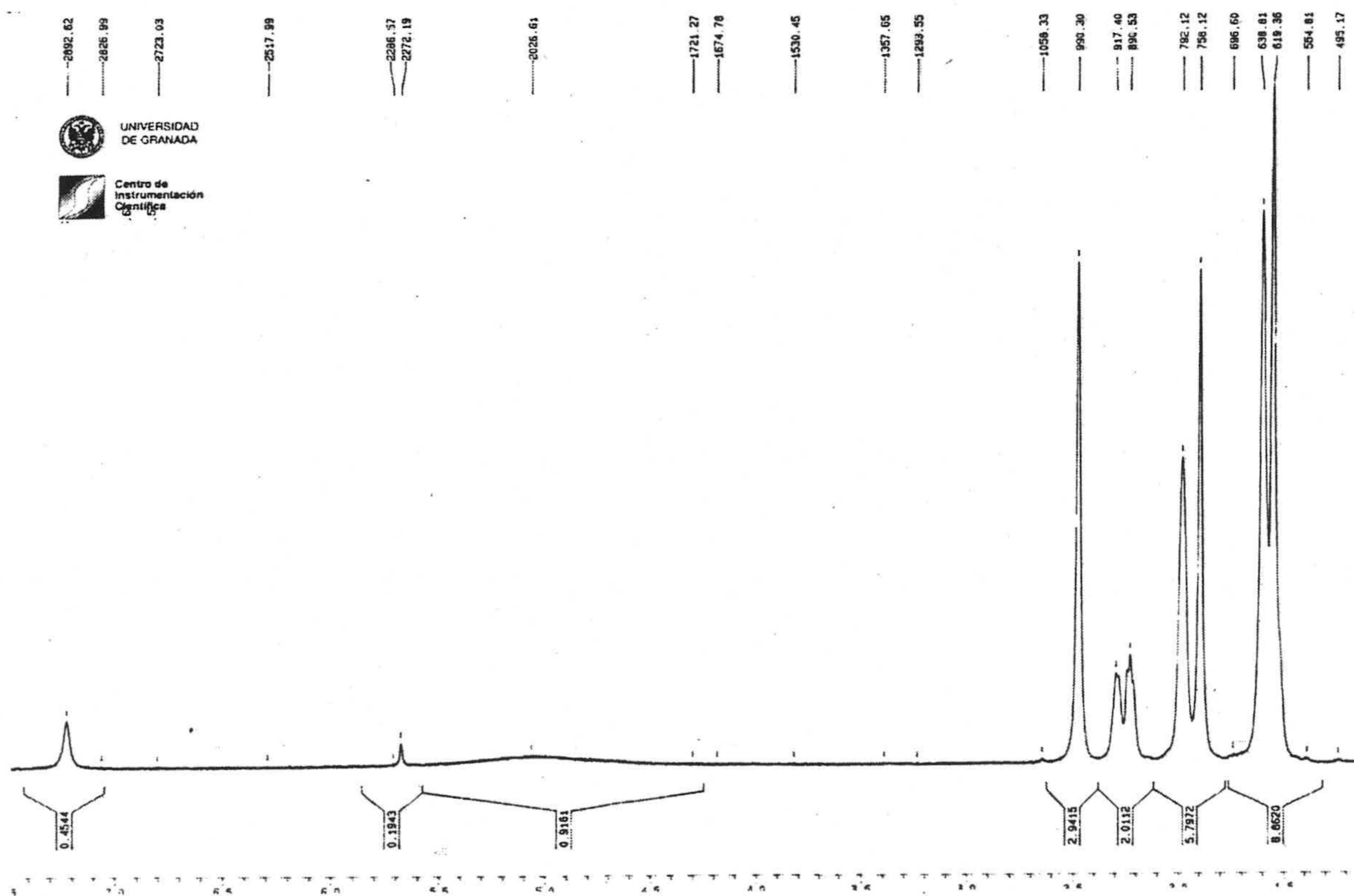


Figura 2.20. ^1H -NMR (DMSO- Cl_3 , 400 MHz) de V.

Síntesis de 4,13-[bis(N-adamantilcarbamoil)propionil]-1,7,10,16-tetraoxa-4,13,-diazaciclooctadecano (VI): Se añadieron 4-dimetilaminopiridina (0,43 g, 3,6 mmol), dicitclohexilcarbodiimida (0,73 g, 3,6 mmol) y 1,4,10,13-tetraoxa-7,16-diazaciclooctadecano (0,31 g 1,2 mmol) a una disolución del ácido 4,13-[bis(N-adamantilcarbamoil)propanoico (0,89 g; 3,5 mmol) en CH₂Cl₂ anhidro (75 ml), que se mantiene en agitación. La mezcla de reacción se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 1 h. El precipitado obtenido fue retirado y la disolución lavada sucesivamente con H₂O (100 ml), HCl (5%) (100 ml) y una disolución acuosa saturada en NaHCO₃ (100 ml). La fase orgánica se secó con Na₂SO₄, se filtró y concentró para purificación mediante una columna cromatográfica de silicagel con cloroformo:metanol (12:1) como eluyente obteniendo 4,13-[bis(N-adamantilcarbamoil)propionil]-1,7,10,16-tetraoxa-4,13,-diazaciclooctadecano (0,6 g; 68 %) como un sólido con P.F. 206-210° C.

La unión del ácido (N-adamantilcarbamoil)propinoico (V) con el éter corona 1,4,10,13-tetraoxa-7,16-diazaciclooctadecano, se realizó de forma similar a la síntesis del K22B5, es decir, utilizando como reactivo de acoplamiento N,N-dicitclohexilcarbodiimida (DCC), que es un reactivo ampliamente utilizado en la química de péptidos⁴ en presencia de dimetilaminopiridina (DMAP).

En este caso, el deseado ionóforo SPS1 se obtiene como sólido amorfo. Tras la purificación del crudo de reacción mediante cromatografía preparativa en columna se logra un rendimiento del 68%. Al igual que en casos anteriores su estructura se establece en base a sus datos espectroscópicos (masas, IR, ¹H-¹³C-RMN) y P.F. 206-210° C.

⁴ V.J. Hruby y J.P. Meyer, Chemical Synthesis of peptides in Biorganic chemistry: Peptides and Proteines (S.M. Hecht) Oxford University Press (1998).

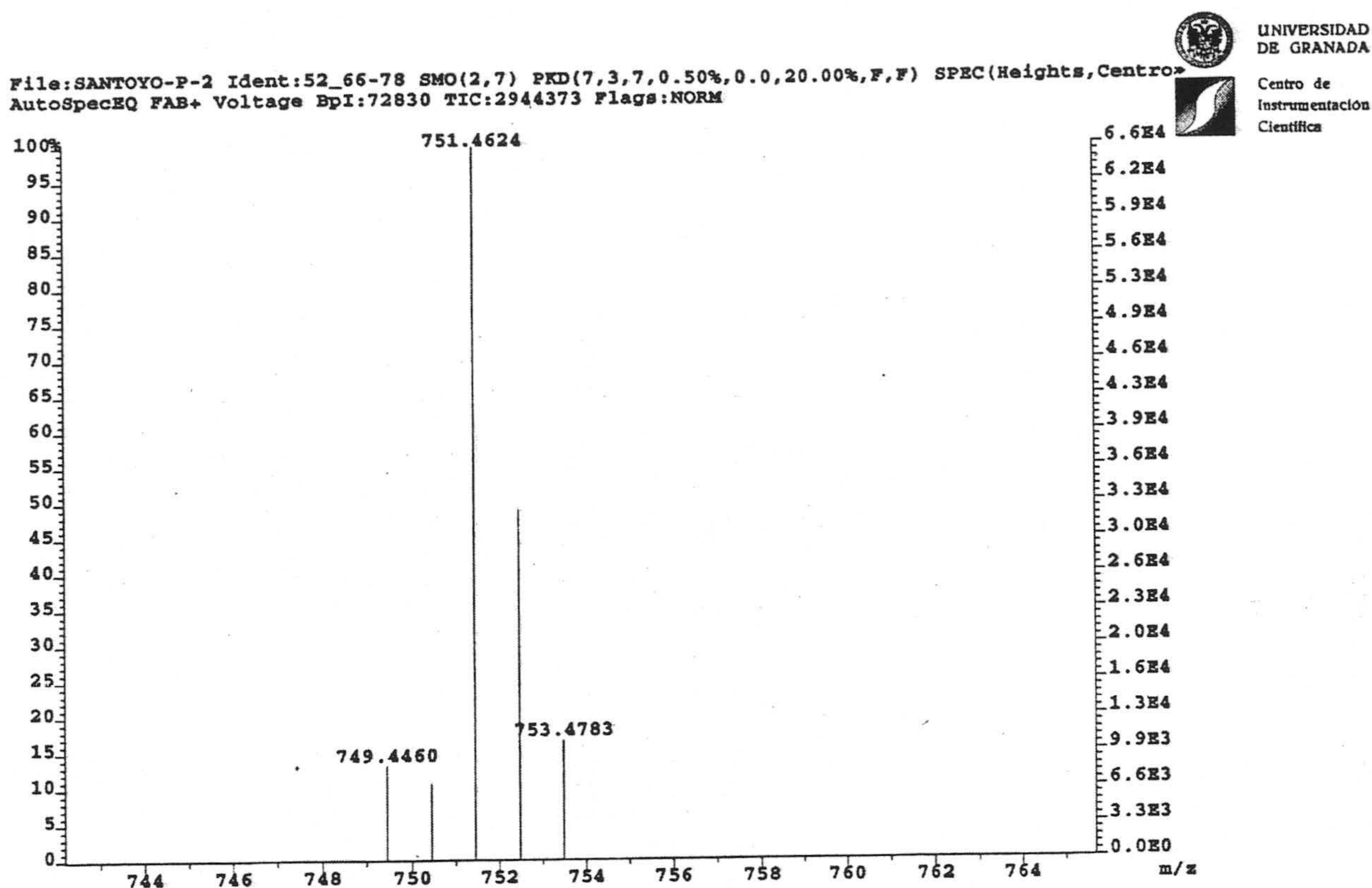


Figura 2.21. HR MS (FAB +) de SPS1 calculado para $C_{40}H_{64}N_4O_8Na$ [M + Na] 751.4621. Encontrado 751,4624.

El espectro de masas (F.A.B.+) es concordante con la fórmula molecular esperada $C_{40}H_{64}N_4O_8Na$ (M+Na)+ e indica que ambos grupos amino del éter corona han reaccionado con el ácido carboxílico (V).

Las bandas características del espectro de IR (Figura 2.22) correspondientes a los grupos funcionales de esta molécula se pueden observar a 3527 cm^{-1} (NH), 1628 cm^{-1} (COOH), 1575 cm^{-1} (CON).

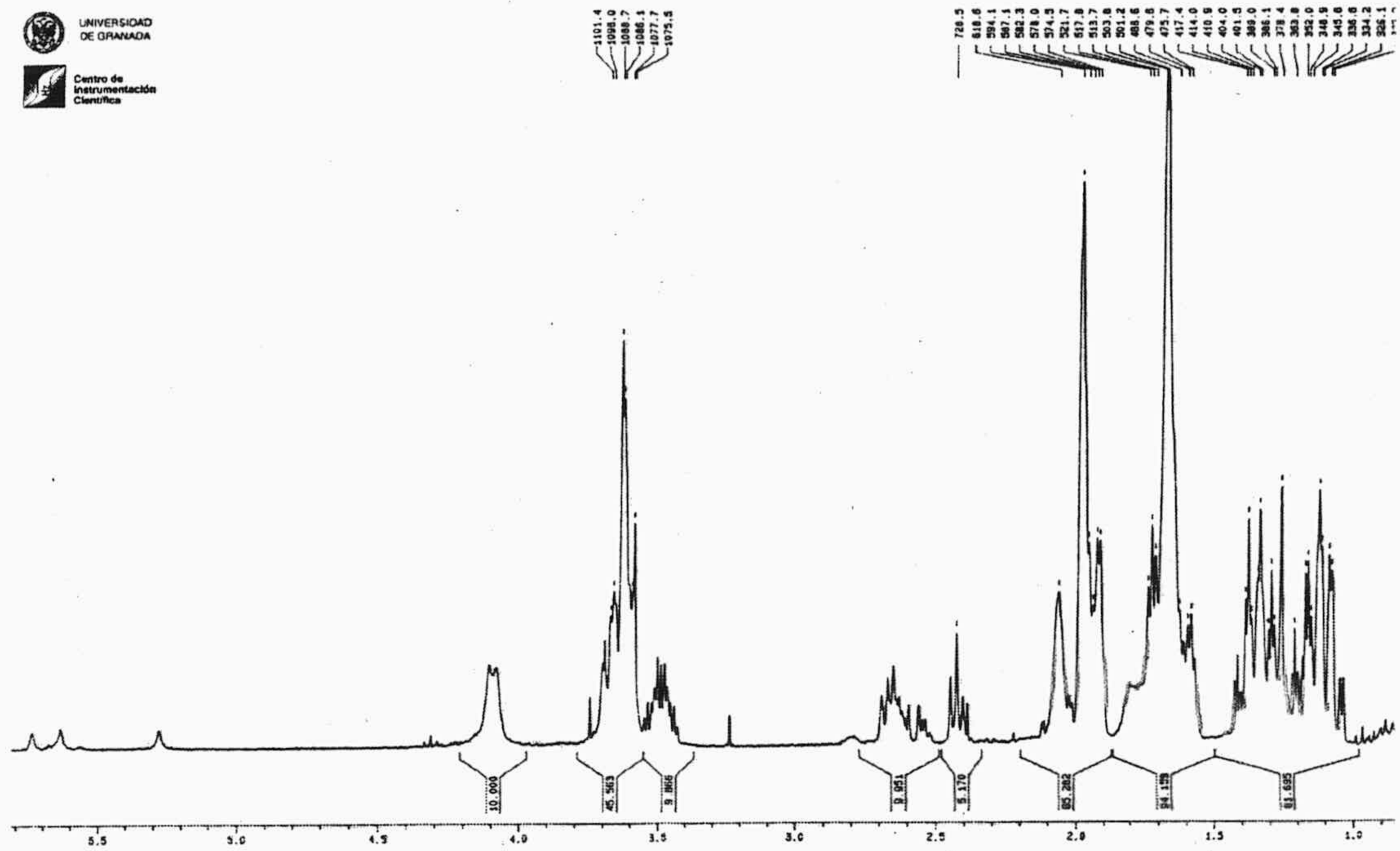


Figura 2.22. Espectro IR (KBr) de SPS1.

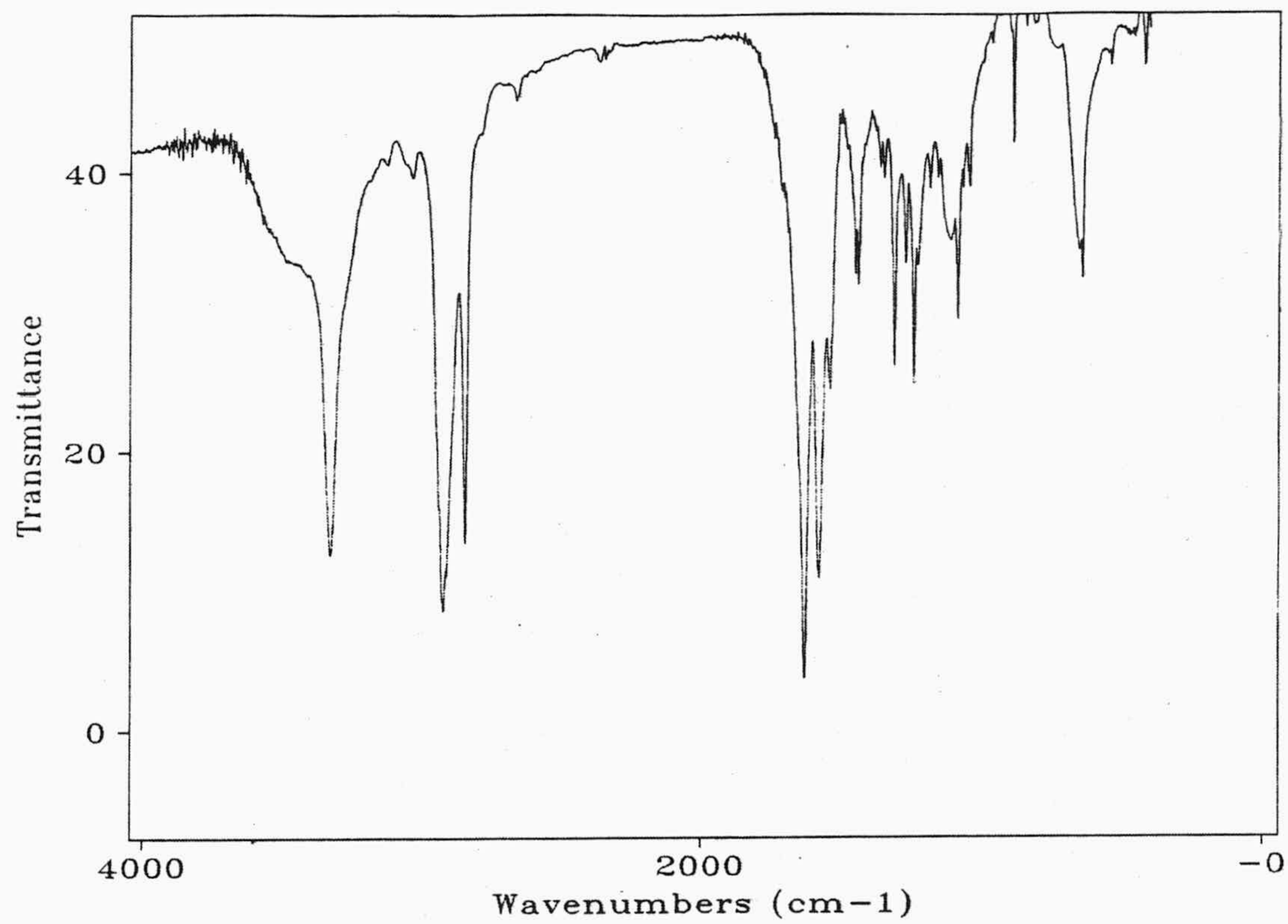


Figura 2.23. Espectro ¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz) de SPS1.

El espectro de ^1H -RMN (Figura 2.23) es concordante con la estructura propuesta. Así los hidrógenos metilénicos oxigenados y nitrogenados aparecen como un multiplete complejo a δ 3,70-3,54 ppm. A δ 2,70 ppm y 2,43 ppm aparecen los multipletes que corresponden a los hidrógenos de los metilenos adyacentes a los grupos carbamiloil. El resto de señales corresponden a los hidrógenos de metilos y metilenos del sistema tricíclico, los cuales resuenan como singuletes a δ 2,1, 2,07, 1,99, 1,94 y 1,70 ppm.

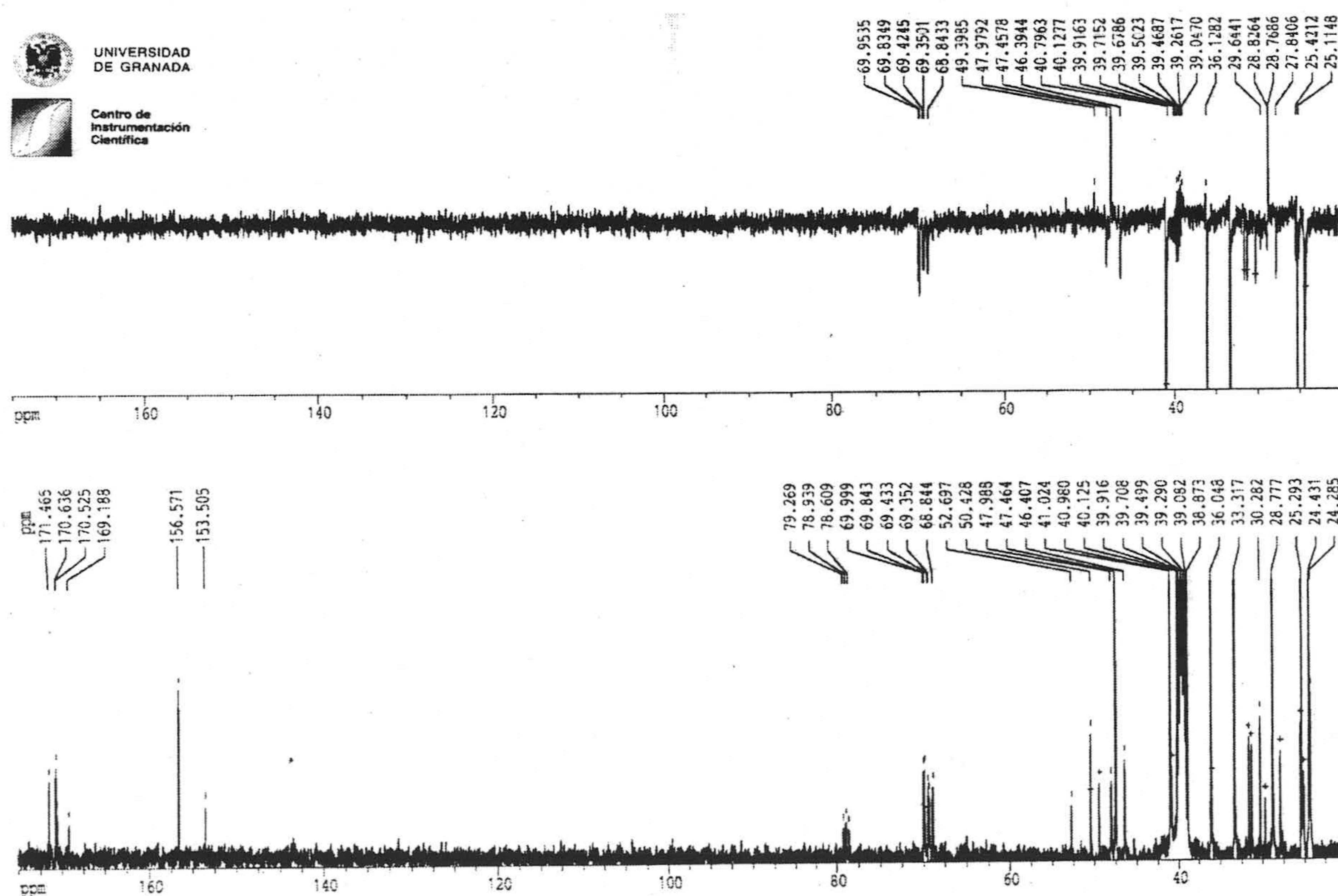


Figura 2.24. Espectro ^{13}C -NMR (CDCl_3 , 100 MHz) de SPS1

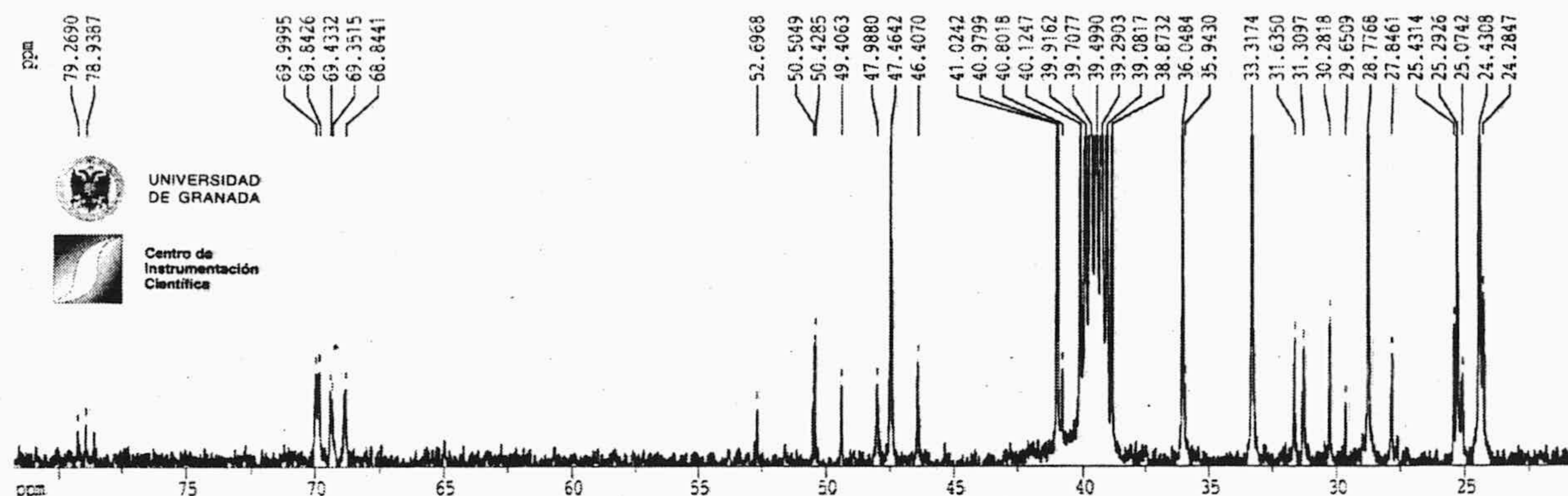


Figura 2.25. Espectro ^{13}C -NMR (CDCl_3 , 100 MHz) de SPS1

El espectro del ^{13}C -RMN (Figuras 2.24 y 2.25) presenta como señales significativas las que aparecen a δ 70,0-68,8 ppm correspondientes a los metilenos unidos a oxígeno (CH_2O), el carbono cuaternario del grupo adamantil unido a nitrógeno, aparece a δ 50,4 ppm, mientras que los metilenos unidos a nitrógeno aparecen como una señal ancha y débil a 47,9 ppm. A δ 41,0, 36,0 y 33,0 ppm aparecen tres señales que corresponden a carbonos metilénicos y que son del anillo de adamantil. Por último, se encuentran a δ 28,77 ppm los CH del grupo adamantil.

En conclusión, el ionóforo 4,13-[bis(N-adamantilcarbamoil)propionil]-1,7,10,16-tetraoxa-4,13,-diazaciclooctadecano (SPS1) fue sintetizado en dos etapas con un rendimiento global de 47,6%.

2. Material de Laboratorio, instrumentación y software.

2.1. Material de laboratorio.

Matraces aforados Afora Clase A, de diferentes capacidades.

Pipetas graduadas y aforadas Afora Clase A, de diferentes capacidades.

Micropipeta de 5 – 50 μ l (Brand)

Micropipeta de 100 – 1000 μ l (Brand)

Pipetas Pasteur provista de tetina de silicona.

Equipo de filtración Millipore provisto de:

Portafiltros analíticos de soporte de vidrio sinterizado.

Filtros Millipore de 47 mm.

Matraz kitasatos para vacío de 500 ml.

Goterros, vasos de precipitado, tubos de ensayo, matraces Erlenmeyer, matraces kitasatos, pesa sustancias, así como material básico de laboratorio habitual en cualquier laboratorio de Química Analítica

Columna de vidrio para cromatografía preparativa.

Placas de sílice para cromatografía en capa fina.

Viales de vidrio Supelco de 2 ml de capacidad.

Botellas de polietileno de diferentes capacidades.

Cubetas de cuarzo para ultravioleta y de vidrio para visible de 10 mm de paso de luz.

Pesas patrón de: 1, 10 y 200 mg Mettler Toledo, calibración ENAC clase F1.

2.2. Instrumentación y software

2.2.1. Instrumentación

Balanzas analíticas Mettler PJ360 Delta Range y Mettler AE 163, con rango de pesada 0-30 y 0-160 g y precisión 0,01 y 0,1 mg.

Espectrofotómetro HP 8453 ChemStation.

Espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 2

Espectrofotómetro de Absorción Atómica Perkin Elmer A Analyst 100

Espectrofotómetro de Absorción Atómica Perkin-Elmer LB1100

pH-metro digital Crison, modelo MicropH 2000, provisto de electrodo combinado de vidrio y cloruro de plata

pH-metro digital Crison, modelo MicropH 2002, provisto de electrodo combinado Orion 8102 Ross.

Estufa de secado Heraeus 50-300 °C.

Baño de ultrasonidos Selecta de 1 litro de capacidad.

Rotavapor Heidolph typ. VVI, 40-220 rpm.

Agitador de tubos Heidolph Reax 2000.

Multiagitador de nueve elementos SBS. A-13 serie C

Multiagitador de nueve elementos SBS A-100009.

Agitador giratorio P. Selecta de 16 viales.

Sistema centrífugo de preparación de membranas, de diseño propio.

Placa agitadora-calefactora Heidolph modelo 2002.

Centrífuga Selecta modelo Macrotronic.

Centrífuga UKA Technic Model 2610.

Bomba de agua para vacío Büchi B-169 Vacuum-System.

2.2.2. Ordenadores

Ordenador Personal Pentium 200 MHz. Provisto de HD de 4.3Gb, CD-ROM 40x, 64 Mb de memoria RAM y MS.Windows 95 como S.O. Para establecer la comunicación con el espectrofotómetro UV HP ChemStation

Ordenador Personal AMD K6(tm) 3D 500 MHz. Provisto de HD de 10 Gb, CD-ROM 40x, 64 Mb de memoria RAM y Ms.Windows 2000 como S.O.

Ordenador Personal 486 100 MHz. Provisto de HD de 2 Gb, CD-ROM 24x, 32 Mb de memoria RAM y Ms Windows 95 como S.O.

Ordenador Personal 486 33 MHz. Provisto de HD de 400 MHz, 4 Mb de memoria RAM y Ms DOS 6.2 como S.O. Para establecer la comunicación con el espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 2 través del software "Pecss".

2.2.3. Impresoras

Hewlett Packard 520.

Hewlett Packard 690C

Hewlett Packard Laser Jet III

Epson Stylus Color 400

Epson LQ 200

Olivetti Peripherals DM292

IBM 4019 Laser

2.2.4. Software

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

UV HP ChemStation Software (modo de cinética incluido)

Pecss Perkin Elmer Software

Representaciones graficas se han realizado con:

Microsoft Excel 2000, Copyright 1983-2000, Microsoft Corporation

GraphMatica para Win32 v1.60d

Programas de cálculo utilizados son:

GraphMatica para Win32 v1.60d

Statgraphics Plus Versión 4.1, STSC. Inc., de Statistical Graphics Corp., USA, 1999

Quimio⁵ (1994).

Microsoft Excel 2000, Copyright 1983-2000, Microsoft Corporation

Editores de texto utilizados:

Microsoft Word 2000, Copyright 1983-2000, Microsoft Corporation.

⁵ Cela, R.; "Avances en Quimiometría Práctica", Servicio de Publicaciones e Intercambio Científico de la Universidad de Santiago de Compostela. Santiago de Compostela, 1994.

2.3. Calibrado de instrumentación y equipos

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

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

3. Metodología de trabajo.

Se expone a continuación la metodología de trabajo que se ha empleado durante el desarrollo de esta Memoria, describiéndose como se preparan los sensores de un solo uso, como se utilizan y realizan las medidas y se tratan los datos generados.

3.1. Características físicas

Las características físicas de los sensores de un solo uso desarrollados en esta Memoria de Doctorado son comunes para los distintos modelos propuestos, por ello en este apartado se van describir los sensores así como la metodología utilizada para el desarrollo de los mismos y su posterior uso. Del mismo modo, se indicarán cuáles son las principales variables a la hora de su construcción que influyen notablemente en su comportamiento

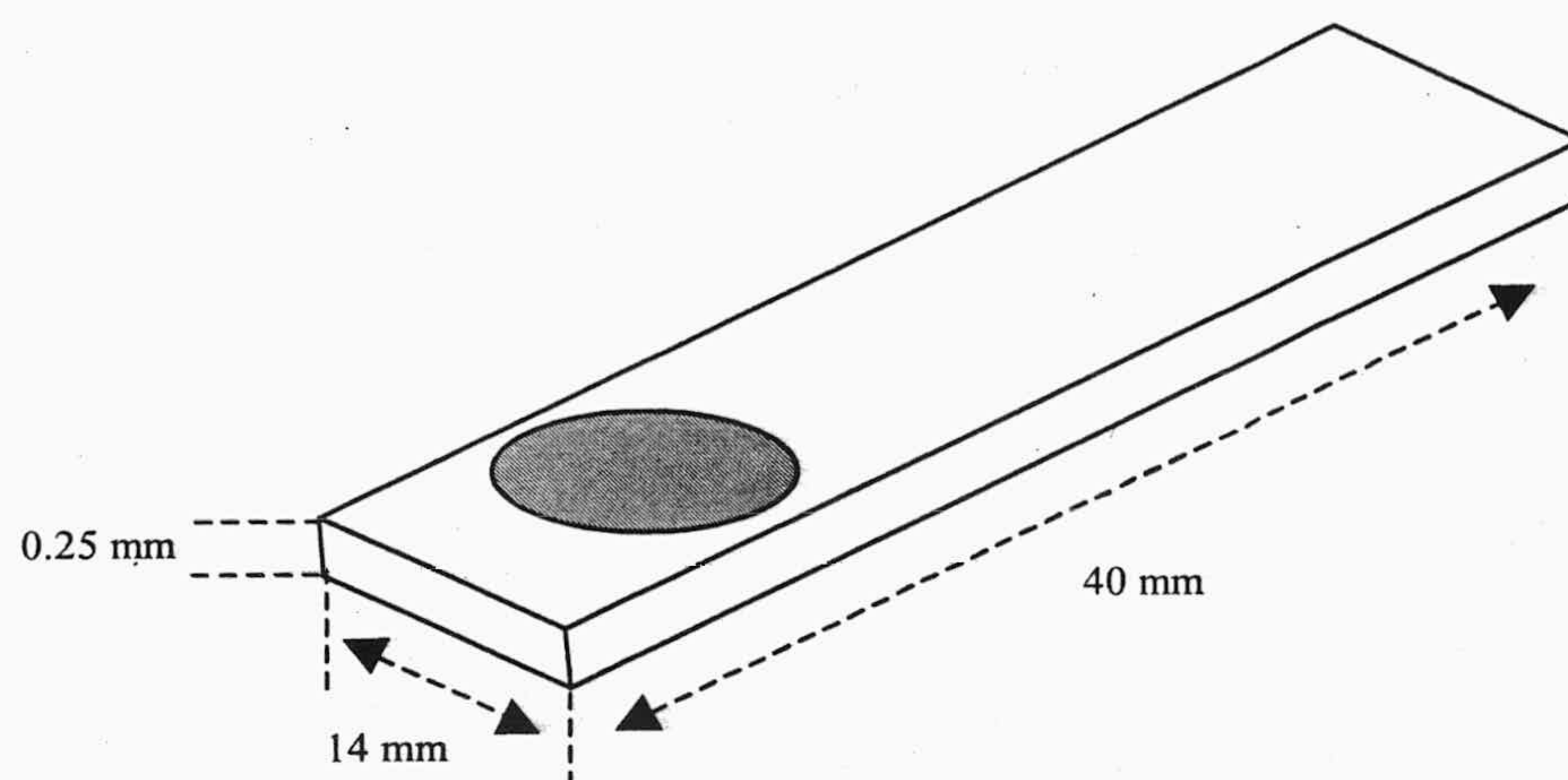


Figura 2.26. Tira reactiva

Los sensores de un solo uso propuestos para la determinación de calcio y/o magnesio en disoluciones acuosas, están constituidos por una lámina transparente de poliéster cuyas dimensiones son 40 mm de largo por 14 mm de ancho y 0,5 mm de espesor.

En una de las caras de la lámina (véase la Figura 2.26) se encuentra la zona activa del sensor, que es la encargada de reconocer al analito y originar una respuesta analítica reproducible susceptible de ser medida. En los sensores construidos y estudiados en esta Memoria de Doctorado, la zona activa es transparente y de color rojo más o menos violáceo, dependiendo del sensor, y la señal analítica empleada ha sido la absorbancia medida por transmisión a una determinada longitud de onda.

3.1.1. Preparación de los sensores.

De las diversas metodologías descritas para la preparación de sensores en general y de tiras reactivas en particular, se ha elegido por la sencillez de preparación y los buenos resultados que proporciona, la de disolución de los componentes reactivos junto con los que originan membrana, en un disolvente que por evaporación controlada, origina una membrana con las características deseadas.

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

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

Lo primero que se hizo, fue construir un sistema rotatorio de velocidad de giro variable⁶. Este dispositivo cuyo esquema podemos ver en la Figura 2.27, consta de un motor que hace girar un plato con una muesca superficial que tiene las mismas dimensiones y que es donde se encaja la lámina de poliéster. Todo este mecanismo va cerrado con una tapa superior metálica que presenta un orificio en el que encaja una pieza de teflón expresamente realizada de forma que una vez cerrada dicha tapa queda a una altura y posición adecuadas, para que con ayuda de una micropipeta se puedan depositar un cierto volumen del cóctel en la lámina de poliéster que se encuentra girando a una velocidad dada. De esta forma, el volumen de cóctel depositado se expandirá de forma homogénea sobre el poliéster debido a la acción de la fuerza centrífuga. A continuación, se deja reposar la lámina en un recipiente cerrado conteniendo el mismo disolvente. Una vez evaporado el disolvente del cóctel, nos resulta una zona circular sobre la lámina donde se encuentran los componentes necesarios para reconocer al analito y producir la señal analítica, y es a esa zona lo que denominamos la zona activa del sensor o zona sensora.

⁶ Seiler, K. y Simon, W., *Anal. Chim. Acta.*, 73, 266 (1992).

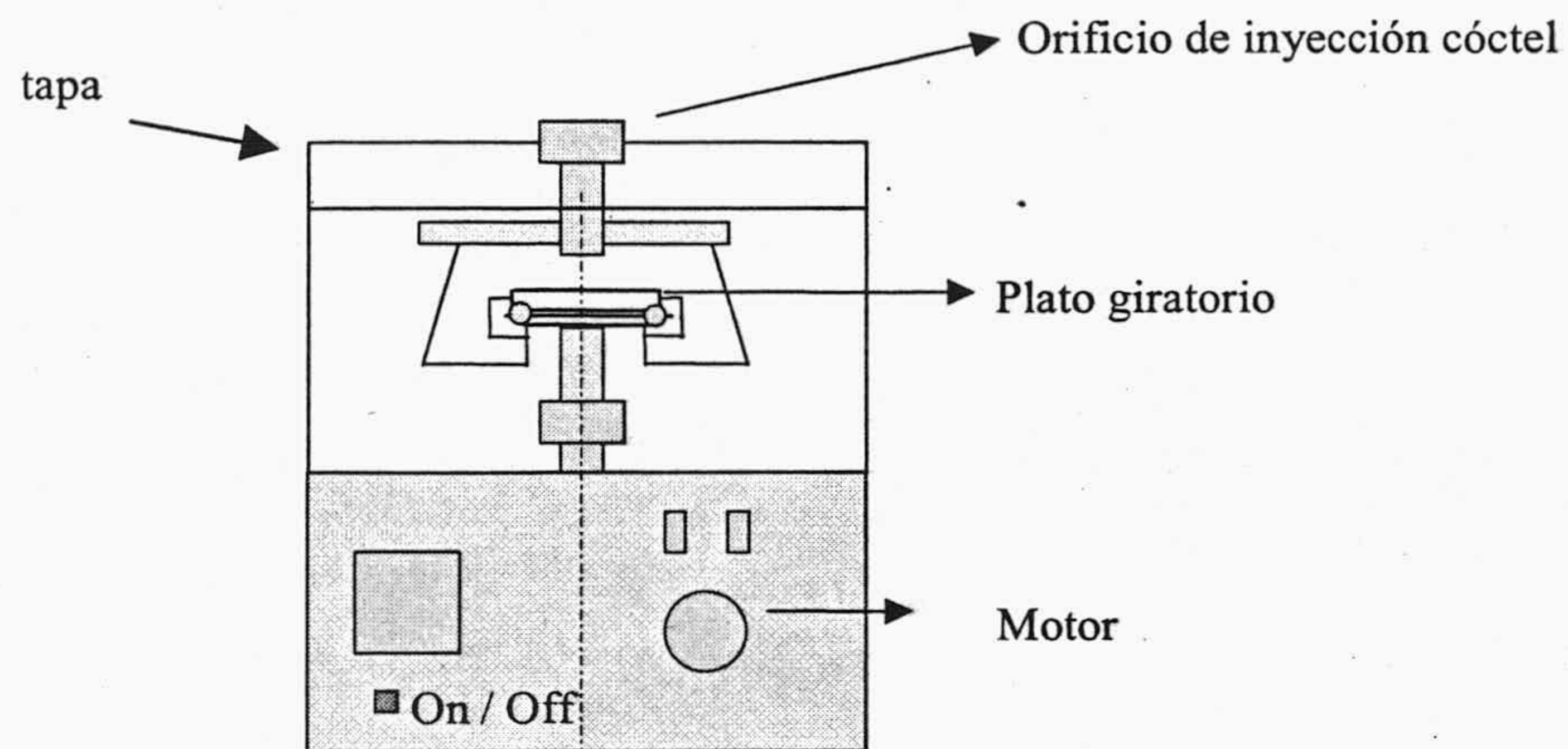


Figura 2.27. Sistema centrífugo de preparación de membranas

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

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

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

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

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

3.1.2. Metodología de uso.

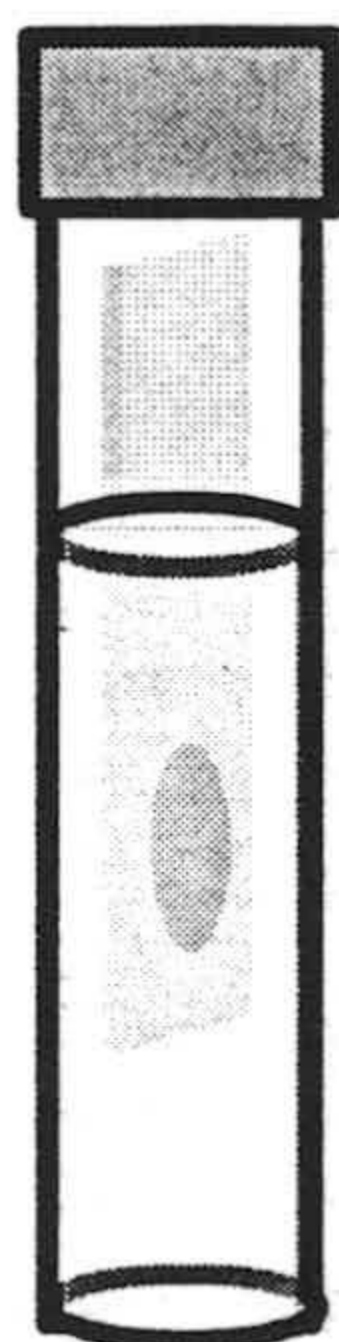


Figura 2.28. Tubo de polietileno usado para el análisis

En este apartado se describe la metodología de trabajo usada para llevar a cabo los análisis mediante las tiras reactivas propuestas en la presente Memoria de Doctorado. Para ello, se utilizan unos pequeños tubos de polietileno (ver Figura 2.28) de 10 ml de volumen, donde se depositan las muestras a analizar y los patrones de referencia. En estos recipientes es donde se pone en contacto la disolución problema en presencia de una disolución reguladora del pH y el sensor durante un tiempo que oscila entre 5 y 15 min. Transcurrido ese tiempo, se habrán producido las reacciones químicas pertinentes, que se traducen en un cambio en el color de la zona sensora y, por consiguiente, en la longitud de onda de absorción de radiación.

Una vez concluida la etapa de equilibración, se extrae la tira del tubo y se eliminan por agitación los restos de disolución que mojan la zona activa; tras lo cual se sitúa con ayuda de un portamuestras adecuado en el compartimento de medida de un espectrofotómetro, donde se mide la señal analítica que nos permite cuantificar el analito presente. Para realizar la medida de absorción de radiación se han usado portamuestras de diseño propio que permiten situar la tira reactiva y que se adaptan perfectamente al compartimento de cubetas de cada uno de los espectrofotómetros empleados en el desarrollo de esta Tesis Doctoral. Dichos portamuestras están fabricados en hierro y pintados de negro (Figura 2.29). Cuando la tira reactiva es introducida en uno de ellos, el orificio que presentan coincide con la zona activa del sensor, de forma que el haz de radiación la atraviesa por la zona central. En todos los casos el diámetro del orificio del soporte es ligeramente inferior al de la zona activa de la tira reactiva, aumentándose así la reproducibilidad de las medidas. De esta manera se

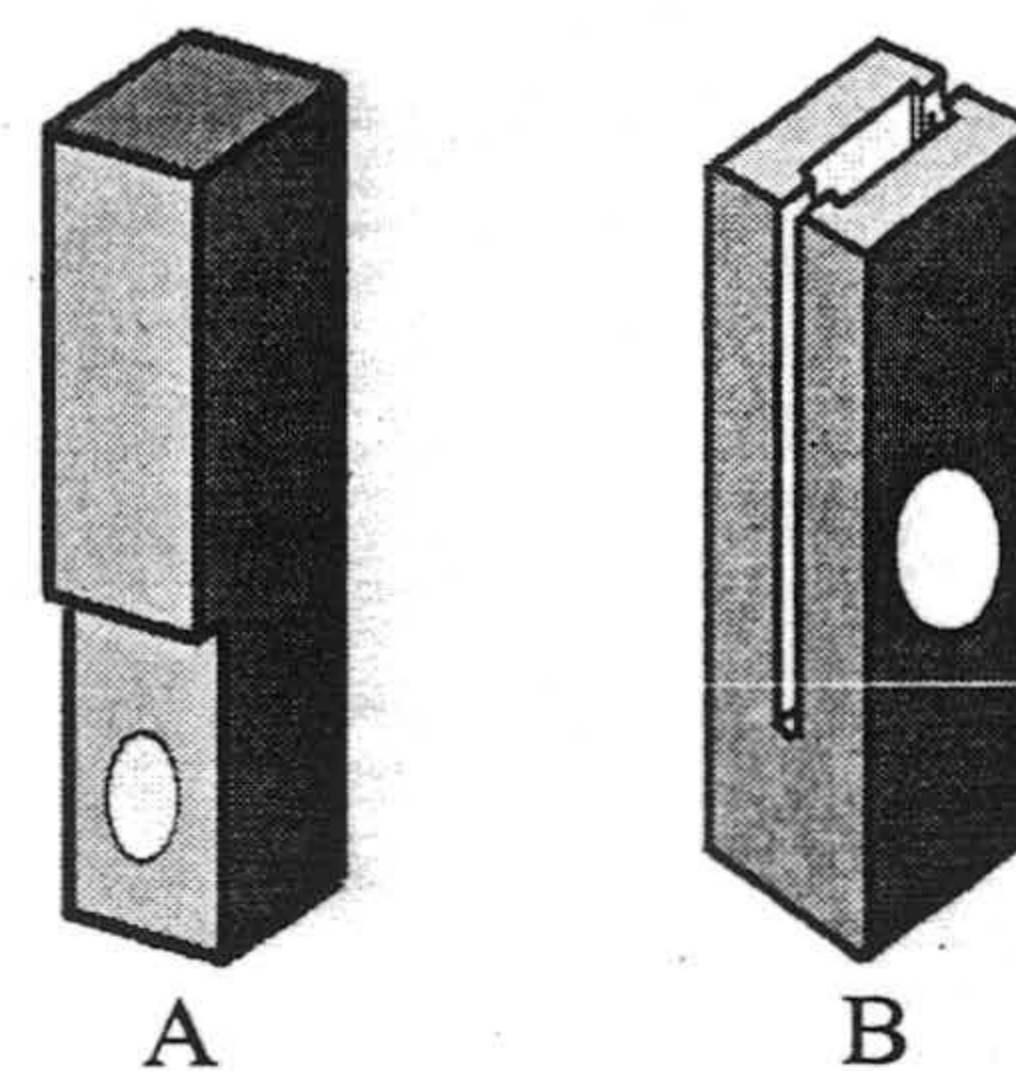


Figura 2.29. Diferentes tipos de soportes adaptadores utilizados en diferentes espectrofotómetros (A) HP8453. (B) Perkin Elmer Lambda 2.

evita que la radiación atraviese los bordes del sensor, pues es la zona de la membrana que está sujeta a mayores variaciones en función de cómo haya tenido lugar el secado de la zona activa.

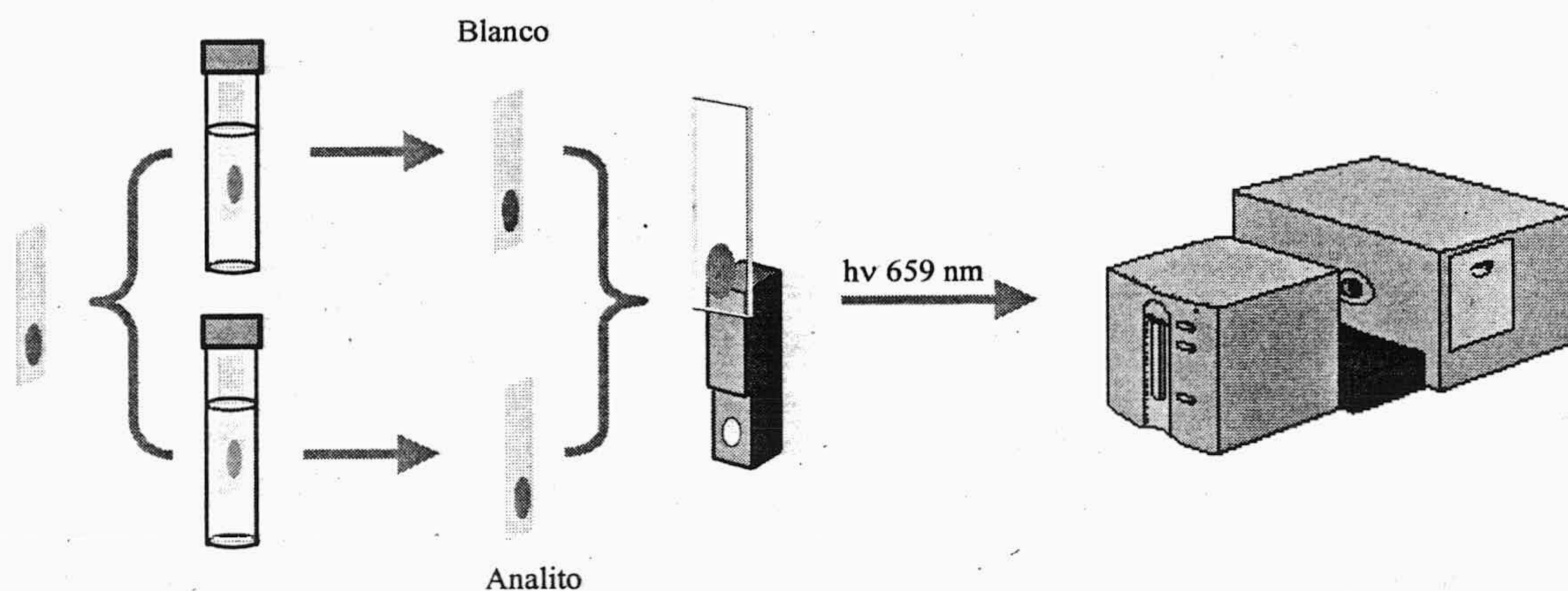


Figura 2.30. Esquema de trabajo para la medida con un sensor

En la Figura 2.30 podemos ver de forma esquemática la secuencia de pasos seguida para el análisis de una muestra mediante el uso de membranas de gota plana.

4. Métodos de Optimización.

En este apartado se exponen las herramientas utilizadas para optimizar la respuesta de los diferentes tipos de sensores de un solo uso estudiados. Para establecer la composición más adecuada de la membrana sensora se han seguido dos estrategias complementarias. En primer lugar, ajustar la composición de la membrana, de forma que se origine el mejor valor de la función respuesta tras alcanzar el equilibrio en la reacción de la tira reactiva con el ión alcalinotérreo en estudio. Esta función respuesta será en unos casos, los de los sensores basados en reactivos cromogénicos convencionales la absorbancia que muestre la tira reactiva; mientras que en otros, los de sensores basados en un segundo componente, podrán ser dos: la función $1-\alpha_{ef}$ relacionada con el valor de absorbancia de la tira reactiva o bien la

selectividad de la membrana frente a iones potencialmente interferentes y expresada en forma de coeficiente de selectividad.

Una segunda estrategia usada para lograr la optimización de la composición de la tira reactiva ha sido el estudiar como influye la modificación de la composición de la membrana sobre la cinética de la reacción de la misma con el ion alcalinotérreo en estudio, siendo en este caso el tiempo de respuesta, la variable usada para optimizar.

Para establecer las mejores condiciones de reacción del ion alcalinotérreo con la membrana reactiva, se ha seguido la variación de la función respuesta. Como en el caso anterior, la función respuesta será para los sensores basados en reactivos cromogénicos convencionales, la absorbancia de la tira reactiva; mientras que para los sensores basados en segundo componente, será la función $1-\alpha_{ef}$, la selectividad expresada como coeficiente de selectividad o el tiempo de respuesta.

Para realizar esta optimización de condiciones hemos usado tanto sistemas monofactor como diseño de experimentos. El diseño que a continuación comentaremos, se ha usado para el caso de variables interrelacionadas en sensores que usan reactivos cromogénicos convencionales, mientras que en caso de sensores basados en ionóforos solo se han usado sistemas de optimización monofactor. La razón estriba en que la variable respuesta constante de selectividad, usada en este último caso, exige un considerable trabajo de experimentación, lo que dificulta el uso de diseños experimentales.

4.1. Diseños de experimentos

La optimización de un procedimiento analítico debe de ser llevada a cabo mediante el estudio de los factores influyentes. En algunos casos esos factores son limitados y conocidos por el analista, sin embargo en otros casos, el efecto de dichos factores no es conocido y además en multitud de problemas analíticos existen además una serie de factores desconocidos.

Como el estudio de todos los factores potenciales de un problema analítico es normalmente inviable, surgió el diseño de experimentos como herramienta estadística para

rentabilizar al máximo el trabajo de laboratorio y extraer la máxima información posible, manteniendo una solución de compromiso entre número de experimentos a realizar y información útil extraída de ellos.

En la presente Memoria de Doctorado hemos utilizado un determinado tipo de diseño de experimentos denominado diseño mezcla⁷.

Este tipo de diseño surge por la necesidad habitual de optimizar una mezcla de componentes. Un típico ejemplo de ello es la cromatografía líquida de alta resolución en la que es de vital importancia optimizar la fase móvil utilizada para lograr la separación de los componentes presentes. En nuestro caso, se ha empleado dicho diseño para optimizar la mezcla de tres reactivos fundamentales presentes en la membrana en sensores que usan reactivos cromogénicos convencionales, tal y como queda reflejado en el capítulo 3.

Si hacemos todas las combinaciones posibles tomando como niveles de cada componente 0 y 100%, obtendremos un espacio tridimensional como el de la Figura 2.30.

Tabla 2.2. Combinaciones posibles para tres factores y dos niveles.

Reactivo 1 %	Reactivo 2 %	Reactivo 3 %
0	0	0
0	0	100
0	100	0
0	100	100
100	0	0
100	0	100
100	100	0
100	100	100

⁷ Massart, D., Vandeginste, B., Buydens, L., Dejong, S., Lewi, P. y Smyers-Verbeke, J.,. Data Handling in Science and Technology, Volume 201. Handbook of Chemometrics and Qualimetrics, Parte A, Capítulo 25, p. 739, 1990.

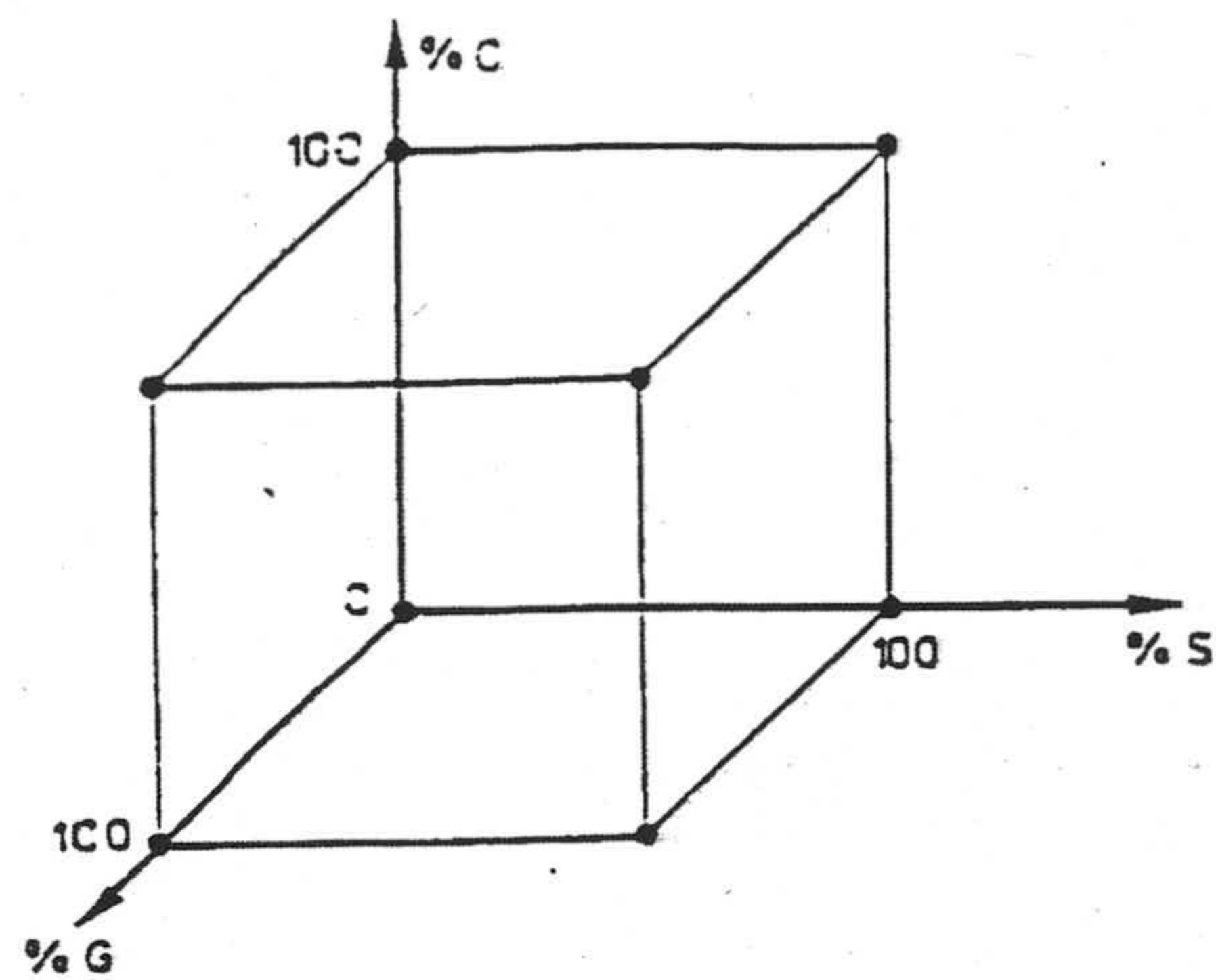


Figura 2.30. Dominio tridimensional de las combinaciones teóricas de tres componentes.

Teniendo en cuenta que solo serán posibles aquellas combinaciones donde la suma de los tres componentes sea igual al 100%, el dominio se restringe al espacio rayado en la Figura 2.31.

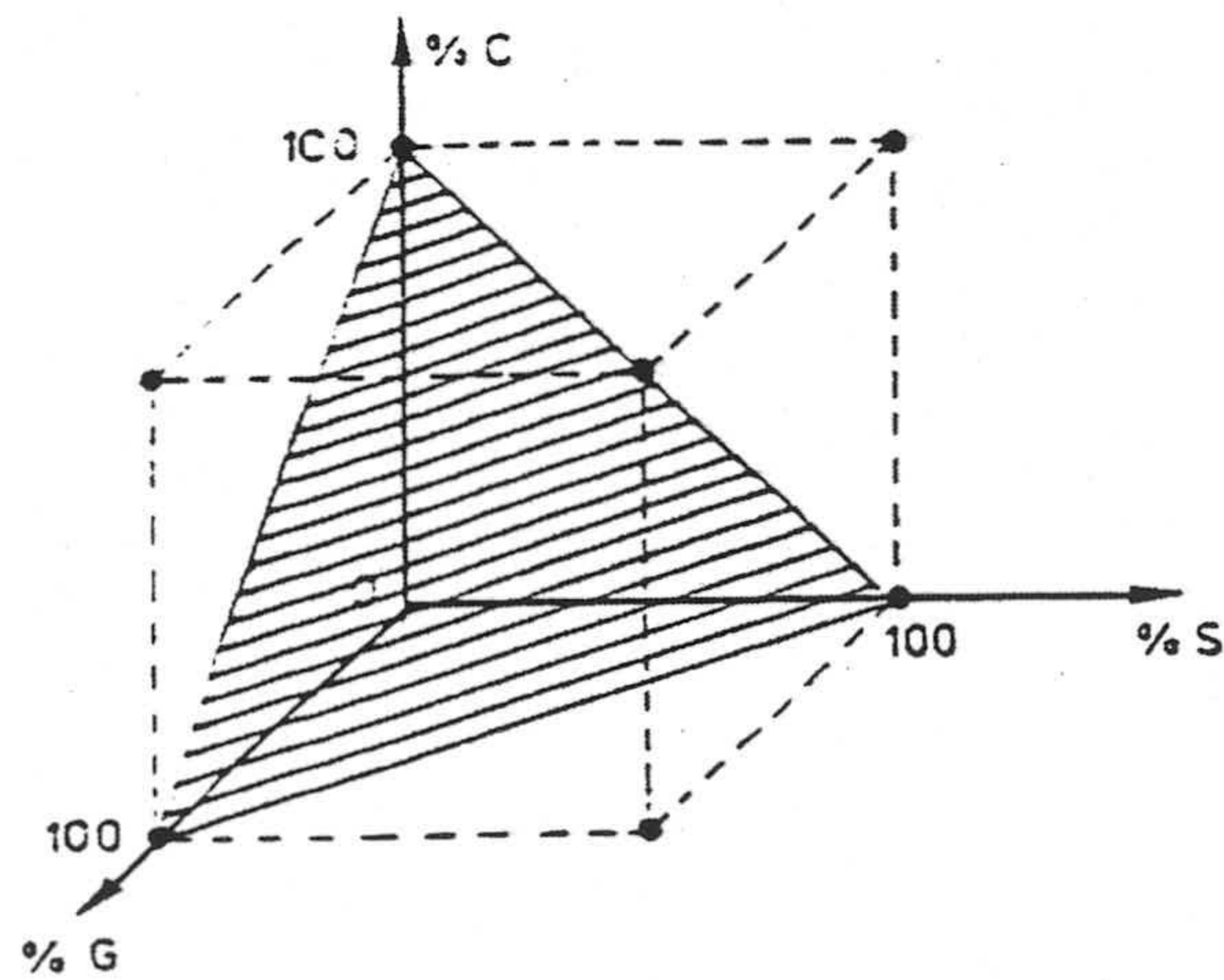


Figura 2.31. Espacio tridimensional delimitado por los valores que pueden tomar los porcentajes de cada uno de los componentes de la mezcla.

Este espacio rayado es un triángulo equilátero que representa un diagrama ternario en el que cada uno de los vértices representa el 100% de uno de los componentes, y los lados son mezclas binarias en los que el valor del componente representado en el vértice opuesto es nulo.

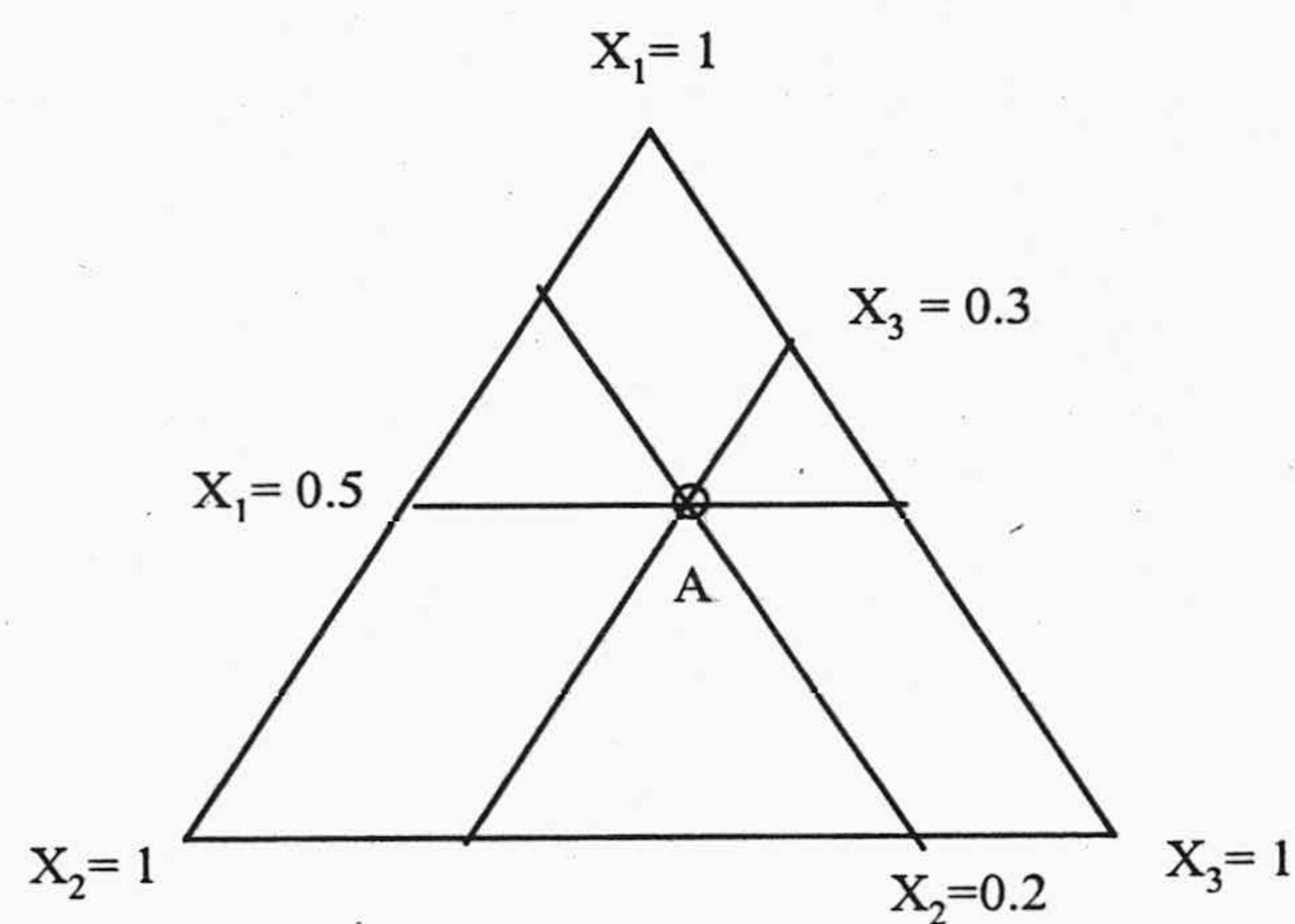


Figura 2.32. Ejemplo de representación de una mezcla A ($X_1: 0,5$, $X_2: 0,2$, $X_3: 0,3$)

En la Figura 2.32 podemos ver un ejemplo en el que se representa una mezcla en un diagrama ternario, en el que como vemos la suma de los tres componentes siempre debe ser el 100%.

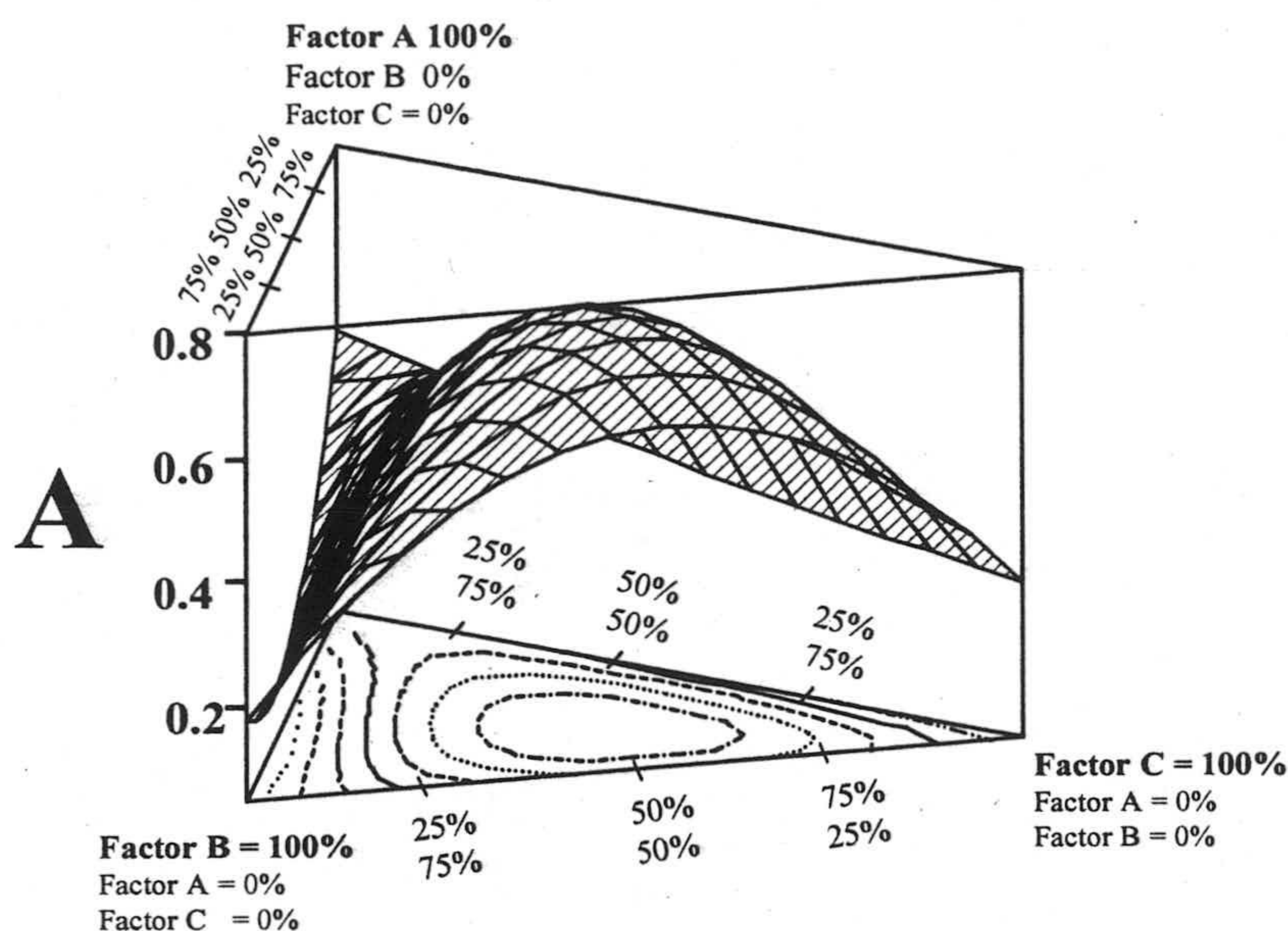


Figura 2.33. Representación tridimensional de la superficie repuesta obtenida.

El objetivo de todo diseño experimental es llegar a la mejor opción con el menor número de experimentos posibles, para ello debemos elegir una señal respuesta a optimizar, en el caso que nos ocupa en la presente Memoria de Doctorado se trata de la señal analítica (absorbancia a una longitud de onda determinada). Con los datos de absorbancia en los puntos que el diseño nos indique se interpolará matemáticamente una función repuesta tridimensional que será representada sobre un digrama ternario tal y como muestra la figura 2.33. Sobre dicha función respuesta se buscará un máximo, cuyas coordenadas corresponden a los valores óptimos de los factores que se quieren optimizar.

4.2. Cinéticas de reacción

El estudio del comportamiento del sensor en continuo, y el seguimiento de las reacciones que se producen en función del tiempo, se ha realizado como se indica a continuación.

Para realizar estas medidas se fijó la lámina sensora en la pared interior de una cubeta de cuarzo de 1 cm de paso de luz, con la zona activa del sensor orientada hacia el interior de la cubeta, de forma que entre en contacto con la disolución problema. Dicha disolución problema es inyectada con ayuda de una jeringa mientras esta activado el módulo de medida en continuo del espectrofotómetro. Con este propósito, ha sido utilizado el módulo de cinética del software UV HP ChemStation que nos permite registrar espectros en intervalos de tiempo de 1 seg. como los que se muestran en la Figura 2.34, permitiéndonos modificar a voluntad el tiempo transcurrido entre la medida de un espectro y el siguiente.

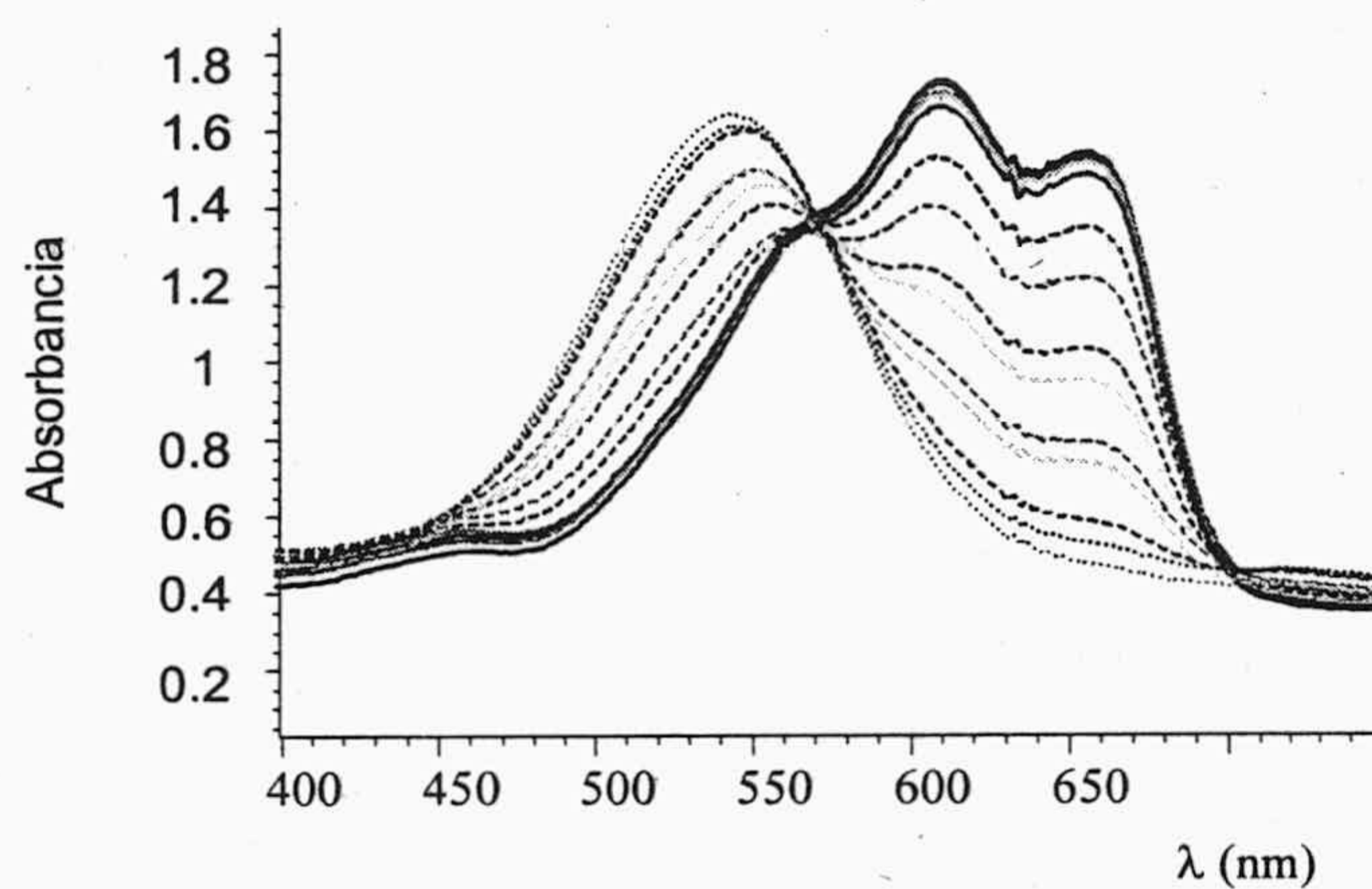


Figura 2.34. Espectros obtenidos en un intervalo de tiempo de 500 seg.

Una vez registrados los espectros necesarios, se dispone de la información que nos permite obtener la variación temporal de señal, así absorbancia, a una longitud de onda adecuada, tal y como se muestra en la Figura 2.35.

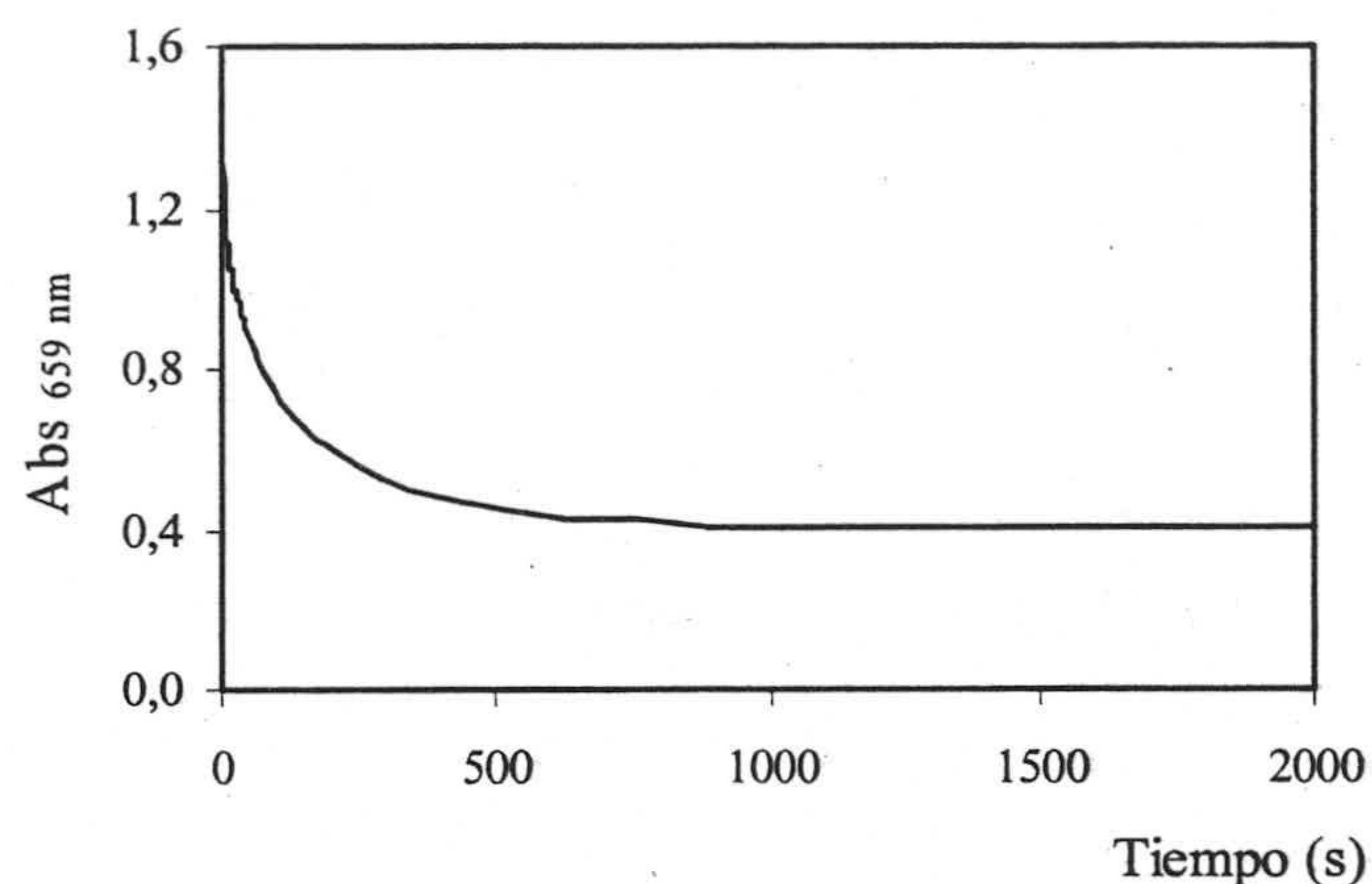


Figura 2.35. Cinética de reacción

4.3. Rechazo de valores anómalos.

Una vez obtenidos el conjunto de datos experimentales y antes de procesarlos para extraer de ellos la información útil, es necesario detectar, identificar y rechazar posibles valores anómalos. Para el estudio y rechazo de valores anómalos, se ha utilizado el test estadístico de la Q de Dixon⁸. La ejecución de dicho test conlleva los siguientes pasos: 1) Ordenar los datos a estudiar según su valor en orden ascendente para seleccionar el valor discordante y su vecino más cercano; 2) Calcular la diferencias entre el valor del presunto anómalo y su vecino más cercano y la existente entre el mayor y menor valor. A continuación, se calcula el parámetro estadístico Q_{cal} como el cociente entre ambas diferencias. La comparación del estadístico calculado (Q_{cal}) con el valor tabulado (Q_{tab}) para un nivel de significación determinado -a lo largo de esta Memoria se ha utilizado el 5% salvo que se indique lo contrario- y para $(n-1)$ grados de libertad, siendo n el número total de valores, incluido el presunto anómalo. Se aceptará la hipótesis nula (H_0) cuando: $Q_{cal} < Q_{tab}$, lo que supone que el valor no es anómalo; por el contrario, se aceptará la hipótesis alternativa (H_1) cuando $Q_{cal} \geq Q_{tab}$, lo que implica que el valor es anómalo.

5. Modelos de sensores desechables

Como hemos visto en la Introducción, existen diferentes esquemas de sensado para el reconocimiento óptico de analitos mediante tiras reactivas. En esta Memoria de Doctorado se han usado dos: el basado en complejación convencional y el basado en el empleo de ionóforos. Aunque entre ellos existen puntos en común como se han visto antes, son absolutamente diferentes en su concepción y en el tratamiento de datos requerido.

5.1. Basados en reactivos cromogénicos convencionales.

En este tipo de tiras reactivas, el analito reacciona con una molécula, que mediante una reorganización electrónica consigue estabilizarse quedando unida al analito, produciéndose, como consecuencia de ello, un cambio de color, esto es, una variación en la absorbancia a una determinada longitud de onda, entre la molécula libre y la molécula unida al analito. La retención del analito en este tipo de sensores es irreversible, debido al elevado valor de su constante de complejación y el tiempo necesario para alcanzar el equilibrio oscila entre 5 y 15 minutos. Este tipo de sensores se pueden considerar, en general, de preconcentración, pues debido al alto valor de esa constante de equilibrio, se podrán utilizar para la determinación de muy bajas concentraciones, aunque a expensas de que tiempo de contacto aumente de forma considerable.

La medida de absorbancia se realiza mediante un espectrofotómetro que mide la absorbancia en la zona sensora a una determinada longitud de onda.

5.1.1. Establecimiento del modelo.

Los ensayos rápidos del tipo aquí desarrollado son métodos de análisis instrumental y, como tales, son relativos, por lo que, para conocer la cantidad de analito presente en la muestra, es necesario realizar la comparación de la señal analítica obtenida por la muestra,

⁸ Dean, R.B. y Dixon, W.J., Anal Chem., 23, 636 (1951).

con las obtenidas por un conjunto de patrones de concentración conocida. Proceso que se conoce como calibración.

La calibración, es, por tanto, una etapa fundamental en el proceso analítico, ya que es una de las fuentes de error sistemático más importantes, de forma que solo se pueden obtener buena exactitud en los resultados si se aplican buenos métodos de calibración. El proceso de calibración consta de dos etapas: 1) Etapa de calibración, en la que se establece un modelo que relaciona la variable dependiente o señal analítica con la variable independiente o concentración. 2) Etapa de predicción, en la que se obtienen las variables independientes de una o más muestras problema, a partir del valor obtenido para la variable dependiente.

En este tipo de sensores se ha utilizado el modelo de regresión univariante, que es uno de los más utilizados para el proceso de calibración, y que se caracteriza por ajustarse a un modelo matemático lineal:

$$Y = a + b X \quad (2.1)$$

Existen, por tanto, una variable independiente X (concentración) que se relaciona con una variable dependiente Y (señal analítica) y unos parámetros a y b que deben estimarse a partir de datos experimentales.

Para la correcta aplicación de un método de regresión univariante, han de cumplirse ciertas hipótesis básicas: existencia de aleatoriedad de las muestras, normalidad, linealidad y homogeneidad de varianzas (condición de homocedasticidad).

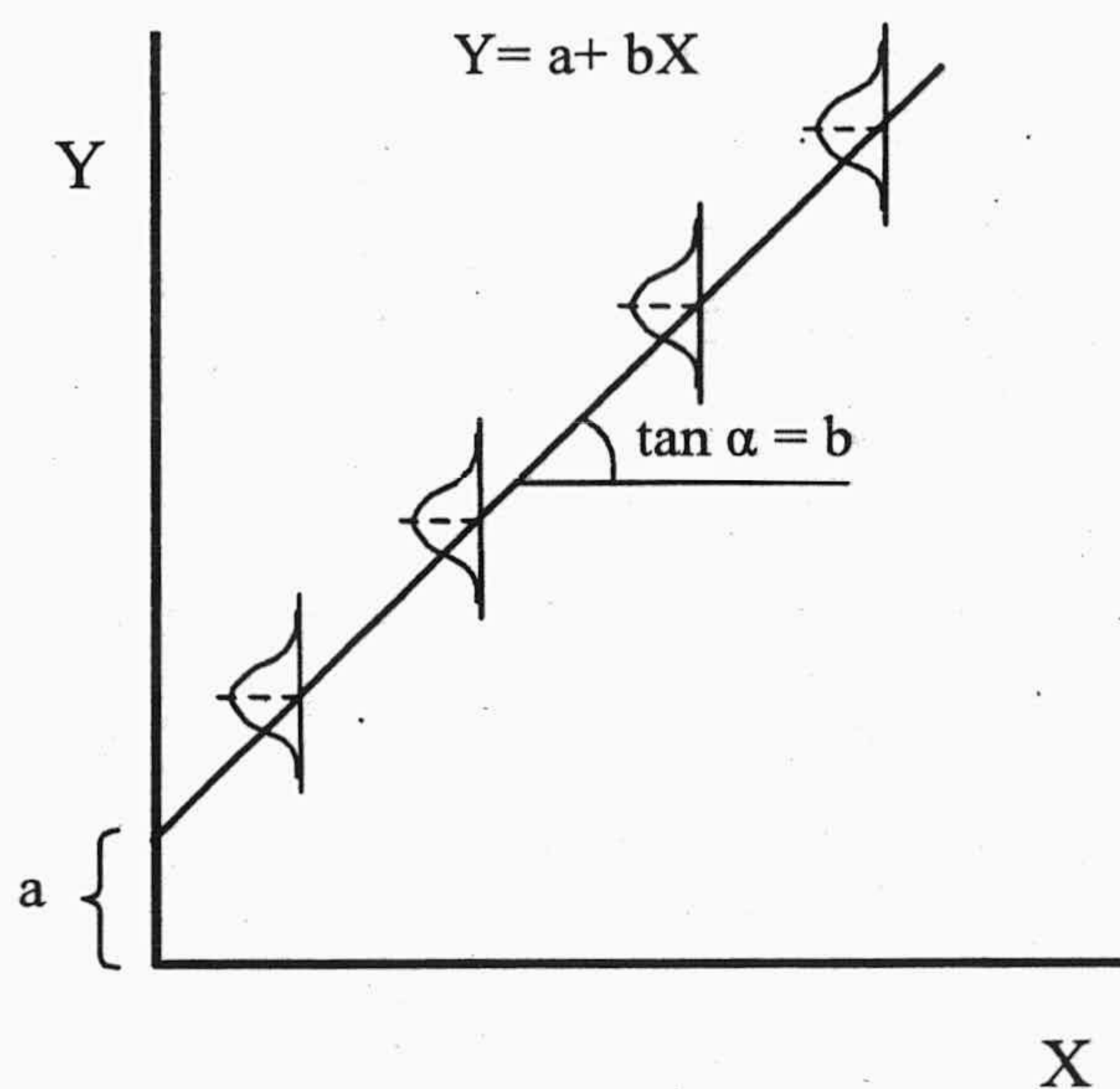


Figura 2.36. Modelo de calibración lineal

5.1.2. Verificación del modelo lineal

La primera operación a realizar es la estimación de los parámetros a y b del modelo, con el objeto de obtener una función lineal de calibración. Para ello, partimos de una serie de n pares de datos experimentales correspondientes a las concentraciones y señales analíticas y les aplicamos el método conocido como de mínimos cuadrados, que supone que la recta que mejor se ajusta a los puntos experimentales, es aquella que se obtiene haciendo que la suma de los residuales sea igual a cero.

Si se supone el cumplimiento de la condición de homocedasticidad, el método de mínimos cuadrados proporciona la estimación de los parámetros a y b más precisas entre las veraces. Así, los intervalos de confianza de la pendiente (b) y de la ordenada en el origen (a) se calcula a partir de las siguientes ecuaciones:

$$\text{Ordenada en el origen} \quad a \pm t_{\alpha, n-2} \cdot S_a$$

Pendiente

$$b \pm t_{\alpha, n-2} \cdot S_b$$

donde $t_{\alpha, n-2}$ es el valor estadístico t- Student para un nivel de significación α determinado y $n - 2$ grados de libertad, S_a y S_b son las desviaciones estándar correspondientes a la ordenada en el origen y la pendiente, respectivamente. A lo largo de esta Memoria se utiliza un nivel de significación del 5 %.

La verificación de las hipótesis del modelo en un problema particular, es clave para establecer la validez de dicho modelo. En primer lugar, se asume la aleatoriedad de la muestra, parámetro controlado por una planificación correcta de la experiencia de calibrado. Se supone asimismo la normalidad de los datos. Para comprobar la tendencia lineal de los datos, se ha optado en esta Memoria por la evaluación del fallo de ajuste de los datos homocedásticos al modelo. El test se aplica sobre el conjunto de parejas de datos experimentales empleadas para establecer el modelo de regresión. Es necesario para ello, tener más de una réplica de algunas de las parejas de datos. Este test compara el valor del estadístico F, calculado como el cociente de las varianzas debidas al fallo de ajuste MS_{FA} y el error puro MS_{PE} , con los valores tabulados, para un determinado nivel de significación α , fijado en el 5 %, y con $k-2$ y $n-k$ grados de libertad, siendo k el número de patrones de calibración diferentes y n el número total de observaciones. Esta condición será evaluada mediante el cálculo del valor de P del test de fallo de ajuste. Si $P \geq 5\%$ se concluirá por la existencia de linealidad, es decir, los datos se ajustan al modelo lineal seleccionado.

Finalmente, se estudia la homogeneidad de varianzas, es decir, la condición de homocedasticidad. Para comprobar esta hipótesis, se emplea el análisis gráfico de los residuos, consistente en verificar experimentalmente que el modelo matemático constituye una simplificación correcta de la serie de puntos experimentales que se poseen, es decir, que el modelo es válido en su establecimiento y válido para predecir futuros valores de concentración desconocida.

5.1.3. Parámetros de calidad.

Los parámetros de calidad utilizados para los sensores de un solo uso basados en el empleo de reactivos cromogénicos, son los siguientes:

5.1.3.1. Rango dinámico lineal:

Viene definido por el intervalo que se encuentra entre el límite superior, esto es el máximo valor de concentración a la que se ha aplicado el método analítico y se ajusta al modelo matemático, y el límite inferior, que es límite de cuantificación.

5.1.3.2. Limite de detección y cuantificación

Podemos definir el límite de detección de un método analítico, como la menor cantidad del compuesto (q) o concentración de compuesto (C_L) que puede ser detectada con un nivel de confianza determinado. Para este tipo de sensores, se ha empleado el concepto de límite de detección, basado en un tratamiento estadístico de la señal del blanco⁹.

Según esta metodología al límite de detección C_L le corresponde una señal analítica:

$$X_L = X_B + K S_B \quad (2.2)$$

donde X_B es el valor medio de la respuesta del blanco; S_B la desviación estándar de dicha señal y K un factor numérico seleccionado de acuerdo con el nivel de confianza deseado.

La concentración C_L está relacionada con el valor de X_L según:

$$C_L = \frac{(X_L - X_B)}{b} \quad (2.3)$$

donde b es la pendiente de la función de calibrado.

⁹ IUPAC, Spectrochimica Acta B, 33 B, 242 (1978).

Sustituyendo en las ecuaciones 2.2 y 2.3 obtenemos que el límite de detección es igual a:

$$C_L = \frac{k \cdot S_B}{b} \quad (2.4)$$

En nuestro caso, hemos utilizado un valor para el factor k de 3 que nos proporciona un nivel de confianza de 99,86% asegurándose así, que la señal analítica correspondiente a C_L es debida a la muestra problema y no a fluctuaciones del blanco.

Por analogía con el desarrollo anterior la expresión para el límite de cuantificación es:

$$C_Q = \frac{k \cdot S_B}{b} \quad (2.5)$$

aunque en este caso, utilizamos un valor del factor k mínimo de 10.

5.1.3.3. *Precisión*

Nos mide el grado de incertidumbre que podemos esperar de los resultados analíticos obtenidos a partir del calibrado. Para ello, se evaluó la precisión la repetibilidad o precisión intralaboratorio, definida como la concordancia que existe entre los resultados del análisis de una misma muestra, realizados por el mismo operador, aplicando el mismo método y en el mismo laboratorio.

Para evaluar la precisión del método analítico, se estudio la repetibilidad de la señal analítica correspondiente a una serie de diez disoluciones de concentración igual que se encuentre dentro del rango dinámico lineal. La precisión vendrá estimada por el valor de la desviación estándar relativa (DER) de dicha señal, calculada según la ecuación 2.6.

$$DER = \left(\frac{S}{Y} \right) \times 100 \quad (2.6)$$

Donde S es la desviación estándar de las señales analíticas encontradas e Y es la media de las señales medidas.

5.1.3.4. Sensibilidad

La sensibilidad de un método analítico o sensibilidad de calibrado mide, en nuestro caso, la relación entre el parámetro analítico –absorbancia de la tira reactiva- y la concentración del analito. Se expresa por el valor de la pendiente de la función de calibrado antes definida¹⁰.

5.1.3.5. Tiempo de respuesta

Es lo que tarda la señal analítica en hacerse independiente del tiempo. Para este tipo de sensores puede ser muy elevado, incluso superior a los 60 minutos. El tiempo de contacto del problema con la tira reactiva es un factor de gran importancia, pues puede controlar la sensibilidad del procedimiento que se puede modificar seleccionando el tiempo de contacto adecuado y, por otra parte, influye sobre la reproducibilidad de los resultados.

¹⁰ IUPAC, Spectrochimica Acta B, 33B, 242 (1978).

5.1.3.6. *Tiempo de vida*

El tiempo de vida es una de las características de mayor importancia para este tipo de sistemas analíticos, pues es lo que condiciona su uso y su posible aplicación real. En esta Memoria de Doctorado se establece el tiempo de vida, sin utilizar ningún sistema de conservación, como suele ser usual, salvo el almacenamiento de membranas evitando el contacto con luz y fuentes de calor.

Para medirlo, se prepararon un conjunto de tiras reactivas y se fue comprobando periódicamente la respuesta que originaban frente a una disolución de analito de concentración situada en el punto medio de la función de calibrado. Cuando el valor obtenido quedaba fuera de la banda de confianza, definida por intervalo de ± 1 desviación estándar alrededor del valor medio, se consideraba al sensor como no útil y definíamos como tiempo de vida útil del sensor, al tiempo transcurrido desde su fabricación hasta ese momento.

5.1.3.7. *Coste estimado*

El coste estimado para un sensor, es calculado como la sumatoria del coste prorrateado de cada uno de las materias primas que los componen. Hay que indicar que estas materias primas, por su calidad y proporciones, son mucho más caras que si se tratase de un fabricación industrial. Por otro lado, no está contemplado en esta estimación, el coste de mano de obra dedicada a la fabricación en si del sensor, por lo que no deja de ser una estimación, que sin duda está muy por encima de su coste real en una fabricación industrial en serie.

5.2. **Basados en el sistema ionóforo-cromoionóforo.**

Como hemos visto en la Introducción, los sensores de un solo uso para cationes que emplean ionóforos, se basan en un mecanismo de cambio iónico y son sensiblemente más complicados que los anteriores, pues aquí hay dos reacciones implicadas, la reacción de reconocimiento y la reacción indicadora. Sin embargo, esa complicación no se ve trasladada a su utilización, ni tan siquiera a la obtención de resultados, gracias a la capacidad de procesamiento de datos de los ordenadores actuales.

5.2.1. Actividad frente a concentración

El tipo de sensores que se está comentando, responden a actividad en analito, tal como vimos en la Introducción, y no a concentración, es decir, responden a la cantidad de analito que esta disponible para interactuar con otras especies, no a la cantidad total de analito en la disolución.

La actividad de un ión, está directamente relacionada con su concentración por medio del coeficiente de actividad γ según las ecuaciones.:

$$a = [z_+] \gamma_+ \quad (2.7)$$

$$a = [z_-] \gamma_- \quad (2.8)$$

donde Z_+ y Z_- son las cargas de cada ión.

Para calcular γ se utilizan las expresiones:

$$\log \gamma_+ = |z_+| \cdot |z_-| \cdot \log \gamma_{\pm} \quad (2.9)$$

$$\log \gamma_- = |z_+| \cdot |z_-| \cdot \log \gamma_{\pm} \quad (2.10)$$

En un principio se utilizó la aproximación de Debye Hückel, (ecuación 2.11) para el cálculo de γ_{\pm} , la cual supone al disolvente como un medio continuo, en lugar de un sistema de moléculas. Es bien sabido que los iones en disolución se encuentran solvatados, tanto más cuanto más polar sea el disolvente, esto hace que la estructura del agua unida al ión sea

diferente que la del agua pura, pero esta interacción entre ión y disolvente es un fenómeno muy complejo, que sólo se puede describir aproximadamente suponiendo el medio continuo.

$$\log \gamma_{\pm} = \frac{A|z_+z_-|\sqrt{I}}{1+B\sqrt{I}} \quad (2.11)$$

Para poder calcular con mayor aproximación los coeficientes de actividad a concentraciones altas, que es donde tiene mayor importancia las interacciones electrostáticas que conducen a la formación de pares iónicos, se modifica la ecuación anterior de forma:

$$\log \gamma_{\pm} = \frac{A|z_+z_-|\sqrt{I}}{1+B\sqrt{I}} + C \cdot I \quad (2.12)$$

donde A, B y C son parámetros experimentales tabulados para disoluciones acuosas a 25 °C para los diferentes iones¹¹. Por su parte I es el valor de la fuerza iónica que está relacionado con la concentración de iones disueltos en el medio, mediante la conocida expresión:

$$I = \frac{1}{2} \sum_i C_i Z_i^2 \quad (2.13)$$

¹¹ Meier, P., Anal. Chim. Acta, 136, 363 (1982).

Tabla 2.3. Valores de los parámetros experimentales tabulados para diferentes sales.

Parámetros	MgCl ₂	CaCl ₂	SrCl ₂	BaCl ₂	LiCl	NaCl	KCl
A	0,5108	0,5108	0,5108	0,5108	0,5108	0,5108	0,5108
B	1,7309	1,5800	1,4874	1,3712	1,4982	1,4255	1,2796
C	0,05195	0,04570	0,04283	0,3953	0,11115	0,02626	0,00393

Se debe tener en cuenta, que en el medio se encuentra tanto la disolución reguladora como el analito, por lo tanto la fuerza iónica será:

$$I = \sum I_{\text{tampon}} + I_{\text{analito}} \quad (2.11)$$

5.2.2. Medida del parámetro analítico

En el caso de membranas basadas en un segundo componente para cationes la señal repuesta que representamos no es la absorbancia (A) sino el grado de protonación ($1-\alpha_{\text{ef}}$) del cromoionóforo:

$$1-\alpha_{\text{ef}} = \frac{A - A_{\text{Base}}}{A_{\text{tampón}} - A_{\text{Base}}} \quad (2.14)$$

Para realizar la medida de la señal analítica comenzamos por introducir durante unos minutos, menos de cinco minutos, una tira sensora en un tubo de poliéster que contiene disolución reguladora del pH adecuado, de forma que, prácticamente, todo el cromoionóforo

esté en forma ácida, por las razones que se han discutido en la Introducción. En concreto, para el cromoionóforo usado, que es el azul Nilo, pasa a color azul.

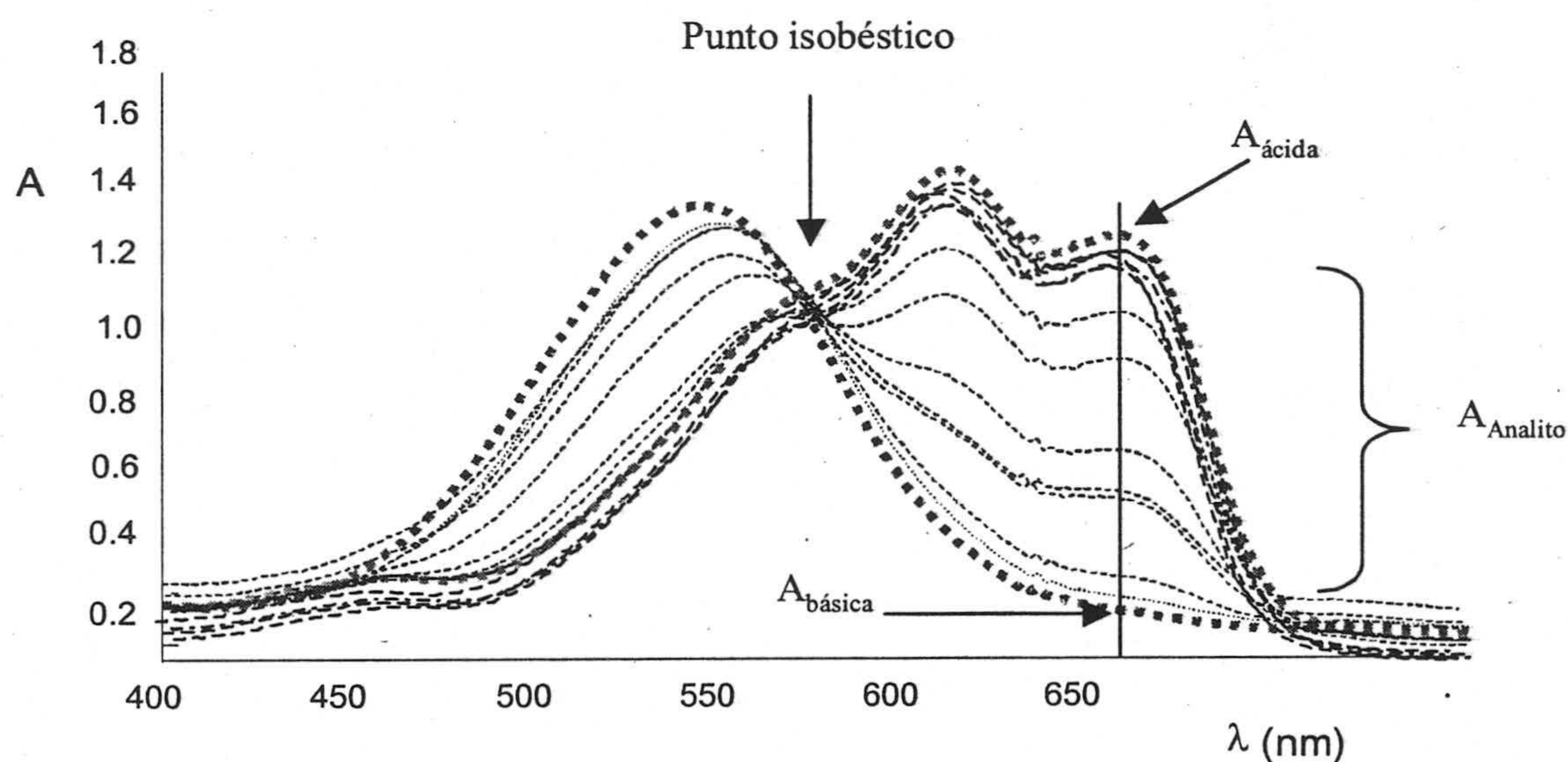


Figura 2.37. Espectro de absorción de la forma desprotonada y protonada del cromoionóforo. La forma desprotonada presenta un máximo de absorción de 540 nm y la forma protonada presenta máximos a 610 y 659 nm.

Una vez realizado esto, sacamos la tira del tubo y la introducimos durante unos minutos en otro que contiene una disolución de NaOH 0,01 M. La coloración de la membrana cambia a color rojo, pues el cromoinóforo sufre una desprotonación. Por último, se introduce en un tubo conteniendo analito en presencia de la misma disolución reguladora anterior. Conforme crezca la concentración de analito, el color de la zona activa será cada vez más rojo.

En cada caso se mide la absorbancia de la tira reactiva como ha quedado dicho con anterioridad (A , $A_{\text{tampón}}$, A_{Base}) o bien se registra el espectro de absorción. En la Figura 2.37 se muestra como varía el espectro de una tira reactiva en función de la concentración de analito con la que ha estado en contacto. Con los tres valores de absorbancia medidos se

calculará el parámetro analítico $1-\alpha_{ef}$ que es el valor de la señal respuesta que se representa frente $\log a_{analito}$ para realizar el calibrado.

5.2.3. Establecimiento del modelo

Para aceptar que la tira reactiva para cationes basada en intercambio iónico obedece la ecuación 2.15, discutida en la Introducción, se debe comprobar experimentalmente su validez. Para ajustar los datos experimentales al modelo teórico, deben obtenerse, en primer lugar, el conjunto de datos experimentales, esto es, las parejas $1-\alpha$ y actividad, calculada como quedó dicho más arriba.

$$a_{I^{v+}} = \frac{1}{K_e^{ILp}} \left(\frac{a_{H^+} \alpha}{1-\alpha} \right)^z \frac{C_R - (1-\alpha)C_C}{z \left(C_L - \frac{p}{z} (C_R - (1-\alpha)C_C) \right)^p} \quad (2.15)$$

Si tomamos logaritmos en la ecuación 2.3 y establecemos como variable independiente $\log a_{I^{v+}}$ y como variable dependiente $1-\alpha$ y las renombramos como X é Y, respectivamente, llegamos a la ecuación 2.16.

$$X = \log \left\{ \frac{1}{K_e^{ILp}} \left(\frac{a_{H^+} (1-Y)}{Y} \right)^z \frac{C_R - YC_C}{z \left(C_L - \frac{p}{z} (C_R - YC_C) \right)^p} \right\} \quad (2.16)$$

Con la ayuda del software informático GraphMatica for win32 v. 1.60d que capaz de procesar esta función y representar su inversa que es la que nos interesa, esto es $Y=f(X)$, seremos capaces de obtener la función representada en la Figura 2.38.

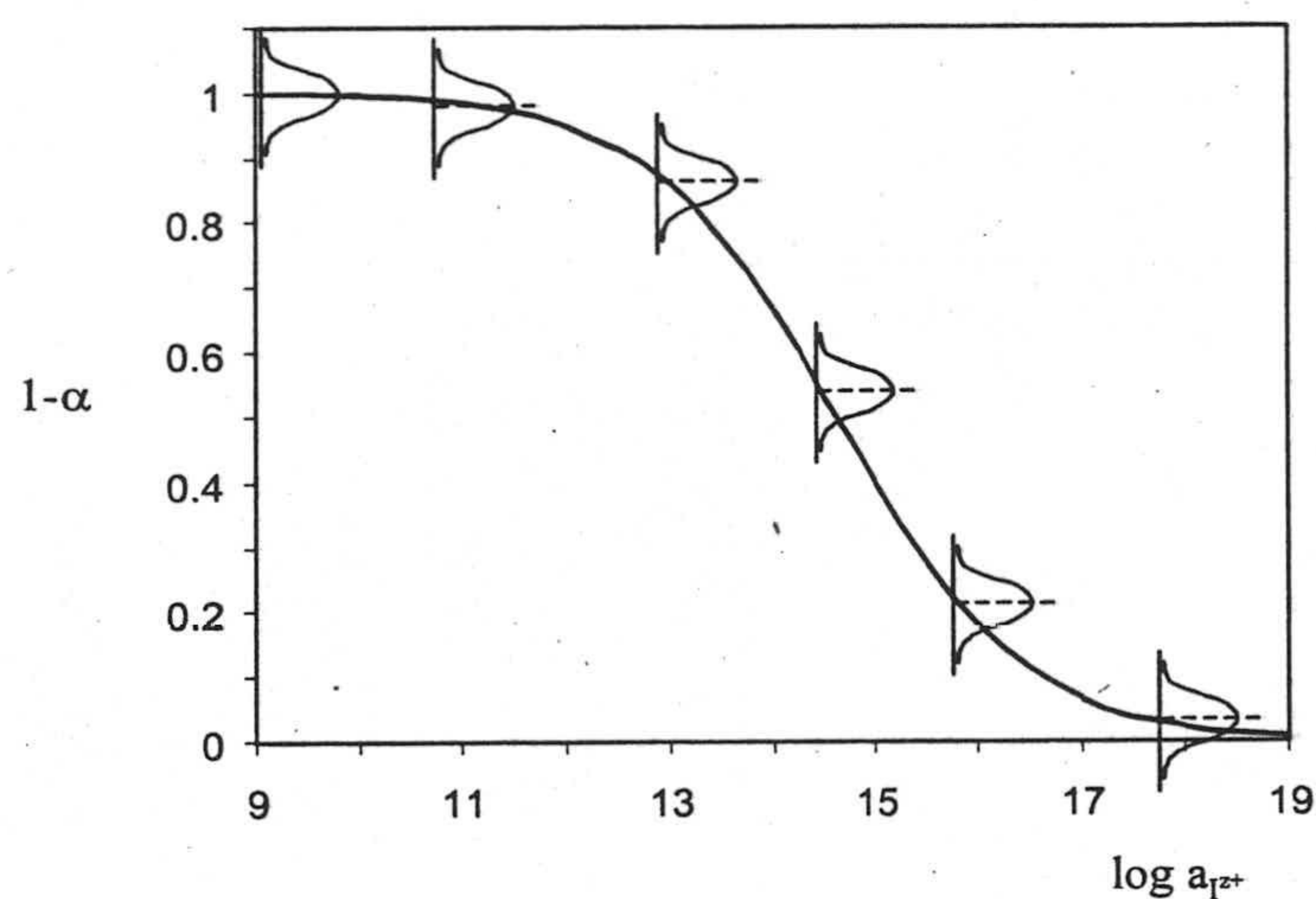


Figura 2.38. Modelo sigmoidal para tira reactiva

Si bien este es el comportamiento teórico, en la práctica se ha comprobado que existe una desviación de este modelo matemático ya que el cromoforo no llega a estar completamente protonado en nuestras condiciones de trabajo, es decir $1-\alpha$ no llega a tomar el valor 1, sino que se estabiliza a valores inferiores, tal y como muestra la Figura 2.39. Por ello, resulta apropiado definir, como hemos visto, el grado de protonación efectivo, denotado como $1-\alpha_{ef}$, que se calcula midiendo la absorbancia de la tira que ha estado en contacto solo con la disolución reguladora usada $A_{tampón}$, en vez de en una disolución de HCl.

$$1-\alpha_{ef} = \frac{A - A_C}{A_{tampón} - A_C} \quad (1.26)$$

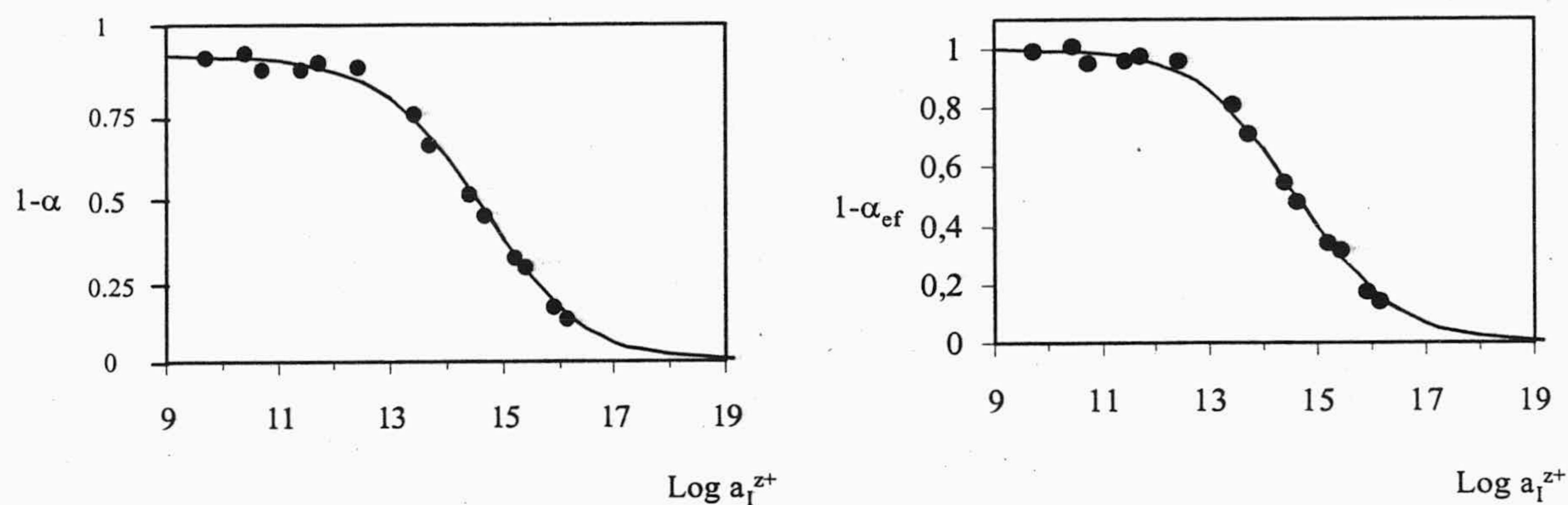


Figura 2.39. Desviación del modelo y concepto de $1-\alpha_{ef}$

Existen por tanto una variable independiente X (actividad) que se relaciona con una variable dependiente Y ($1-\alpha_{ef}$) a través de unas constantes y unos parámetros que ya se discutieron en la Introducción, así la forma como influyen sobre las características de la curva sigmoideal

5.2.4. Verificación del modelo sigmoideal

Lamentablemente no disponemos de método alguno análogo al de mínimos cuadrados para el modelo lineal, para establecer los parámetros de la función sigmoideal. Por ello, en una primera aproximación, se representaron los datos experimentales sobre la curva teórica, de manera que gráficamente se pueda apreciar la aplicabilidad del modelo sigmoideal, así como sus posibles desviaciones.

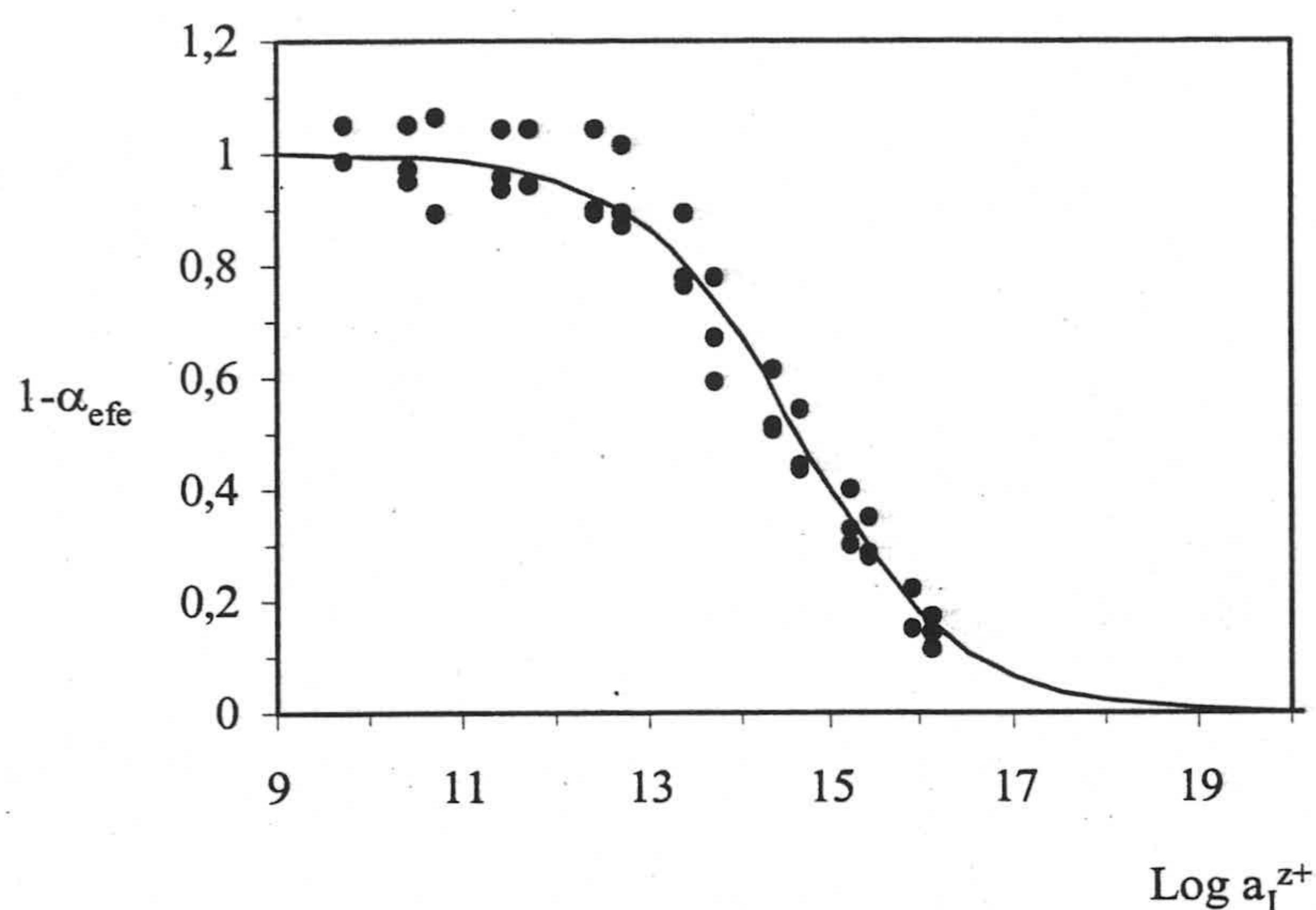


Figura 2.39. Puntos experimentales y curva sigmoideal teórica.

Si el número de datos experimentales es suficientemente alto, tanto por el uso de diferentes concentraciones como de réplicas, se puede, en una primera aproximación, tener una idea de la bondad del ajuste, como se observa en la Figura 2.39. Sin embargo, para utilizar un parámetro que nos cuantifique el grado de ajuste, se ha definido un parámetro A que es la sumatoria de los cuadrados de las diferencias entre las variables dependientes para el modelo teórico y cada uno de los puntos experimentales.

$$A = \sum (y_t - y_{\text{ex}})^2 \quad (2.27)$$

5.2.5. Parámetros de calidad

Las propiedades analíticas de calidad que se han utilizado para caracterizar un método analítico basado en tiras reactivas que emplean ionóforos neutros son los que se indican a

continuación. Solo insistiremos en aquellos que se definen de forma diferente a los que hemos visto en el apartado anterior.

5.2.5.1. Rango de aplicación

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

5.2.5.2. Límite inferior y superior.

En la bibliografía consultada se han utilizado tres aproximaciones diferentes para calcular el límite de detección basado en la pérdida de sensibilidad debido al tipo de función respuesta sigmoideal que presentan estos sistemas:

1. Usando la desviación estándar de la señal del fondo¹². Es decir, tomando como límite de detección la intersección de la función respuesta teórica y el menor de los valores del intervalo de incertidumbre de la señal de fondo, definido como tres veces la señal del ruido, tal como muestra la Figura 2.40

2. Usando la variación de la pendiente de la función respuesta¹³. En este caso se tomará como límite de detección la concentración que corresponda al punto donde la pendiente sea la mitad de la máxima, tal como lo muestra la Figura 2.41.

¹² Lerchi, M., Bakker, E., Rusterholz, B. y Simon, W., Anal. Chem., 64, 2029 (1992).

¹³ Seiler, K. y Simon, W., Sens. Actuators B, 6, 295 (1992).

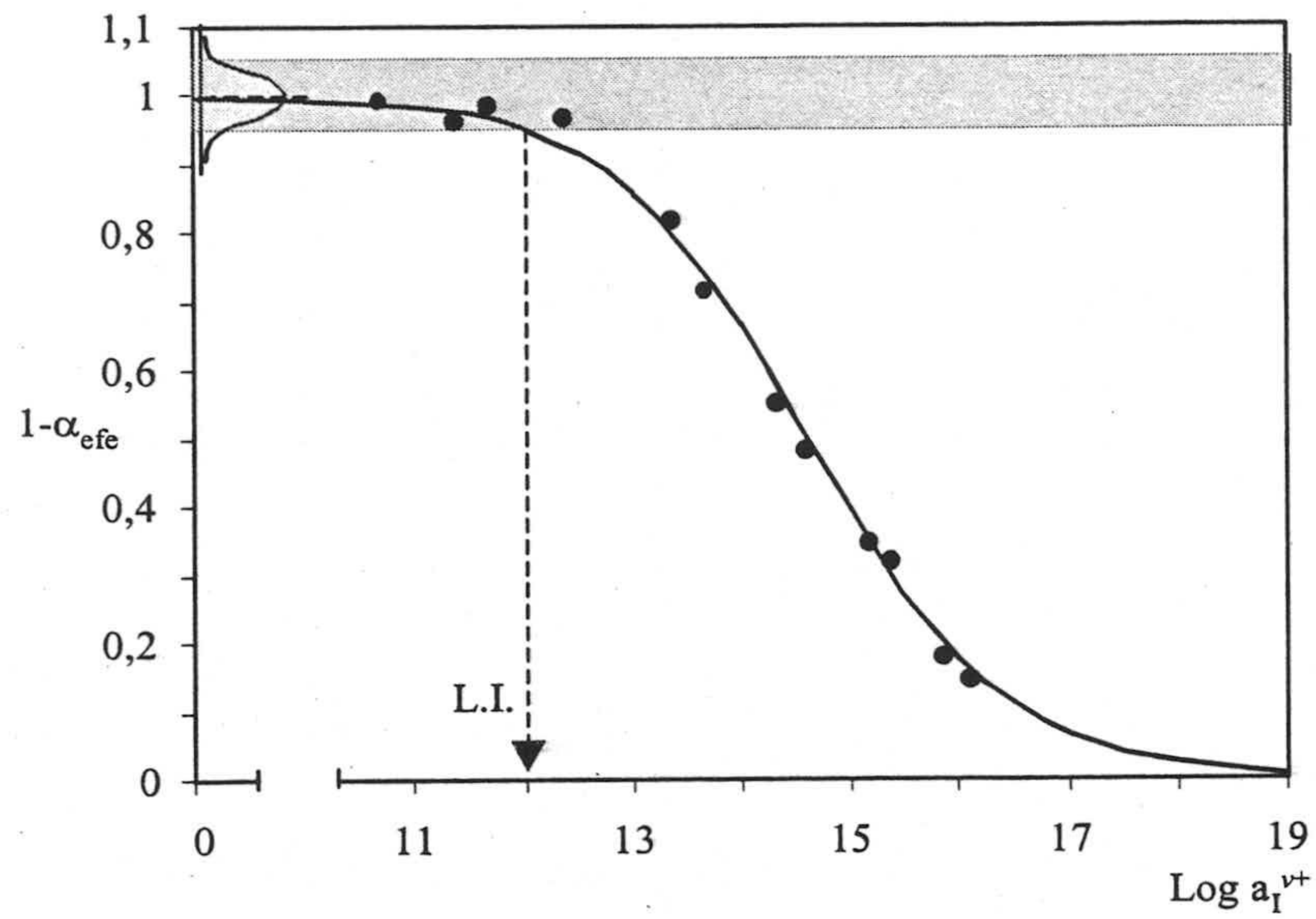


Figura 2.40. Límite inferior basado en la señal de fondo.

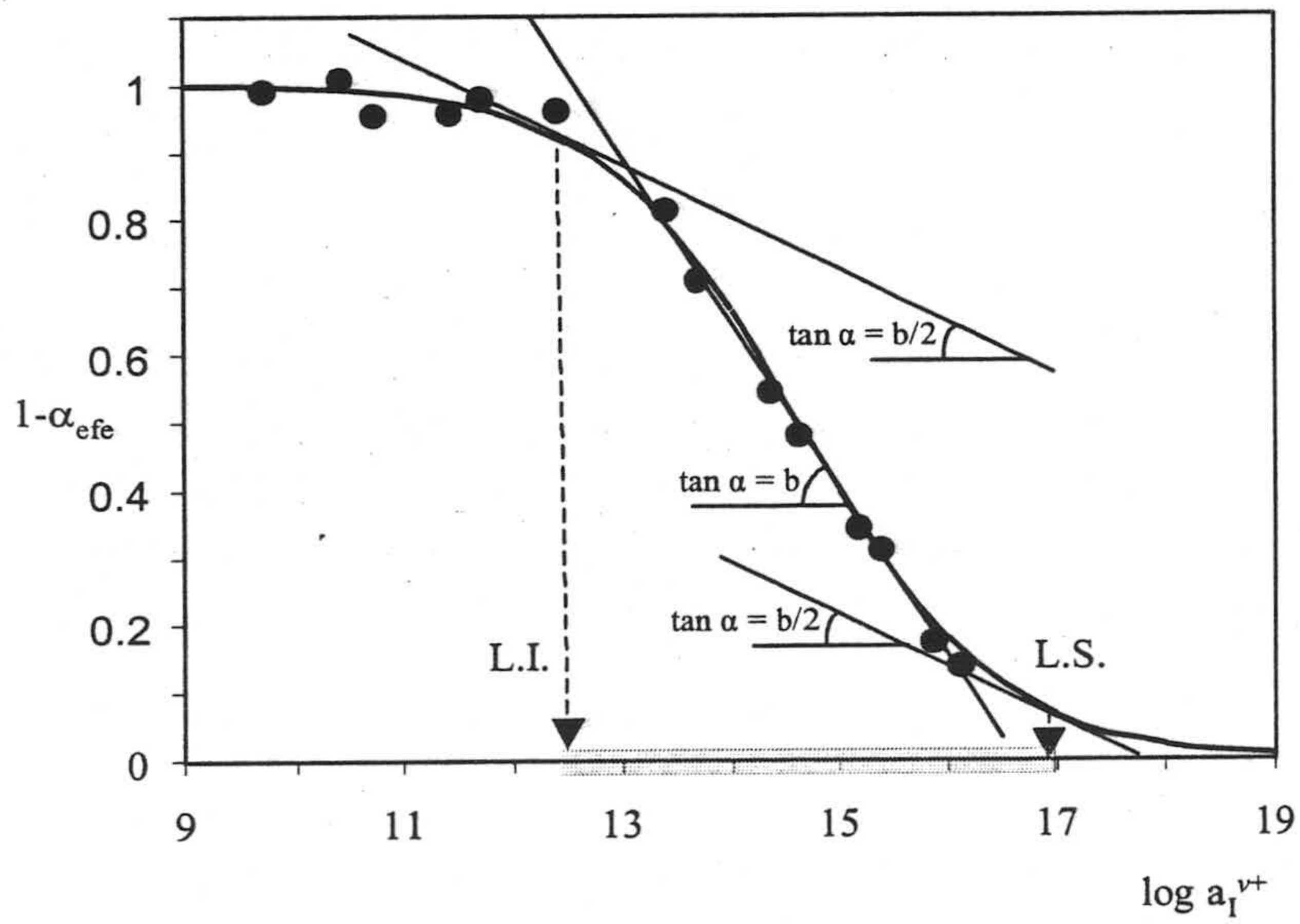


Figura 2.41. Límites inferior y superior basados en la pérdida de sensibilidad. En color verde esta resaltado el rango de aplicación

3. Utilizando un modelo lineal en diferentes zonas de la función respuesta¹⁴. En este caso, aproximamos la zona de máxima y mínima pendiente de la función respuesta a sendas funciones lineales, lo que se confirma mediante un test estadístico de fallo de ajuste. De esta forma, definimos el límite de detección como la actividad en el analito que corresponde al punto de intersección entre la funciones lineales de máxima y mínima pendiente en las zonas de concentraciones bajas como se muestra en la Figura 2.42. De forma análoga se debería definir el límite superior como la intersección entre la funciones lineales de máxima y mínima pendiente en las zonas de concentraciones altas. Sin embargo, esa zona de concentraciones altas no es totalmente accesible. Por ello se define el límite superior como el punto de corte entre la función lineal en la zona de máxima pendiente y el eje X.

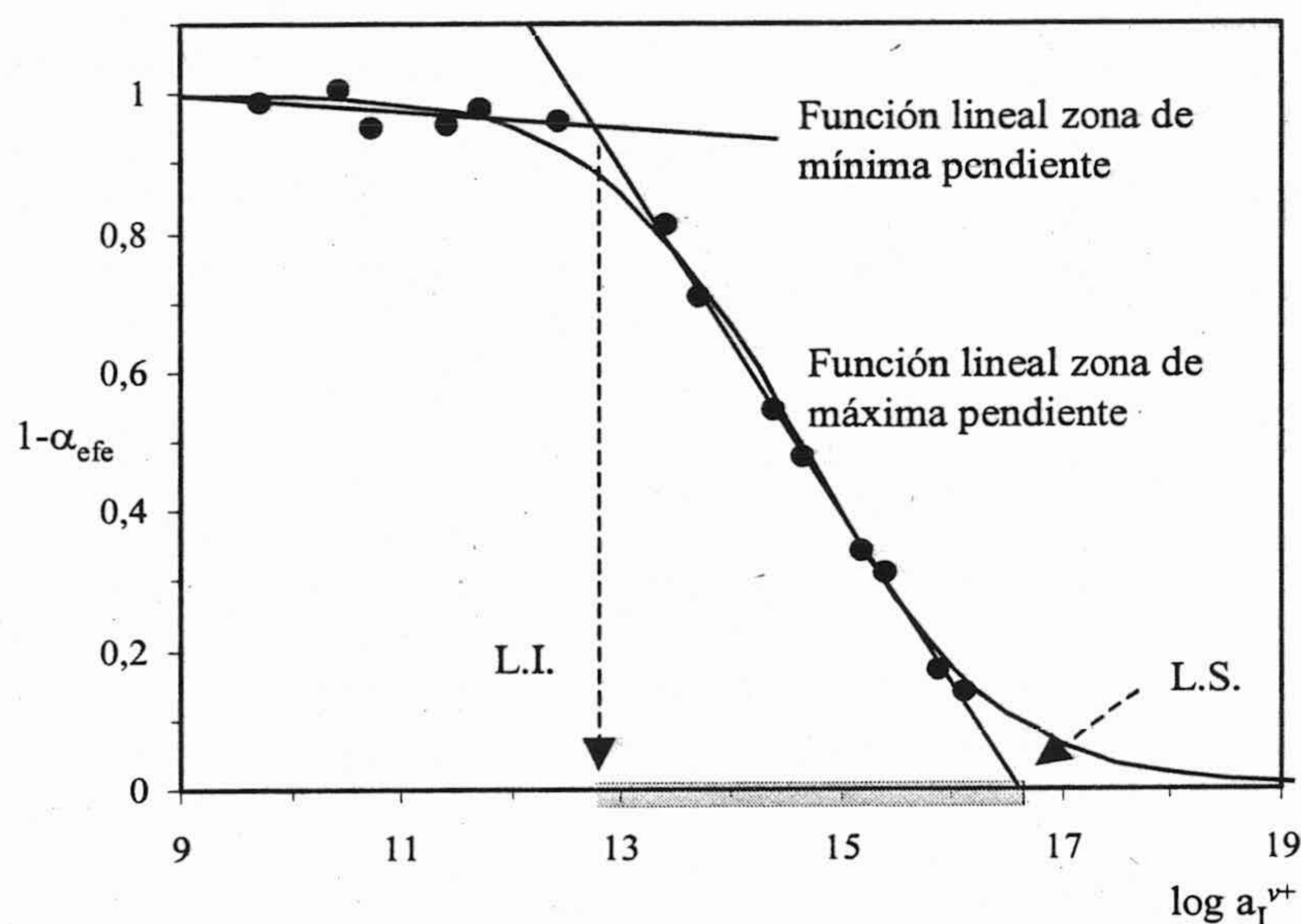


Figura 2.42. Límites inferior y superior basado en la intersección de zonas linealizadas. En color verde esta resaltado el rango de aplicación

¹⁴ Bakker, E., Willer, M. y Prestch E., Anal. Chim. Acta, 282, 265 (1993).

En la presente Memoria de Doctorado se ha utilizado este último criterio, si bien como límite superior se han tomado dos, el ya indicado, por una parte, y, por otra, el mayor valor de concentración ensayado, en lugar de la intersección con el eje X, pues consideramos que este representa mejor la realidad.

5.2.5.3. *Precisión*

La precisión, expresada como desviación estándar relativa (DER) de un cierto número de medidas repetidas, es un parámetro indicativo del grado de incertidumbre que debemos esperar de los resultados analíticos. Se ha evaluado a varios niveles de concentración, usualmente tres: alta, media y baja, dentro del rango lineal con máxima pendiente de la curva sigmoideal de calibrado.

En este caso que estamos comentando, los sensores suelen ser reversibles, esto significa que pueden utilizarse más una vez, tras una regeneración por inmersión muy breve en una disolución de HCl 0,1 M, sin que su rendimiento se vea alterado. Por ello, se pueden definir dos tipos de precisión, entendidas como repetitividad, precisión intrasensor y precisión intersensor. La primera de ellas indica la precisión de la medida utilizando el mismo sensor. La precisión intersensor considera la variabilidad que introduce el empleo de un sensor diferente en cada réplica; esto es, introduce la variabilidad de construcción de cada tira reactiva.

5.2.5.4. *Sensibilidad*

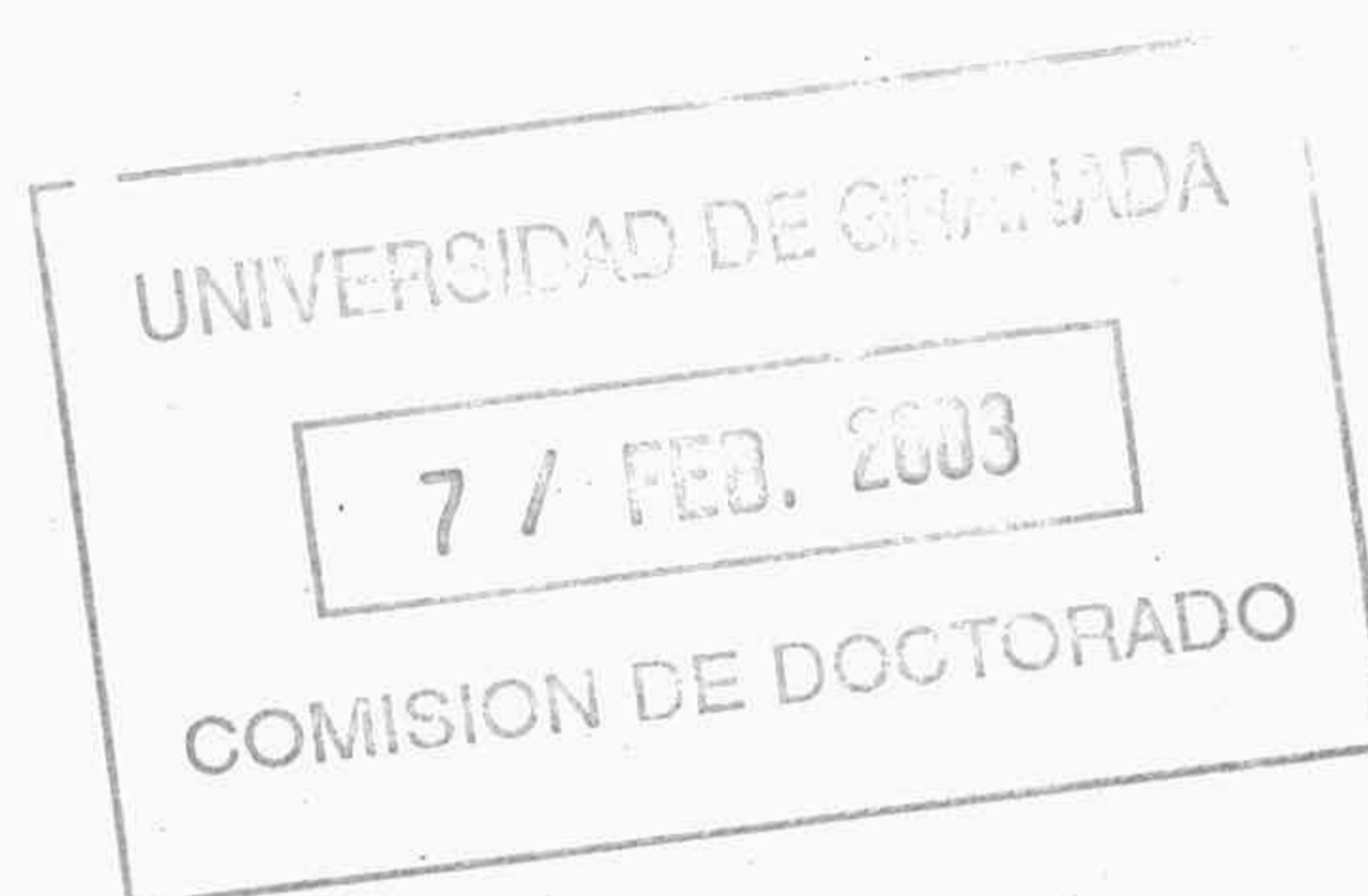
La sensibilidad de un método analítico o sensibilidad de calibrado mide, en nuestro caso, la relación entre el parámetro analítico $1-\alpha_{ef}$ calculado a partir de la señal instrumental –la absorbancia de la tira reactiva– y el logaritmo decimal de la actividad de analito. Se expresa por el valor de la pendiente de la función de calibrado antes definida.

5.2.5.5. Selectividad

Para establecer la selectividad en este tipo de sensores basados en reacciones de cambio iónico se utiliza el método de las disoluciones separadas^{15,16}, dicho método que ha sido comentado en la Introducción, consiste en establecer la respuesta del interferente frente al mismo sensor, para así conocer el valor de la constante de equilibrio $K_e^{JL_P}$ y, despejando de su correspondiente ecuación, obtener el valor de la constante de selectividad K_{IJ}^{opt} . En el caso de que el interferente presente la misma carga y estequiometría que el analito, se puede calcular gráficamente el coeficiente de selectividad como la distancia entre la curva respuesta del analito y la curva del interferente, siempre y por convenio, a un grado de protonación de 0,5.

5.2.5.6. Tiempo de respuesta

En este tipo de sensores lo definimos como el tiempo que tarda la señal analítica en estabilizarse, es decir, en alcanzar un valor de señal comprendido entre un 95% del valor que tomaría la señal analítica a tiempo infinito. En caso de que la variabilidad del método sea superior al 5 %, el tiempo de respuesta será el que tarde en alcanzar una señal igual al 100% de la señal a tiempo infinito menos el tanto por ciento de variabilidad del método.



¹⁵ U.E. Spichiger-Keller, *Chemical Sensors and Biosensors for Medical and Biomedical Applications*, 1^a ed., Wiley-VCH, Weinheim, 1998.

¹⁶ IUPAC Recommendations for Nomenclature of Ion-Selective Electrodes, *Pure Appl. Chem.*, 48, 127 (1976).

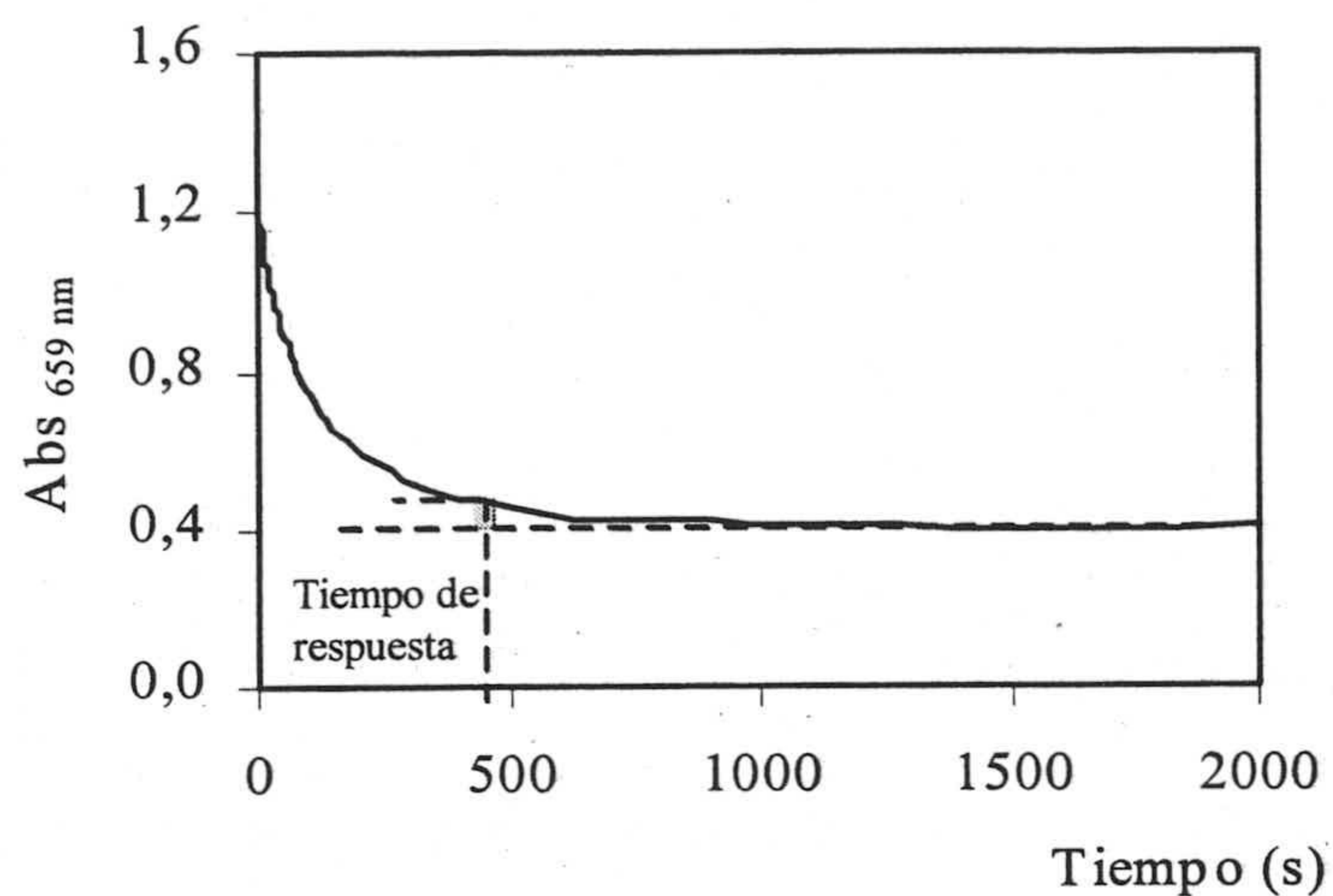


Figura 2.43. Tiempo de respuesta del sensor, calculado al 95 % de la señal a tiempo infinito.

5.2.5.7. Tiempo de vida

Al igual que ocurre con el modelo de sensores basados en agentes cromogénicos convencionales, el tiempo de vida de la membrana viene limitado por sus componentes ionóforo, cromoionóforo, PVC, etc. La metodología utilizada para su medida ha sido análoga a la descrita en el apartado 4.1.3.6

5.2.5.8. Coste estimado

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

6. Validación del método analítico

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

El protocolo aplicado en esta Memoria de Doctorado para la validación de los métodos propuestos ha sido el de la comparación de los resultados obtenidos en los análisis realizados de cada uno de los analitos estudiados en la matriz de interés con el método propuesto y los obtenidos con un método de referencia. Para ello, una vez realizados los análisis por ambos métodos con un número razonable de réplicas debemos:

Comparar las varianzas:

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

$$F_{\text{cal}} = \frac{S_1^2}{S_2^2} \quad (1.18)$$

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

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

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

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

Varianzas iguales

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

$$S_p^2 = \frac{(n_1 - 1) \cdot S_1^2 + (n_2 - 1) S_2^2}{n_1 + n_2 - 2} \quad (1.19)$$

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

$$t_{\text{cal}} = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{\sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}} \quad (1.20)$$

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

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

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

Varianzas distintas.

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

$$t_{\text{cal}} = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{\sqrt{\frac{S_1^2}{n_1} + \frac{S_2^2}{n_2}}} \quad (1.21)$$

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

$$\text{g.l.} = \frac{\left(\frac{S_1^2}{n_1} + \frac{S_2^2}{n_2} \right)^2}{\frac{\left(\frac{S_1^2}{n_1} \right)^2}{n_1 - 1} + \frac{\left(\frac{S_2^2}{n_2} \right)^2}{n_2 - 1}} \quad (1.22)$$

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

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

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

6.1. E.A.A. como método de referencia

La espectroscopia de absorción atómica se basa en la absorción de energía radiante UV-Vis por parte de átomos o iones elementales. Así los espectros se obtiene mediante el adecuado tratamiento térmico aplicado a la muestra, que convierte a esta en vapor atómico. A este proceso se le denomina *atomización*, el éxito de la técnica depende en gran medida de dicho proceso, en nuestro caso se a utilizado la llama de acetileno como método de atomización que alcanza valores de temperatura comprendidos entre 1700-3150 ° C.

Así en un medio gaseoso a alta temperatura los átomos son capaces de absorber radiación de longitudes de onda características según las transacciones electrónicas hacia estados excitados más elevados. En el caso del calcio, se mide la absorción a una longitud de onda de 422,7 nm y en el de magnesio de 285,2 nm. Como fuente de radiación se ha utilizado una lámparas de cátodo hueco para calcio y magnesio, respectivamente y se ha operado con un valor de rendija de medida de 0,7 nm en ambos casos.

La instrumentación utilizada fueron Espectrofotómetro de Absorción Atómica Perkin Elmer A Analyst 100 y Espectrofotómetro de Absorción Atómica Perkin-Elmer LB1100

6.2. Complexometría como método de referencia.

Este método clásico¹⁷ consiste en la valoración de los iones Ca(II) y/o Mg(II) utilizando la sal sódica del ácido etilendiaminotetracético (EDTA) como agente valorante, que actúa como ligando polidentado frente a iones metálicos, entre ellos Ca(II) y Mg(II) con

¹⁷ W. Fresenius, K.E. Quentin, W. Schneider (eds.), Water Analysis, Springer, Berlín, pg. 294 -298 (1998).

los que origina complejos de estequiometría 1:1 y estabilidad variable en función del pH del medio.

El punto final de la valoración se va a poner de manifiesto mediante el empleo de indicadores metalocrómicos, como son en este caso el negro de Eriocromo T (NET), que a pH 10 y en presencia de Mg(II) origina un complejo de color rojo vinoso mientras que en estado libre presenta un color azul y el Calcón que muestra un comportamiento similar, pero debe utilizarse a valores de pH superiores.

Para determinar la dureza del agua se opera valorando 100 ml de muestra problema situada en un matraz erlenmeyer, a la que se ha adicionado 5 ml de disolución reguladora amonio/amoniaco de pH 10 y unos miligramos de NET con lo que se forma un complejo de color rojo vinoso. La valoración se realiza con EDTA 0,01 M hasta que la formación de los complejos EDTA-Ca y EDTA-Mg desplacen por completo a los complejos con el indicador y pase el color de este a azul puro.

En el caso que se desee analizar el calcio presente el proceso operatorio será muy similar, solo que se trabaja pH superiores por adición de NaOH (5 ml del 40%). De este modo precipita el Mg(II) en forma de hidróxido y se utiliza como indicador el Calcón en lugar del NET.

CAPÍTULO 3

DETERMINACIÓN DE CALCIO

MEDIANTE UNA TIRA REACTIVA

BASADA EN UN REACTIVO

CROMOGENICO CONVENCIONAL



CAPITULO 3

DETERMINACIÓN DE CALCIO MEDIANTE UNA TIRA REACTIVA BASADA EN UN REACTIVO CROMOGÉNICO CONVENCIONAL

1. Introducción

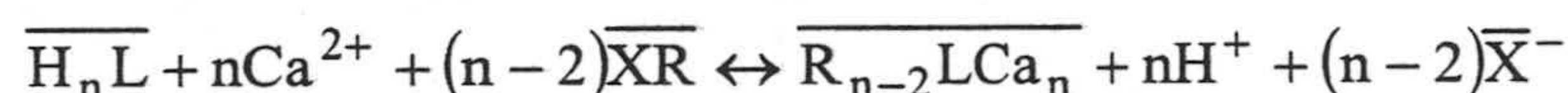
En este capítulo se expone el trabajo desarrollado para poner a punto y posteriormente caracterizar, un sensor óptico de un solo uso o tira reactiva para la determinación de calcio. Se trata de un sensor óptico irreversible de un solo uso basado en la formación de quelatos. Consta de una lámina de poliéster conteniendo en un área circular de 6 mm de diámetro y 25 μm de espesor todos los reactivos necesarios para producir una respuesta rápida y selectiva para calcio. Este área denominada zona activa o zona sensora, se formó utilizando PVC como material formador de membrana, el ácido 2,7-bis-(4-cloro-2-fosfonobenzenoazo)-1,8-

dihidroxinaftaleno-3,6-disulfónico, comúnmente denominado Clorofosfonazo III (CPA), como agente cromogénico, cloruro de tridodecilmetilamonio (TDMAC) como catión lipofílico y tributilfosfato (TBP) como plastificante.

El procedimiento se desarrolló para su aplicación a aguas de diverso tipo (natural, de abastecimiento urbano, mineral, de mar y de río) pensando en que se plantee como una alternativa rápida y económica a los métodos tradicionales de determinación de calcio.

Esta tira reactiva se basa en un mecanismo de formación de complejos con un reactivo cromogénico convencional de carácter lipofílico que origina una especie cargada negativamente que se retiene en la fase orgánica como par iónico con un catión lipofílico. Para ello, la membrana sensora de la tira reactiva contendrá un agente complejante cromogénico selectivo para calcio H_nL que origina el complejo $LCa_n^{(n-2)-}$ cuando se ponga en contacto con una disolución conteniendo calcio, y además contendrá una sal de catión lipofílico R^+ que permita la retención del complejo en la membrana por formación de pares iónicos.

Así pues, en la zona sensora en contacto con la disolución acuosa que contiene iones calcio, tendrá lugar la siguiente reacción:



En consecuencia, se transferirá calcio desde la disolución a la membrana, en proporción a la concentración de calcio en disolución. La medida de la absorbancia de la especie compleja formada en la membrana, permitirá el cálculo de la concentración de calcio^{1,2}.

Los factores que pueden influir en la respuesta óptica de la tira reactiva para calcio se pueden clasificar en dos grupos. 1) Parámetros relacionados con el diseño y composición de

¹ Oehme, I. y Wolfbeis, O., Mikrochim. Acta, 126, 177 (1997).

² Seitz, W. R., Anal. Chem., 56, 16A (1984).

la membrana. Entre ellos encontramos: los componentes del cóctel usado para la preparación de la membrana y sus proporciones, el volumen de cóctel empleado para la fabricación de la membrana y demás condiciones usadas. 2) Parámetros relacionados con el proceso de equilibración de la muestra conteniendo el analito con la tira reactiva; así pH, tiempo de contacto, fuerza iónica y concentración de calcio.

A continuación, resumimos los experimentos realizados para establecer las influencias de los citados factores y los valores de los mismos que originan la mejor respuesta.

2. Medida de absorbancia y parámetro analítico

El parámetro analítico que utilizamos en este tipo de sensores ópticos de un solo uso es la absorbancia de la membrana plástica. En este caso la medida se realiza a 659 nm donde como se observa en la Figura 3.1, es mayor la diferencia de absorbancia entre el complejo de calcio y el reactivo.

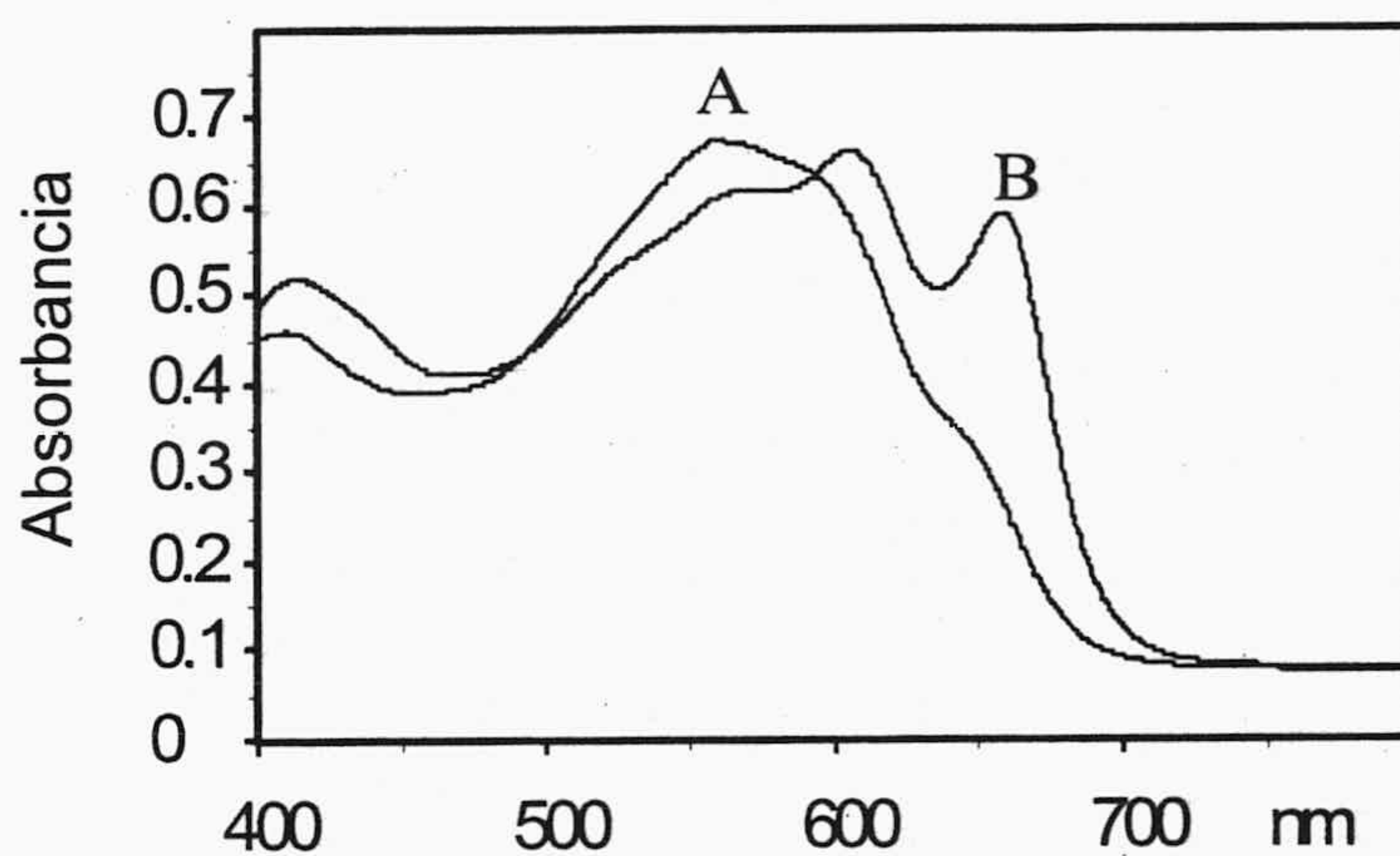


Figura 3.1. Espectros UV-Visible: a) CPA;. b) Quelato CPA-Ca.

Estas medidas espectrofotométricas se realizan usando el soporte anteriormente descrito en la Introducción, con lo que se mejora la reproducibilidad de las medidas, pues al medir en una zona con diámetro constante (5 mm) e inferior al diámetro de la zona activa del sensor, se evitan medir en el borde exterior de la zona activa y, de este modo, se reduce la variabilidad de la señal analítica

3. Características y elaboración de la tira reactiva.

Para la formar la membrana sensora sobre el soporte se ha optado por preparar una disolución de todos los componentes –denominado cóctel- en un disolvente adecuado, tetrahidrofurano (THF) y depositar un volumen de ese cóctel sobre el soporte mediante el sistema centrífugo comentado en el Capítulo 2, permitiendo que una evaporación lenta del disolvente origine la membrana sensora.

Selección de reactivos

Para el desarrollo de esta tira reactiva de tipo óptico para la determinación de calcio basada en un reactivo quelante, es necesario seleccionar un conjunto de reactivos que permitan que se dé la reacción de complejación en membrana entre el calcio presente en la disolución y el agente complejante situado en la membrana.

El cóctel se compone de: 1) un polímero, que actúa como medio de inmovilización por entrapamiento, proporcionando una fase adecuada para los componentes funcionales de la membrana y permitiendo que se pueda adherir al soporte inerte; 2) un plastificante apropiado que actúa regulando la permeabilidad y movilidad dentro de la matriz polimérica; 3) un agente cromogénico quelante capaz de reaccionar selectivamente con calcio para formar un quelato; 4) una sal de anión lipofílico que permita retener especies cargadas en la membrana lipofílica y así posibilitar la reacción y evitar la lixiviación de especies.

Con todos estos reactivos será necesario preparar una membrana que se fijará sobre un soporte inerte y ópticamente transparente, sobre el cual se realizará la medida de absorción de radiación por transmisión.

3.1. Selección de agente cromogénico.

El primer aspecto que se estudió fue la selección del agente cromogénico para calcio. Se seleccionaron diferentes agentes quelantes conocidos para calcio y/o magnesio entre los

que se encontraban: el piridilazoresorcinol³ (PAR), el azul de metiltimol⁴, el Arsenazo III⁵, la cresolftalein complexona^{6,7} y el clorofosfonazo III⁸ (CPA). Si bien todos ellos cumplían la condición básica de formar un complejo estable y de forma rápida con calcio, no presentaban suficiente selectividad frente a otros metales alcalinotérreos, especialmente magnesio. Sin embargo, el clorofosfonazo III, que es el ácido 2,7-bis-(4-cloro-2-fosfonobencenoazo)-1,8-dihidroxi-naftaleno-3,6-disulfónico, muestra la particularidad de formar complejos de diferentes características ópticas según se formase el quelato con calcio o magnesio⁹. Así pues, fue seleccionado este como agente quelante cromogénico.

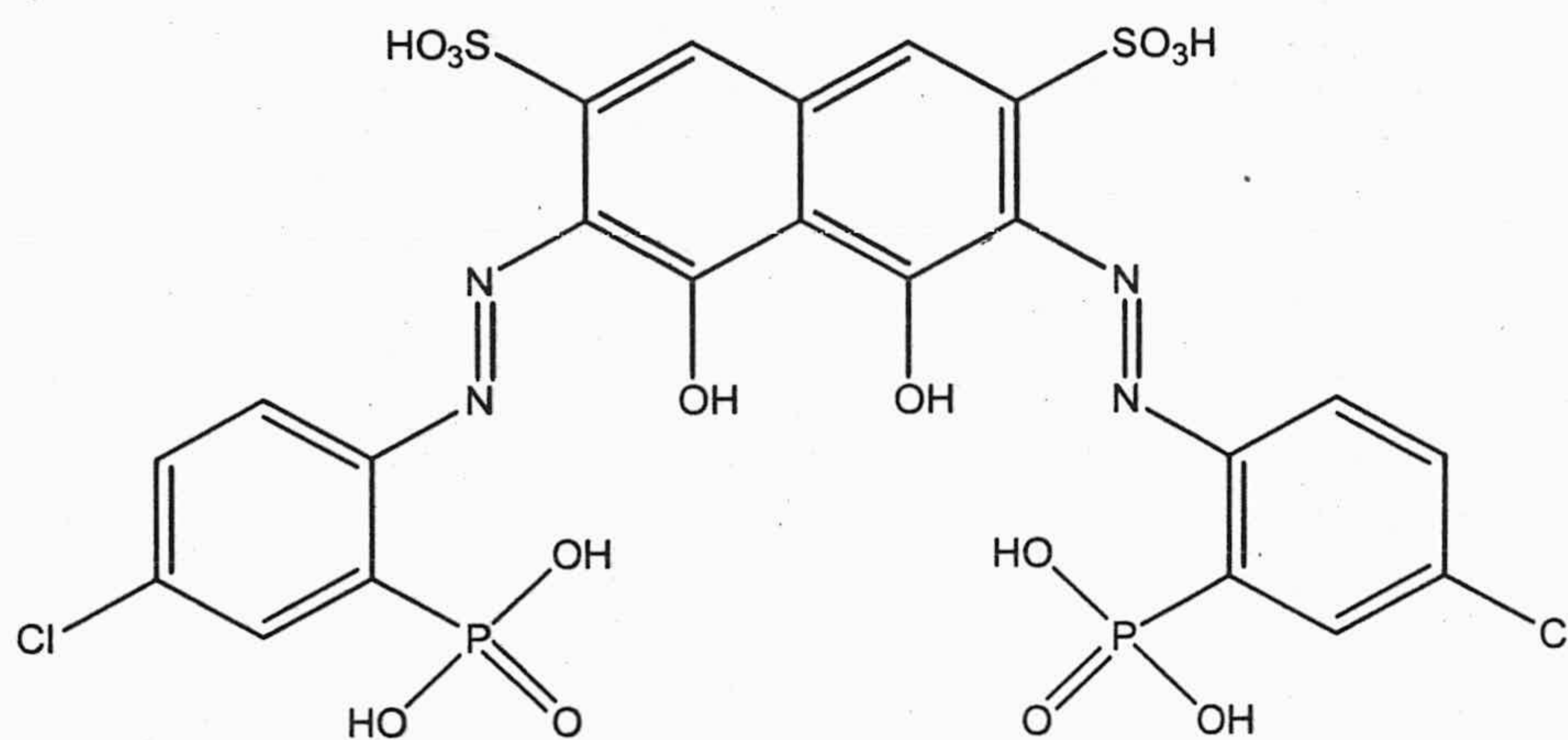


Figura 3.2. Estructura del CPA

³ Gómez, E., Tomas, C., Cladera A., Estela, J. M. y Cerdá, V., *Analyst*, 120, 1181 (1995).

⁴ Blasco, F., Medina Hernández, M.J., Sagrado S. y Fernández, F.M., *Analyst*, 122, 639 (1997).

⁵ Ruisanchez, I., Rius, A., Larrachi, M., Callao M. y Rius, F., *Chem. Intel. Lab. Sys.*, 24, 55 (1994).

⁶ Van Staden, J. y Taljaard, R., *Anal. Chim. Acta*, 323, 75 (1996).

⁷ Nyman J. y Ivaska A., *Talanta*, 40, 95 (1993).

⁸ Youxian Y., *Anal. Chim. Acta*, 42, 3 (1998).

⁹ Ferguson J.W., Richard J.J., O'Laughlin J.W. y Banks C., *Anal. Chem.*, 36, 796 (1964).

3.2. Selección de agente polimérico.

Se ensayaron diversos tipos de membranas, buscando que cumplieran la condición de permitir la retención del reactivo, la reacción con calcio, así como la fijación del complejo dentro de ella. Por esta razón, se probaron membranas tanto hidrófilas como hidrófobas, usando para ello diferentes agentes poliméricos para formar la matriz. Entre ellos usamos, acetato de polivinilo, cloruro de polivinilo (PVC)¹⁰, hidrogeles de tipo poliuretano como el hidrogel D4 y el hidrogel D6, etilvinilacetato¹¹ y elastosil E4¹².

Las pruebas preliminares realizadas con estos materiales, mediante la formación de membranas conteniendo el reactivo cromogénico seleccionado y, en caso necesario, un plastificante y una sal lipofílica, nos llevaron a seleccionar PVC como matriz polimérica para la preparación de esta membrana. Para ello, se atendió tanto a las características que presentaba la membrana, como a la capacidad y velocidad de respuesta frente a calcio y potenciales iones interferentes, especialmente magnesio. Este polímero presenta las ventajas de sencillez de elaboración y manipulación de la membrana, además de bajo coste y robustez. El uso del hidrogel D4 también nos permite obtener una matriz adecuada, si bien la retención es más débil que la producida utilizando PVC. Por el contrario con el uso de materiales más hidrófilos como etilvinilacetato o elastosil, no se formaba una matriz con las características, deseadas ya que no retenían el complejo en el sensor y en el caso del acetato de polivinilo se produce una membrana tan opaca tal que no pudo usarse.

3.3. Selección de agente plastificante.

La elección de PVC como polímero formador de matriz exige, como hemos visto en la Introducción, el empleo de un disolvente de membrana o plastificante para asegurar la movilidad y/o permeabilidad del analito a través de dicha matriz. Para establecer cual es el

¹⁰ Spichiger-Keller, U.E., Freiner, D., Bakker, E., Rosatzin, T. y Simon, W., *Sens. Actuators B*, 11, 263 (1993)

¹¹ Buhlmann, P., Prestsch, E. y Bakker, E., *Chem. Rev.*, 98, 1593 (1998)

¹² Werner, T., Klimat, I. y Wolfbeis, O., *Analyst*, 120, 1627 (1995)

plastificante más adecuado se preseleccionaron cinco que cubren un rango de polaridades muy amplio y diferente composición que va desde éteres (2-nitrofeniloctiléter (NPOE)), a ésteres de ácidos carboxílicos (bis(2-etilhexil)sebacato (DOS), dioctilftalato (DOP)) y ésteres del ácido fosfórico (tributilfosfato (TBP), tris(2-etilhexil)fosfato (TEHP)).

Para elegir el más adecuado, se prepararon membranas sensoras utilizando cócteles con cada uno de los plastificantes mencionados y se pusieron en contacto con una disolución de calcio al objeto de comprobar la respuesta. Estos cócteles se prepararon con 50,0 mg de PVC, 1,74 mg de cloruro de tridodecilmetilamonio como sal lipofílica, 1,0 mg de CPA y 160,0 mg de cada plastificante, todo ello disuelto en 2,0 ml de tetrahidrofurano. Tomamos 20 μ l de cada cóctel así preparado, que se depositaron sobre una tira de poliéster en la forma ya descrita. Tras dejar secar, se puso en contacto cada membrana en una cubeta de vidrio de 10 mm de paso óptico con una disolución que contenía 10 mg l⁻¹ de calcio a pH 4.0. Para cada membrana se registró a absorbancia a 659 nm durante 60 minutos.

Se obtuvieron los mejores resultados usando con TBP como plastificante, siendo el orden de respuesta: TBP>>TEHP>NPOE>>>DOS≈DOP, encontrando una respuesta relativa con respecto a TBP, del 73 % para TEHP, 70% para NPOE, 66% para DOS y 65 % para DOP. Por ello, se seleccionó TBP como plastificante.

3.4. Selección de agente formador de pares iónicos.

El CPA (III) se comporta de forma adecuada en cuanto a selectividad y estabilidad se refiere, pero presenta un problema debido a la presencia en la molécula de dos grupos sulfónicos y, en menor grado, la de dos grupos fosfónicos. Ello les confiere solubilidad en agua, necesaria para su aplicación como reactivo espectrofotométrico de alcalinotérreos y de algunas tierras raras, como uranio, pero les niega solubilidad en disolventes orgánicos o en membranas hidrófobas como es el caso del PVC. En consecuencia, hay que buscar algún sistema que permita lipofilizar la molécula de clorofosfonazo para permitir la preparación de la membrana y minimizar la lixiviación.

Se pensó en un primer momento, en la síntesis de la molécula de clorofosfonazo sin los dos grupos sulfónicos e incluso en incrementar la lipofilidad del reactivo sustituyendo esos grupos por grupos alquílicos lineales de entre 10 y 20 átomos de carbono. Sin embargo, la muy considerable dificultad de la síntesis nos llevó a abandonar esta vía. Como sistema alternativo para conseguir la lipofilización de reactivo, se ensayó la formación de pares iónicos con cationes lipofílicos voluminosos. Para ello necesitábamos de una molécula que cumpliera una serie de condiciones: 1) tener carga positiva; 2) tener carácter lipofílico; 3) ser capaz de formar un par iónico fuerte y estable con los grupos sulfónicos de la molécula de reactivo y 4) que no afecte a las restantes partes de la molécula de CPA, de modo que no altere la zona de la molécula donde se produce la formación del quelato con el metal.

Para ello, se seleccionaron y probaron diferentes sales de amonio cuaternario como agentes formadores de pares iónicos, tales como bromuro de tetrakis(decil)amonio (TDAB), cloruro de tridodecilmetilamonio (TDMAC) y cloruro de tricapril metilamonio (Aliquat 336[®]). Así pues, se prepararon cuatro cócteles diferentes que incluían todos los reactivos necesarios y cada una de las sales de amonio cuaternario indicadas, excepto el último que no llevaba catión lipofílico. Estos cócteles contenían 50,0 mg de PVC, 1,0 mg de CPA, y 16,0 mg del plastificante TBP y la cantidad necesaria de sal lipofílica que hiciesen su relación molar respecto a CPA 2:1, pues la molécula de CPA presenta dos grupos sulfónicos, todo ello disuelto en 2,0 ml de tetrahidrofurano.

Con cada uno de esos cócteles se prepararon dos sensores, de los que uno de ellos se introdujo en un blanco, mientras que el otro se situó en una disolución de 10 mg l⁻¹ de calcio. Se observó que de la primera membrana, que no contenía sal de amonio cuaternario, ocurrió la lixiviación de un producto de color azul, que es el complejo CPA-Ca, lo cual pudo ocurrir, bien porque que lixiviasse CPA y al entrar en contacto con el Ca²⁺ en disolución se formase el quelato de color azul o bien porque se formase dicho quelato en el interior de la membrana sensora y, al no ser retenido eficazmente en ella, se transfiriese a la fase acuosa.

Con el segundo cóctel preparado con Aliquat 336 no se observó lixiviación alguna a partir de la membrana, pero solo se percibió una ligera señal analítica transcurridos 60 minutos. Con el tercero, que contenía TDMAC se observó señal analítica significativa a

partir de los 10 primeros minutos sin que ocurriera lixiviación. Con el cuarto cóctel, al igual que el anterior tampoco se observó lixiviación, pero la respuesta es más lenta que el caso previo. A la vista de estos resultados, se eligió TDMAC como reactivo para formar par iónico con CPA (III) y permitir su retención en membrana y evitar la lixiviación de los complejos formados.

4. Optimización de la respuesta de la tira reactiva

A continuación, se detallan los experimentos realizados para establecer la influencia de los distintos factores que afectan a la respuesta de la tira reactiva, así como los valores que originan los mejores resultados.

4.1. Variables que afectan a la composición del cóctel

La optimización de la composición del cóctel se realizó en varias fases y siguiendo diferentes estrategias. En primer lugar, se estudió un parámetro, como es la cantidad de plastificante, mediante un estudio de la cinética del proceso de complejación en membrana. Posteriormente se abordó de forma individual, la influencia de la cantidad de disolvente usado para la preparación del cóctel y, por último, la influencia de las proporciones de PVC, CPA (III) y TDMAC mediante una optimización multifactorial.

4.1.1. Influencia del porcentaje de plastificante

La estrategia seguida para optimizar la proporción de plastificante en la membrana consistió en estudiar su influencia en el tiempo de respuesta al analito, pues el papel del plastificante es el de actuar como disolvente de membrana. Con el objetivo de seleccionar una cantidad adecuada de plastificante, que como vimos es el TBP, se prepararon un conjunto de cócteles conteniendo cantidades crecientes que iban desde el 30% al 85 % respecto de los demás componentes de la zona activa del sensor, es decir, sin tener en cuenta la cantidad de disolvente, ya que este se elimina completamente por evaporación. Estos

cócteles se prepararon con 50,0 mg de PVC, 1,74 mg de la sal lipofílica TDMAC, 1,0 mg de CPA y cantidad variable de TBP, todo ello disuelto en 2,0 ml de tetrahidrofurano. Tras preparar las membranas, se pusieron en contacto con una disolución de 10 mg l^{-1} de Ca(II) , midiendo periódicamente la absorbancia.

Como variable respuesta se utilizó la variación de absorbancia con el tiempo, a la longitud de onda antes seleccionada. En la Figura 3.3 se observa que la señal aumenta conforme aumenta la cantidad de plastificante. Por otra parte, las características físicas de las membranas también mejoran de forma substancial hasta llegar a un 70% de TBP. A concentraciones superiores a este valor se originan membranas menos homogéneas y se incrementa el tiempo de secado de las mismas, hasta llegar al 85% donde la densidad, viscosidad y tiempo de secado de la membrana hacen prácticamente inviable la utilización de las mismas. Por todo ello, se seleccionó un 70% de plastificante TBP como valor óptimo para la preparación de las membranas.

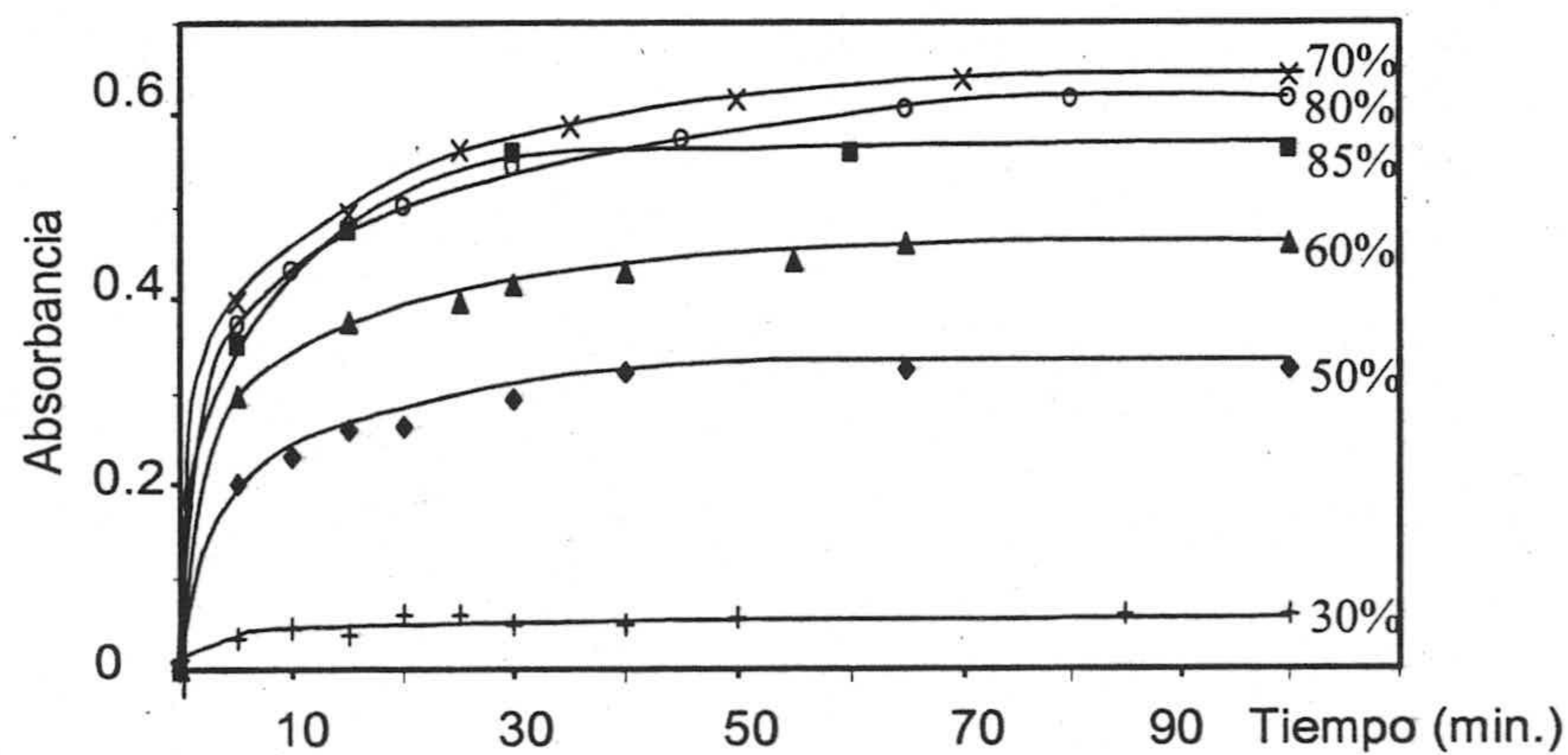


Figura 3.3. Tiempo de respuesta en función del porcentaje de plastificante

4.1.2. Influencia del volumen de tetrahidrofurano

El THF actúa como disolvente de los componentes de la membrana y permite su preparación por evaporación. La cantidad de disolvente empleado tiene relación con la concentración de los componentes en el cóctel y dado que el volumen depositado para la preparación de la membrana no puede ser muy alto, también tiene relación con la cantidad de componentes en la membrana y con su espesor. Así mismo, modifica la viscosidad del cóctel y, como la membrana se prepara en un sistema centrífugo, influirá sobre sus dimensiones y características físicas.

La cantidad de disolvente seleccionada fue de 2,0 ml. Cantidades superiores disminuyen la viscosidad del cóctel, afectando negativamente al espesor final de la zona activa y originan, por tanto, una disminución de la señal analítica. Cantidades inferiores aumentan la viscosidad dificultando la preparación del cóctel y reduciendo la homogeneidad de los sensores, lo que influye sobre la reproducibilidad de las medidas.

4.1.3. Polímero de membrana, reactivo complejante y sal lipofílica

Mediante una serie de estudios preliminares se comprobó que existía una interrelación entre las proporciones de polímero de membrana, sal lipofílica y agente complejante. Por ello, se realizó la optimización de sus proporciones mediante un procedimiento multifactorial.

Para optimizar la proporción de agente quelante –Clorofosfonazo III-, sal lipofílica -cloruro de tridodecilmetilamonio- y polímero de membrana –cloruro de polivinilo- se propuso el empleo de un diseño Centroide Simplex¹³, habida cuenta de la interrelación que existe entre los tres como acabamos de comentar. Se seleccionó este tipo de diseño ya que

¹³ Schffé H. J.R. Stat. Soc., B25, 2, 235, (1963).

está especialmente indicado en casos donde tenemos tres componentes relacionados directamente entre sí, como es nuestro caso.

En este tipo de diseños los experimentos a realizar se configuran de la forma que nos muestra la Figura 3.4. En él se supone que la suma porcentual de los tres reactivos implicados es el 100%¹⁴. Como vimos en un apartado anterior, el plastificante TBP se ajustó a un 70% del total; eso significa que el 30% restante está compuesto por PVC, TDMAC y CPA. Por lo tanto se habrán de acotar los niveles del diseño mezcla de forma que la suma de los factores siempre sea igual al 30%.

El dominio donde se llevan a cabo los experimentos es un triángulo equilátero -diagrama triangular- donde cada uno de los vértices representa un 100% de uno de los reactivos, los lados representan mezclas binarias y, además, tenemos el punto central.

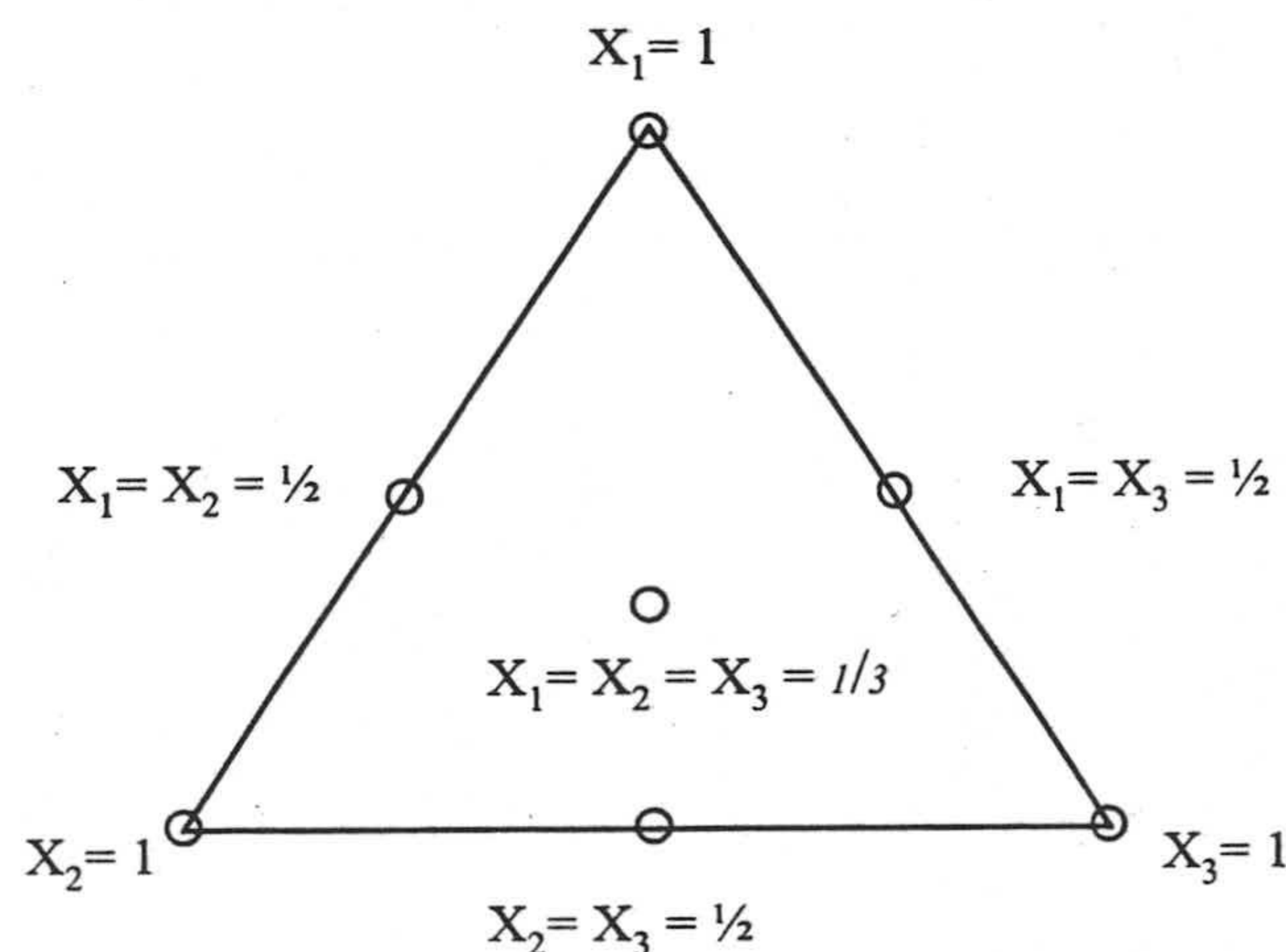


Figura 3.4. Disposición de puntos experimentales en el diseño mezcla Centroide Simplex de 3 componentes.

¹⁴ Lundstedt T., Seifert E., Abrano L., Thelin B., Nyström A., Pettersen J. y Bergman R., Chem. Intellig. Lab. Syst., 3, 42, (1998).

Los valores inferiores y superiores de cada factor fueron seleccionados mediante una serie de pruebas preliminares y al comportamiento teórico esperado de las moléculas involucradas. Por ello, se parte de una relación molar CPA: TDMAC 1:2

Tabla 3.1. Valores correspondientes a los vértices del diseño

Componente	Valor Inferior	Valor Superior
PVC	27,40 %	28,49 %
CPA	0,15 %	1,24 %
TDMAC	0,60 %	1,69 %

En la Tabla 3.2 podemos ver el valor que toman los diferentes niveles de cada factor. El número total de puntos experimentales del diseño es de $2^K - 1$ y teniendo en cuenta que $K=3$ en nuestro caso, obtenemos un número total de puntos experimentales de 7, que al introducir tres réplicas del punto central nos da un total de 9 experimentos. En la Figura 3.4 se muestra la disposición de los puntos experimentales en el diseño utilizado. La variable respuesta utilizada es la absorbancia neta A_N de la tira reactiva medida a 659 nm,

Tabla 3.2. Valor que toman los niveles sin codificar de los factores a optimizar

Nº	% PVC	% CPA	% TDMAC
1	28,49	0,15	0,60
2	27,40	1,24	0,60
3	27,40	0,15	1,69
4	27,94	0,695	0,60
5	27,94	0,15	1,14
6	27,40	0,69	1,14
7	27,76	0,51	0,96
8	27,76	0,51	0,96

9	27,76	0,51	0,96
---	-------	------	------

Después de realizar varios diseños para localizar la zona de máxima respuesta se realizó un experimento cuyos resultados se muestran en las Figuras 3.5 y 3.6 como una superficie respuesta en 2 y 3 dimensiones, respectivamente, y en la que se observa la presencia de un máximo. La ecuación que ajusta los datos experimentales es:

$$A_N = 0,48153 [\text{PVC}] + 0,136534 [\text{CPA}] + 0,267644 [\text{TDMAC}] + 0,729282 [\text{PVC}] [\text{CPA}] - 0,057194 [\text{PVC}] [\text{TDMAC}] + 1,51512 [\text{CPA}] [\text{TDMAC}] + 8,6168 [\text{PVC}] [\text{CPA}] [\text{TDMAC}]$$

donde A_N es la absorbancia neta y [PVC], [CPA] y [TDMAC] son las concentraciones en mg l^{-1} .

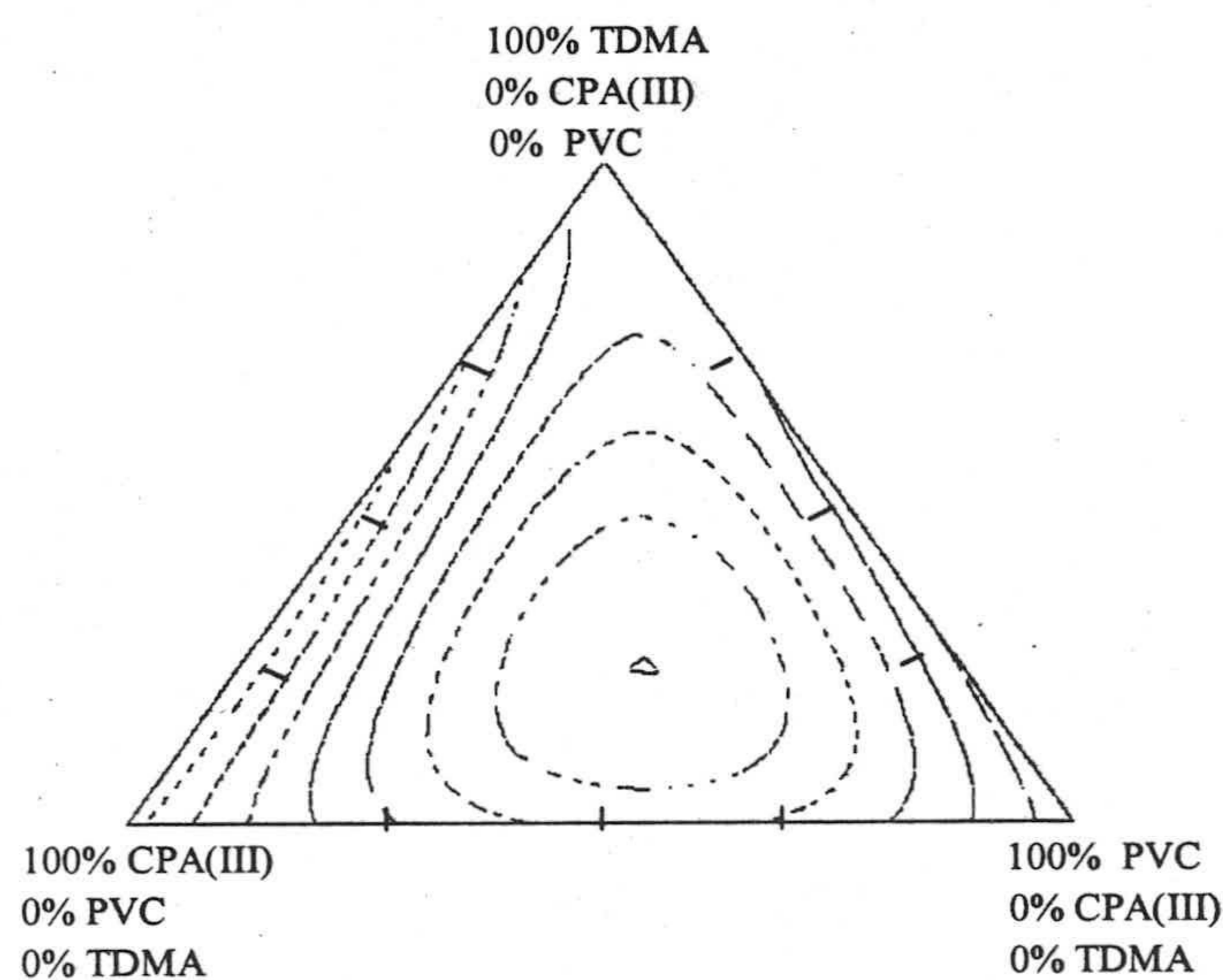


Figura 3.5. Representación bidimensional de los resultados del diseño usado.

Este modelo ajustó los datos experimentales adecuadamente, pues presenta un coeficiente R^2 de 0,9889 y cumple las suposiciones matemáticas de normalidad y homocedasticidad cuando se aplica el modelo. El análisis de la varianza indica que hay tres

términos de interacción significativos, pues $P < 5\%$. Estos son [PVC] [CPA], [CPA] [TDMAC] y [PVC] [CPA] [TDMAC].

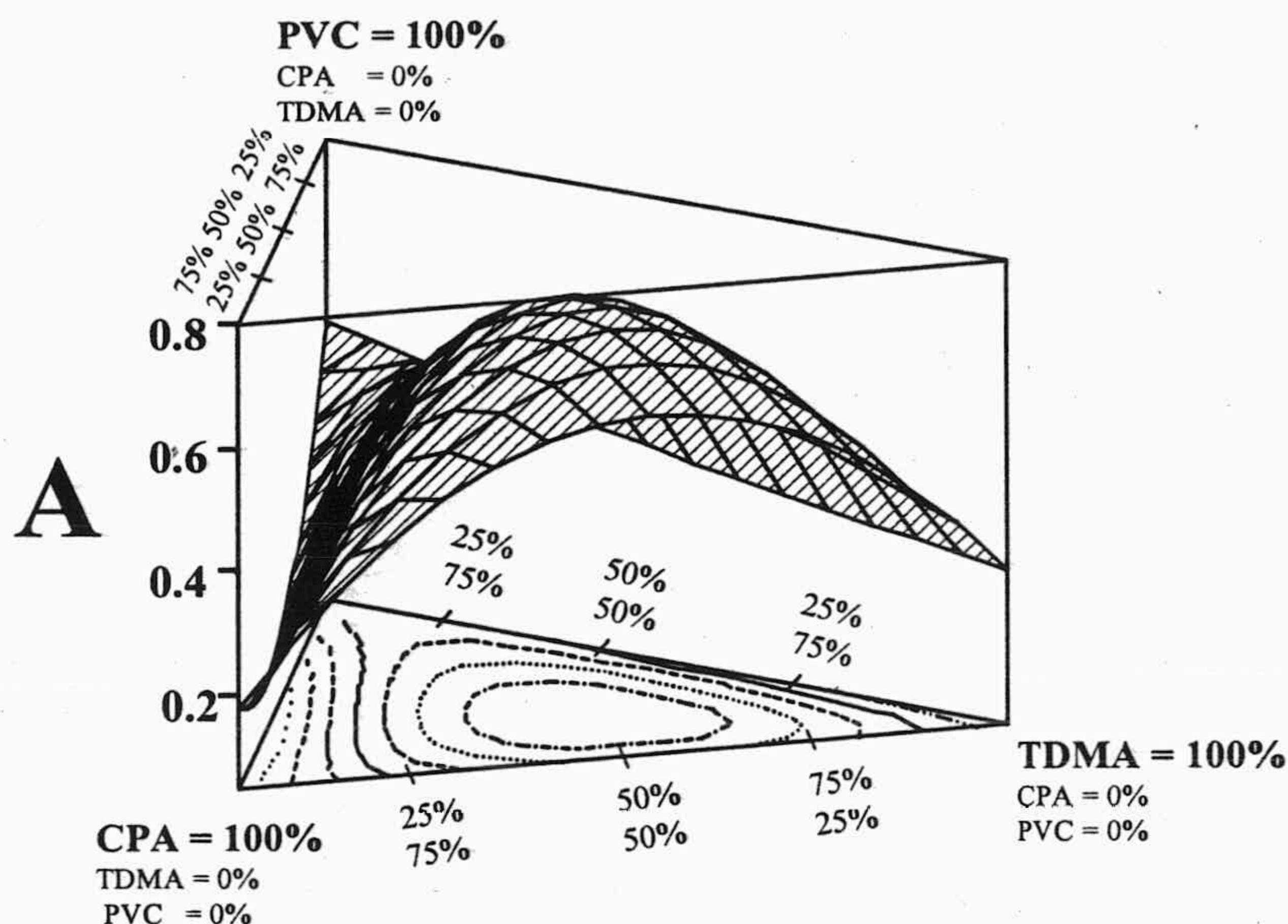


Figura 3.6. Representación tridimensional de los resultados del diseño usado.

La aplicación del criterio de Lagrange permite la localización del máximo en la posición 50,19 mg de PVC, 1,33 mg de CPA ($1,756 \cdot 10^{-6}$ mol) y 2,27 mg de TDMAC ($3,444 \cdot 10^{-6}$ mol).

Una interesante conclusión que se desprende de los resultados obtenidos es que la relación molar óptima entre TDMAC y CPA, según el modelo deducido, es 2:1, lo que queda perfectamente justificado por la presencia de dos grupos sulfónicos en el clorofosfonazo, por lo que se necesitan dos moles de sal de amonio cuaternario TDMAC para formar el par iónico.

4.2. Variables que afectan a la preparación de la membrana

Existen otros parámetros a optimizar que se refieren a la propia construcción de la membrana sensora con el cóctel, entre los cuales distinguimos: volumen de cóctel, velocidad de rotación del sistema centrífugo de preparación de membranas y tiempo de secado. Estos parámetros fueron estudiados tal y como se describe a continuación.

4.2.1. Volumen de cóctel

Variando el volumen de cóctel depositado sobre la lámina soporte con ayuda del sistema centrífugo de preparación de membranas, podemos hacer variar el tamaño de la zona activa tanto en espesor como en diámetro. Se han estudiado sensores preparados con un volumen de cóctel que va desde 2,5 a 25 μl . Volúmenes inferiores a 10 μl no deben usarse pues el diámetro de la zona sensora es inferior a haz de radiación del espectrofotómetro, originando errores en la lectura. Volúmenes comprendidos entre 10 y 25 μl conducen a valores de absorbancia prácticamente constantes, aunque conforme mayor es el volumen, lógicamente mayor es el tamaño de gota y estas presentan una mayor homogeneidad. Se selecciona un volumen de 15 μl pues conduce a un menor consumo de cóctel y a una buena respuesta. Por último, volúmenes superiores a 25 μl desbordan el ancho del soporte plástico, por lo que no se pueden usar.

4.2.2. Velocidad de rotación

Al igual que el volumen de cóctel, la velocidad de rotación del sistema centrífugo de preparación de membranas afecta al diámetro de la zona activa pero afecta de modo diferente al espesor, ya que para un mismo volumen de cóctel, un aumento en la velocidad de rotación supone un aumento en la fuerza centrífuga que hace aumentar el diámetro de la zona activa y disminuir el espesor de la misma.¹⁵ Esta variable no afecta solo a la señal analítica sino que

¹⁵ Sëller K. y Simon W., Anal. Chim. Acta, 266, 73 (1992).

afecta también a la homogeneidad de la zona activa, característica de vital importancia para obtener una reproducibilidad aceptable. La velocidad de giro utilizada fue de 170 r.p.m.

4.2.3. Evaporación de disolvente

La forma de evaporación del disolvente THF se ha estudiado cuidadosamente debido a la influencia que tiene en la homogeneidad de la zona activa. Por ello, se han utilizado diversas alternativas como son: evaporación en el sistema centrífugo mientras el sensor se encuentra girando; evaporación con el sensor parado dentro del sistema centrífugo; evaporación por aplicación de una corriente de aire caliente; evaporación con el sensor introducido en un desecador a vacío tras depositar el cóctel y, por último, evaporación con el sensor introducido en un recipiente herméticamente cerrado en presencia de una atmósfera saturada en tetrahidrofurano.

En realidad, todos estos sistemas son diferentes formas de modificar la velocidad de evaporación. Sin embargo, no se ha encontrado una relación clara de esta velocidad de evaporación con la homogeneidad, medida como reproducibilidad de la medida de la señal analítica para 10 réplicas distintas. Así pues, mientras que para unas membranas se obtenía mejor reproducibilidad evaporando de forma rápida el disolvente en un desecador a vacío, para otros, por el contrario, era necesario una evaporación lenta en una atmósfera saturada en vapores del disolvente. Se optó finalmente por evaporar mediante secado a vacío durante tres minutos, pues originó, en general, los mejores resultados.

Preparación de la membrana.

Como consecuencia del anterior estudio se propone la siguiente receta operatoria para la preparación de tiras reactivas sensibles a calcio. El cóctel se obtiene pesando 50,19 mg (27,7 % p/p) de cloruro de polivinilo, 1,33 mg (0,73 % p/p) de clorofosfonazo III, 2,27 mg (1,25 % p/p) de cloruro de tridodecilmetilamonio y 127,6 mg (70,34 % p/p) de tributilfosfato en un vial de vidrio y disolviendo todos los componentes en 2,0 ml de tetrahidrofurano. Mediante un sistema centrífugo y una micropipeta, se depositan 15 μ L del cóctel sobre una lámina de poliéster de 14 mm x 4 cm x 0,5. Después de treinta segundos, se detiene la

rotación y se deja la membrana en un desecador a vacío durante tres minutos a temperatura ambiente. Las características físicas del sensor fueron las siguientes: película circular sólida y homogénea, transparente y de color violeta, bien adherido al soporte sólido y con unas dimensiones de 6 mm de diámetro y 25 μm de espesor. La concentración de clorofosfonazo y TDMAC en la película delgada y seca se calculó que era de 9,68 mmol kg^{-1} . y 18,96 mmol kg^{-1} , respectivamente.

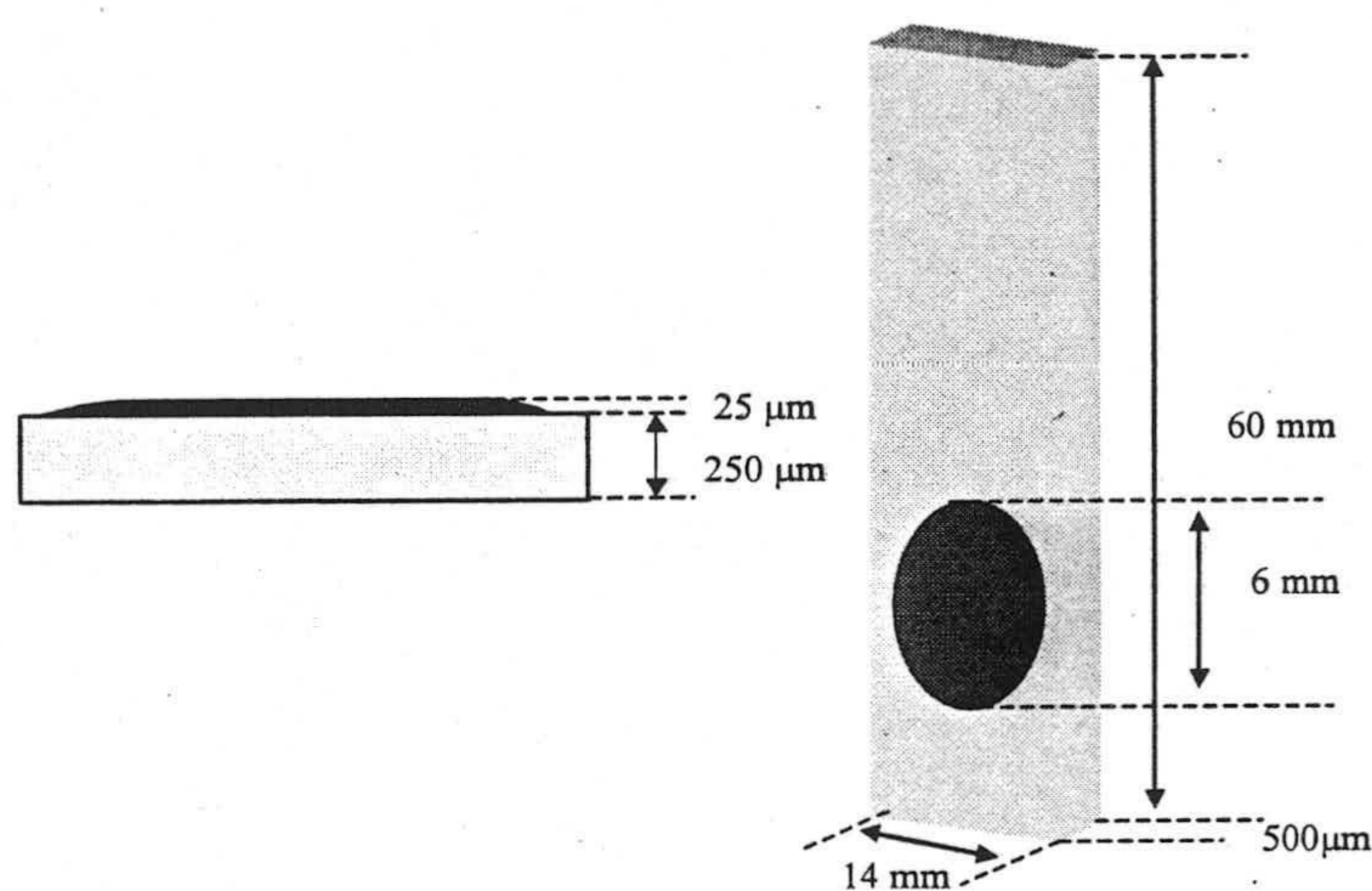


Figura 3.7. Dimensiones de la tira reactiva para Ca (II) basada en el agente cromogénico convencional CPA

4.3. Parámetros relacionados con el proceso de equilibración

En presencia de calcio, la membrana preparada como se acaba de indicar, cambia su color de violeta a azul debido a la formación de un complejo. En disolución se ha propuesto para este complejo tanto una estequiometría 1:1 por parte de Ferguson *et al.*⁹ como 2:1 por Budesninsky *et al.*¹⁶. Con los datos que poseemos, no estamos en condiciones de indicar cual

¹⁶ Budesninsky, B., Haas, K. y Bazdekova, A., Collection Czech. Chem. Commun., 32, 528 (1967).

es la estequiometría del complejo formado en la membrana. Sin embargo, suponemos que es neutro y que el mecanismo de actuación es mediante el intercambio iónico de un mol de calcio por dos moles de protones provenientes del CPA que está en la membrana retenido como par iónico. Sin embargo, la estequiometría puede ser 1:1 o 1:2, pues es posible que el clorofosfonazo actúe como un ligando tridentado utilizando media molécula, es decir, un grupo OH del ácido cromotrópico, un nitrógeno del grupo azo y un grupo fosfónico y en ambos casos se liberarían dos moles de protones por cada mol de calcio que se retenga.

La retención de calcio en la membrana es irreversible debido a su alta constante de complejación, lo que restringe el empleo del sensor a una sola vez.

Los parámetros que influyen sobre el proceso de equilibración entre la muestra conteniendo analito y la tira reactiva son pH, fuerza iónica, tiempo de contacto y actividad en calcio.

4.3.1. Influencia del pH y fuerza iónica

La influencia del pH sobre la respuesta del sensor fue evaluada usando diferentes sensores con disoluciones que contenían 10 mg l^{-1} de calcio a diferentes valores de pH comprendidos entre 4 y 8. En cada caso se midió frente a correspondientes blancos, esto es, con sensores introducidos en disoluciones al mismo pH pero sin calcio. En la Figura 3.8 se muestra que para pH comprendidos entre 4 y 7 y en ausencia de calcio, la respuesta es constante. A valores de pH superiores a 7 se observó una lixiviación de CPA de la membrana.

En presencia de calcio, se observó respuesta máxima a pH 5,5 decreciendo la absorbancia de la membrana al aumentar el pH. Esta disminución de la absorbancia del complejo a valores de pH superiores a 6 probablemente está relacionada con la desprotonación de los grupos ácidos del CPA¹⁶ y, por tanto, con la adquisición de carga negativa por parte del complejo de calcio neutro formado en la membrana. Para valores de pH superiores a 7, se observa una lixiviación perceptible del complejo desde la membrana a

la disolución, lo que hace que disminuya notoriamente la reproducibilidad y la señal analítica.

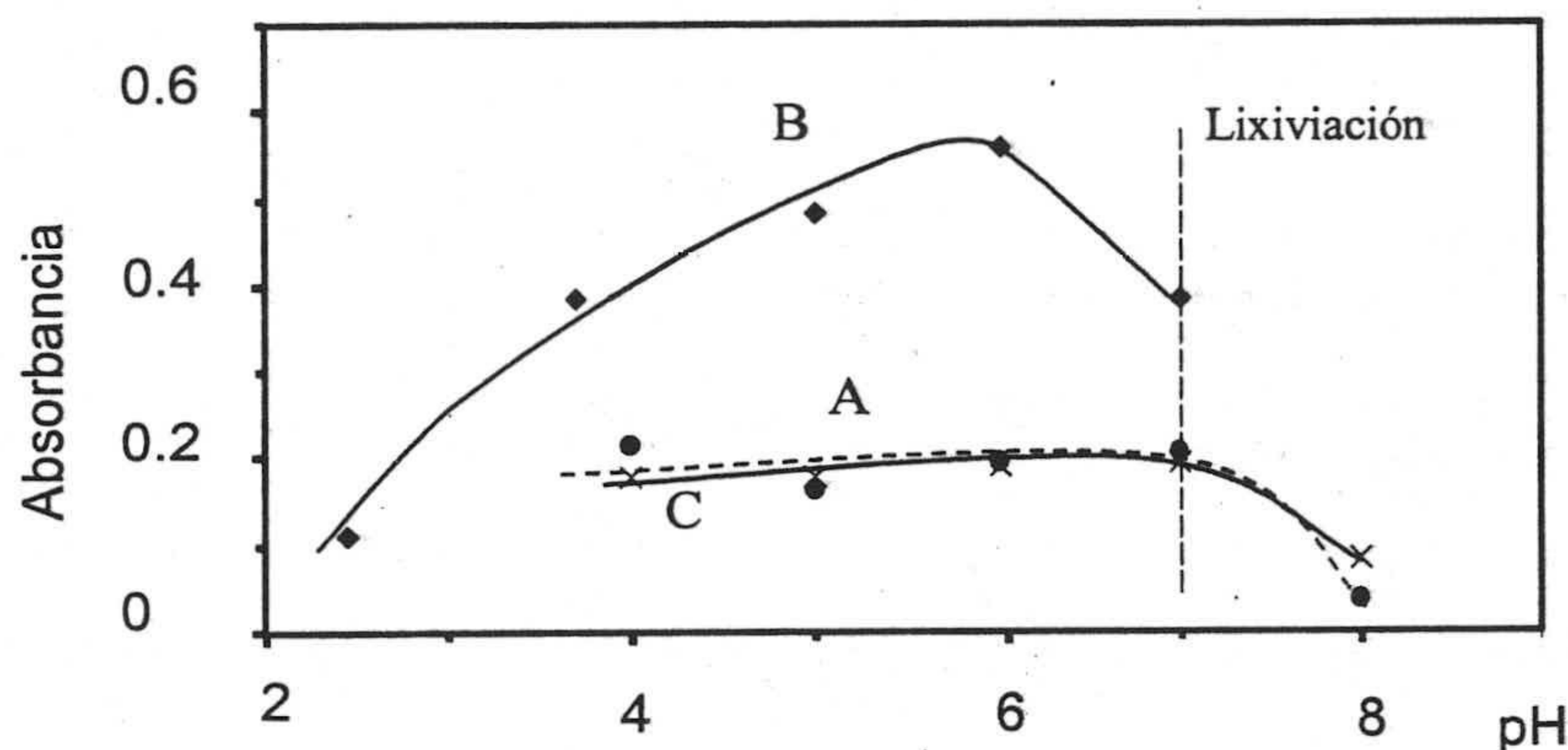


Figura 3.8. Efecto del pH ajustado con HCl y NaOH sobre la respuesta del sensor. A: blanco; B: con 10 mg l⁻¹ de calcio; C: con 10 mg l⁻¹ de magnesio.

El comportamiento observado en el sensor difiere notoriamente del comportamiento del CPA en disolución, donde se observa una señal analítica máxima a pH 7⁹. Puede explicarse este comportamiento por la protonación de los grupos sulfónicos mediante los que el CPA se encuentra unido a la sal de amonio cuaternario formando un par iónico, que al romperse y quedar libre el CPA, se solubiliza parcialmente en el medio acuoso, esto es, lixivia.

Para el ajuste de pH a 5,5 se selecciona la disolución reguladora ácido acético/acetato sódico. Se observa que cuando la concentración de disolución reguladora es mayor de 5x10⁻² M hay lixiviación del complejo de calcio desde la membrana. Por tanto, en los siguientes experimentos, se usó para el ajuste de pH una disolución reguladora ácido acético/acetato sódico de pH 5,5 de concentración 5x10⁻² M.

La influencia de la fuerza iónica fue estudiada mediante la adición de cantidades crecientes de NaCl observándose, como muestra la Figura 3.9, dos zonas bien diferenciadas. A bajas concentraciones de NaCl la absorbancia decrece linealmente con dicha

concentración debido a la competencia de los iones cloruro con los grupos sulfónicos que retienen el complejo clorofosfonazo-calcio, lo que conduce a la lixiviación al medio acuoso. A partir de una concentración 0,2 M la respuesta se hace independiente de la fuerza iónica y el espectro de la membrana sensora cambia haciéndose más ancho.

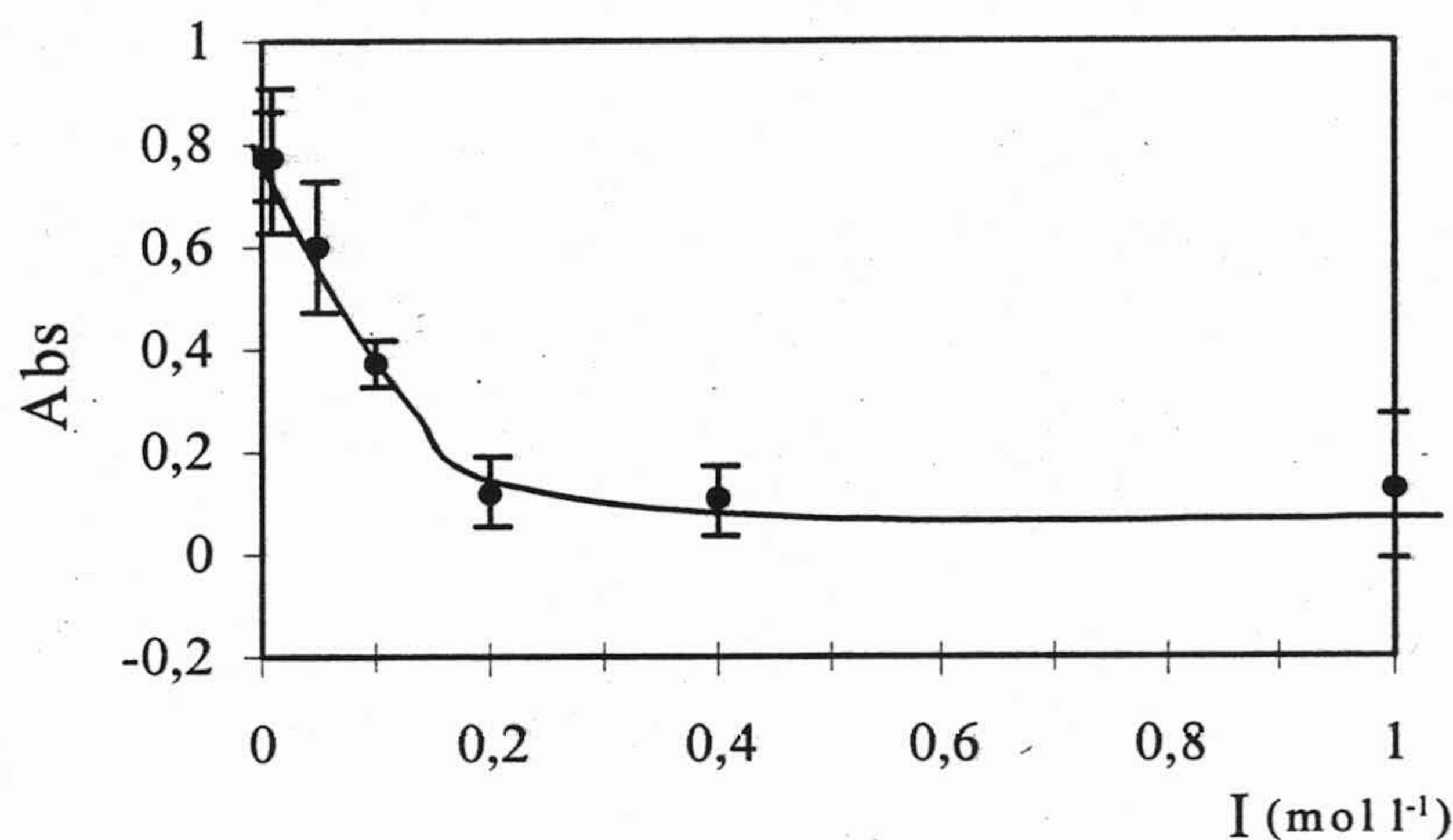


Figura 3.9. Influencia de la fuerza iónica sobre la respuesta de la membrana.

4.3.2. Tiempo de equilibración.

Para establecer el tiempo necesario que debe estar la tira reactiva puesta en contacto con la disolución problema, se estudió usando diferentes concentraciones de calcio que variaron desde 0,1 a 12,0 mg.l⁻¹. Para realizar el experimento, se situó el sensor correspondiente en un lado de una cubeta de vidrio de 10 mm de paso óptico y se añadieron 5 ml de Ca(II) de la concentración adecuada, registrando la variación de absorbancia con el tiempo sin agitar la disolución. En la Figura 3.10 se observa, como era de esperar, que la velocidad aumenta con la concentración de calcio. Por otra parte, un aumento en el tiempo de reacción conduce a un aumento de señal, lo que implica que si se aumenta el tiempo de contacto, se podrían determinar menores concentraciones de calcio. Se seleccionan 15 minutos como un tiempo de compromiso adecuado, pues como el incremento de señal no es lineal, un aumento por encima de ese tiempo no supone mucha ganancia de señal y es el suficiente para haber alcanzado un desplazamiento del considerable equilibrio.

Si la disolución se agita mientras se produce la equilibración, se observa una pequeña lixiviación, por lo que se propone no agitar durante la equilibración con el problema.

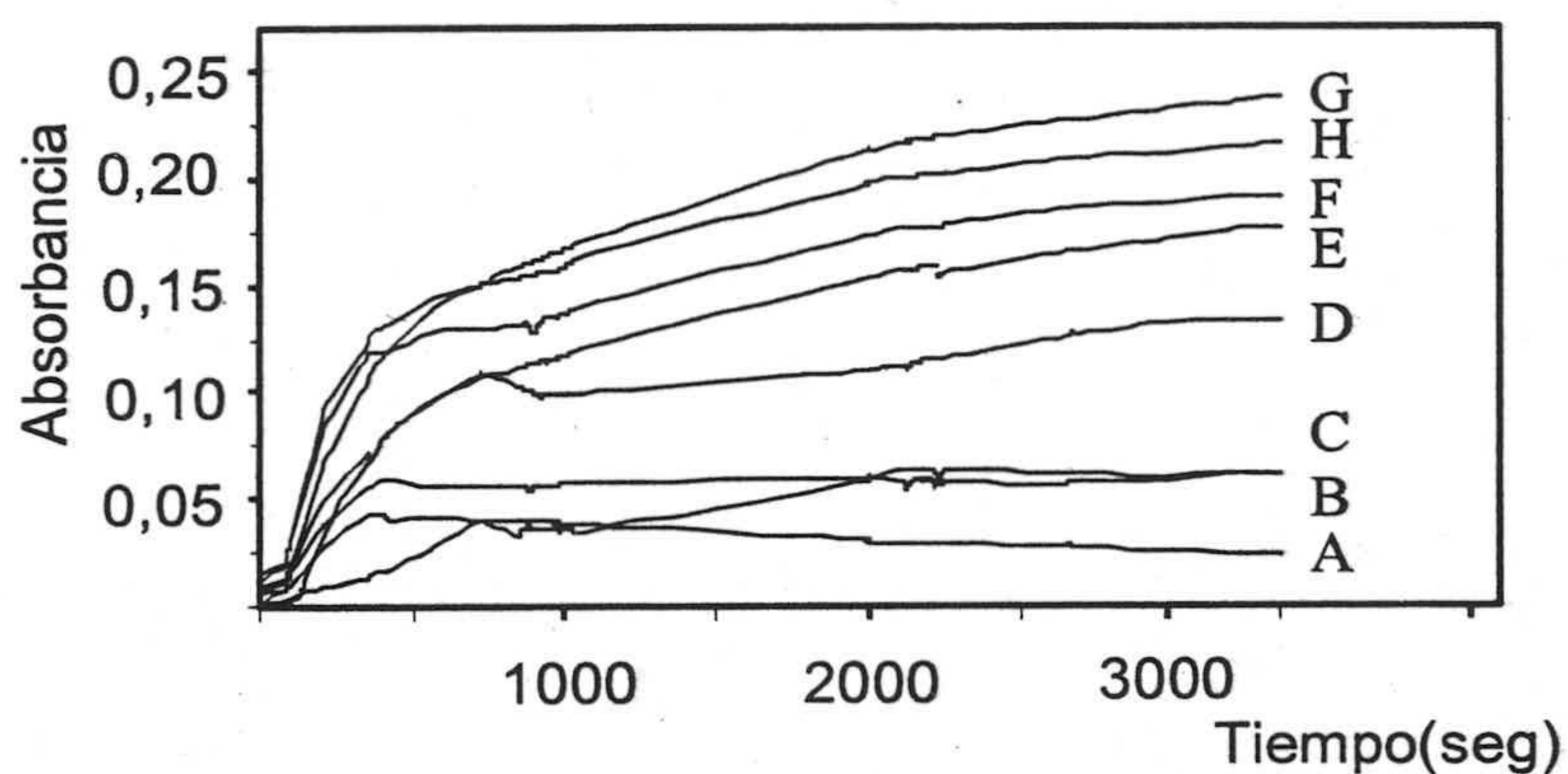


Figura 3.10. Influencia del tiempo de contacto sobre la respuesta del sensor para diferentes concentraciones de calcio: A) Blanco; B) 0,2 mg l⁻¹; C) 0,5 mg l⁻¹; D) 1,0 mg l⁻¹; E) 3,0 mg l⁻¹; F) 7,0 mg l⁻¹; G) 8,0 mg l⁻¹; H) 12,0 mg l⁻¹.

4.3.3. Volumen de muestra

Para estudiar la influencia sobre la señal del volumen de muestra que se pone en contacto con el sensor, se estudian volúmenes comprendidos entre 5 y 500 ml de disolución de 10 mg l⁻¹ de Ca(II). Se observa un aumento de un 20% en la señal analítica cuando el volumen se incrementa de 5 a 10 ml. De 10 a 500 ml el incremento fue muy pequeño, del orden de un 2%. Por ello, se seleccionaron 10 ml como volumen de trabajo.

5. Parámetros Analíticos.

La función de calibrado se obtuvo mediante 10 patrones con tres réplicas de cada uno de ellos, que cubrían el rango de concentraciones comprendido entre 0,24 y 3,10 mg l⁻¹, comprobando la linealidad mediante la aplicación de un test de fallo de ajuste. El calibrado se realizó mediante tres réplicas por punto en cantidades crecientes regularmente repartidas a lo largo del rango dinámico lineal. En la tabla 3.3 podemos ver los valores obtenidos en el estudio de calibrado llevado a cabo.

La función lineal obtenida fue $A = 0,020 + 0,144 C$, donde A representa la absorbancia, expresada como diferencia entre la absorbancia de la muestra o patrón y la absorbancia del blanco a la misma longitud de onda, y C la concentración de calcio en la muestra o patrón expresada en mg l⁻¹ (Figura 3.11).

La precisión expresada con desviación estándar relativa (DER), fue obtenida a partir de diez patrones de 1,7 mg l⁻¹ de calcio con tres réplicas para cada uno y mostró un valor de 6,7%. Los límites de detección y cuantificación según la IUPAC, que se determinaron a partir de diez blancos fueron 0,2 mg l⁻¹ y 0,8 mg l⁻¹, respectivamente. La Tabla 3.4 muestra estos y otros parámetros analíticos.

La repetibilidad en la construcción de las membranas mediante el procedimiento propuesto se determinó con seis membranas diferentes y arrojó un valor de un 4,3 % como RSD, representando, como vemos, la principal contribución a la repetibilidad del método propuesto.

Tabla 3.3. Datos del calibrado para el sensor de calcio

Ca (mg l ⁻¹)	Abs	Ca (mg l ⁻¹)	Abs
0,15	-0,0406	2,4	0,3655
0,15	0,1020	2,4	0,4273
0,15	-0,0040	2,4	0,3512
0,3	0,0795	3,1	0,4165

0,3	0,0917	3,1	0,4271
1,0	0,1310	3,8	0,4066
1,0	0,1618	3,8	0,4656
1,0	0,1741	4,5	0,4082
1,7	0,2582	4,5	0,4041
1,7	0,3122	4,5	0,4226
1,7	0,2967	4,5	0,4082

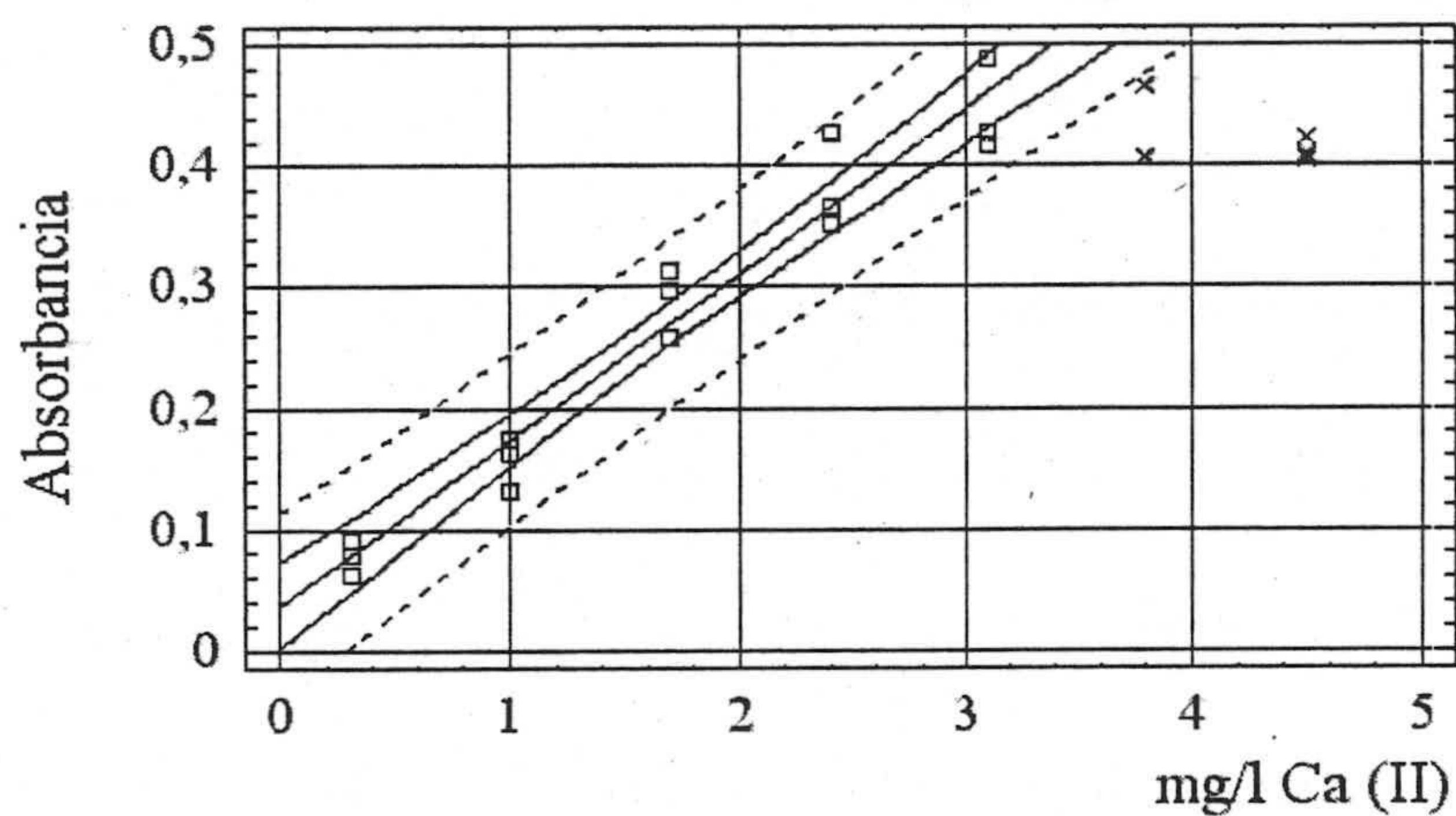


Figura 3.11. Representación gráfica de la función de calibrado obtenida.

Tabla 3.4. Parámetros Analíticos

Parámetro	Valor
Ordenada	0,02
Pendiente	0,14
P _{val.} (%)	46,0
Rango Lineal (mg l ⁻¹)	

Límite Detección (mg l^{-1})	0,2
Límite Cuantificación (mg l^{-1})	0,8
DER (%) ^a	6,37
Tiempo de respuesta	15 min
Tiempo de vida	1 mes

^a Desviación estándar relativa de diez patrones de Ca (II) de $1,7 \text{ mg l}^{-1}$

5.1. Selectividad

Para conocer la selectividad del sensor desarrollado para calcio frente a iones habitualmente presentes en aguas naturales o tratadas, se estudió de forma sistemática la respuesta frente a disoluciones de calcio de $1,7 \text{ mg l}^{-1}$ que contenían los iones más frecuentes en aguas. Para realizar dicho estudio se ensayaron diferentes concentraciones de especies potencialmente interferentes. Cuando se observó interferencia, se redujo la concentración de interferente hasta que el error en la determinación fue inferior al 6,7% en la señal analítica, pues por debajo de ese no es posible discernir si la variación en la señal analítica procede de la presencia de interferentes o de la propia reproducibilidad del sensor. Se tomó como nivel de tolerancia, la concentración máxima de interferente que origina un error $\leq 6,7 \%$.

En disolución, la mayor interferencia la origina magnesio, debido a que reacciona con CPA en un intervalo de pH muy estrecho originando un complejo que presenta el mismo color azul y una absorptividad molar muy similar⁹ ($64.000 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para calcio y $48.000 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para magnesio ambos a pH 7,0) y menor estabilidad¹⁶ ($\log K_{\text{eff}} 5,33$ para magnesio y $\log K_{\text{eff}} 10,80$ para calcio).

Observamos que el complejo de magnesio no se forma dentro del sensor a pH 5,5; sin embargo, cuando el pH se eleva a 7 o más, se forma el complejo de magnesio en disolución con el clorofosfonazo lixiviado desde la membrana. Posiblemente, este fenómeno se puede deber a que el complejo de magnesio está cargado, lo que no ocurre con el complejo de calcio, como antes se ha indicado. Como consecuencia, el nivel de interferencia de magnesio

en este método no es muy alto; en concreto, se permite un nivel de magnesio cuatro veces la concentración de calcio.

Tabla 3.5. Efecto de interferentes en la determinación de $1,7 \text{ mg l}^{-1}$ de calcio

Ion interferente	Tolerancia (mg l^{-1})
Mg (II)	6.7
Sr (II)	3.2
Ba (II)	>10.0
Fe (III)	>10.0
Zn (II)	5.9
NO_3^-	>10.0
SO_4^{2-}	>10.0
ClO^-	9.5
HCO_3^-	>10.0

La interferencia de estroncio es la más importante y proviene de la formación de un complejo con CPA, que es similar al que origina el bario. Sin embargo, el nivel habitual de ambos alcalinotérreos es menor que el de calcio (alrededor de 6.000-20.000 veces para bario y de 50-1.200 para estroncio en aguas naturales). Para el resto de los iones ensayados, se observan interferencias negativas pues disminuyen la señal analítica. En la Tabla 3.5 podemos ver los valores de tolerancia encontrados para los diferentes iones estudiados

5.2. Tiempo de vida.

Estudiamos el tiempo de vida de la tira sensora desarrollada ensayando periódicamente su capacidad de respuesta. Para ello, se preparó un conjunto de dichas tiras reactivas y se procedió del siguiente modo: cada tira se conservó en un tubo de plástico cerrado, alejado de la luz para evitar la fotodescomposición de los componentes de la membrana y evitar la posible humedad. Cada semana se ensayó con tres de ellas realizando un espectro previo y, a continuación, estableciendo su respuesta frente a una disolución de calcio $1,7 \text{ mg l}^{-1}$ de calcio. Tras el estudio, se pudo concluir que las tiras sensoras desarrolladas tienen una duración máxima de un mes, en las condiciones de conservación ensayadas, pues las desviaciones de la medida son inferiores a la reproducibilidad del método.

6. Procedimiento propuesto.

Se coloca una alícuota de una disolución patrón o problema conteniendo entre 0,8 y $3,1 \text{ mg l}^{-1}$ de calcio en una matraz de 50 ml y se le añaden 5 mL de una disolución reguladora de ácido acético/acetato sódico de pH 5,5 y concentración $5 \times 10^{-2} \text{ M}$. Se toman 10,0 mL de la anterior disolución que se introducen en un tubo de polietileno de $10 \times 1,5 \text{ cm}$ junto con el sensor desechable durante 15 minutos y sin agitación. A continuación, la membrana se saca de la disolución y se sacude para eliminar las gotas de disolución que la puedan mojar; tras lo cual se mide la absorbancia a 659 nm en la forma anteriormente descrita. De manera análoga se mide un blanco. La estimación de la concentración de calcio se realiza mediante calibrado según antes se ha dicho. Todas las medidas se realizan a temperatura ambiente. No es necesario acondicionar las membranas antes de su uso.

7. Aplicaciones y Validación

La aplicabilidad del método fue ensayada para diferentes tipos de aguas, tales como agua mineral, de abastecimiento urbano, de río y de mar. En la Tabla 3.6 podemos observar los resultados obtenidos empleando el procedimiento propuesto y el de referencia, que como se dijo en el Capítulo 2 es el de espectrofotometría de absorción atómica. Para cada muestra

se analizan cinco réplicas con las que se calculan los valores medios y la desviación estándar. En la tabla se incluye también el valor de probabilidad P_{val} . Como puede observarse el valor es para todos los casos superior al 5%, por lo que se concluye que ambos métodos originan resultados estadísticamente similares. En resumen, el método propuestos es válido para su aplicación en muestras de agua y origina resultados veraces.

Tabla 3.6. Determinación de calcio en diferentes tipos de agua usando AAS como método de referencia

Muestra	Sensor (mg l^{-1})	ASS (mg l^{-1})	P_{val} (%)
Agua Mineral (Monte Pinos)	92 ± 7	97 ± 2	99,10
Agua de río (Guadalquivir, Córdoba)	51 ± 2	$52,3 \pm 0,5$	21,31
Agua de red urbana (Granada)	25 ± 2	$25,5 \pm 0,3$	52,90
Agua de red urbana (Almuñecar, Granada)	69 ± 7	$75,4 \pm 0,6$	25,54
Agua de mar (Salobreña, Granada)	511 ± 39	513 ± 16	99,91
Agua de mar (Almuñecar, Granada)	509 ± 48	514 ± 14	99,62

CAPÍTULO 4
DETERMINACIÓN DE CALCIO
MEDIANTE EL IONÓFORO
NEUTRO ÉTER 18-CORONA-6

CAPITULO 4

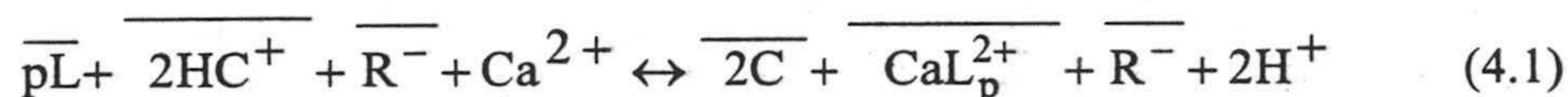
DETERMINACION DE CALCIO MEDIANTE EL IONÓFORO NEUTRO ÉTER 18-CORONA-6

1. Introducción

Se expone en este Capítulo 4 el trabajo desarrollado para poner a punto y posteriormente caracterizar, un sensor óptico de un solo uso o tira reactiva, para la determinación de calcio de forma rápida y selectiva. Esta tira reactiva está basada en un mecanismo diferente del presentado en el capítulo anterior y presenta una zona sensora compuesta por un ionóforo neutro selectivo para calcio, el éter 18-corona-6, que es asequible comercialmente; el cromoionóforo 1,2-benzo-7-(dietilamino)-3-octadecanoilimino fenooxazina, conocido como azul Nilo y la sal lipofílica tetrakis (7-clorofenil)borato potásico. La tira reactiva desarrollada es transparente, de color rojo y responde selectivamente y de forma reversible y rápida a la presencia de calcio.

Esta tira reactiva se basa en un mecanismo de intercambio catiónico entre una membrana orgánica de PVC plastificado y una fase acuosa que contiene el analito, tal como se ha descrito en la Introducción de esta Memoria de Doctorado. La membrana sensora de la tira reactiva debe contener un ionóforo selectivo para calcio, un cromoionóforo selectivo para protones C que originan las especies CaL^{2+} y HC^+ , respectivamente, y, además, una sal de anión lipofílico que permite ese intercambio iónico.

En la zona sensora en contacto con la disolución acuosa que contiene iones calcio tendrá lugar la siguiente reacción, suponiendo que la estequiometría del proceso es 1:p:



Como consecuencia de la reacción, se transferirá calcio desde la disolución a la membrana, en proporción a la razón de concentraciones de calcio a protones en disolución. La medida de la absorbancia de la forma protonada del cromoionóforo, permitirá el cálculo del grado de protonación $1-\alpha$, que será el parámetro analítico, tal como hemos visto en la Introducción. En realidad, usaremos el grado de protonación en nuestras condiciones de trabajo, esto es, el grado de protonación efectivo $1-\alpha_{\text{ef}}$. La actividad en calcio en fase acuosa se relaciona con la constante de equilibrio del proceso $K_e^{\text{CaL}^{2+}}$, α_{ef} y la actividad en protones, a_{H^+} según la ecuación:

$$a_{\text{Ca}^{2+}} = \frac{1}{K_e^{\text{CaL}_p^{2+}}} \left(\frac{a_{\text{H}^+} \alpha_{\text{ef}}}{1 - \alpha_{\text{ef}}} \right)^2 \frac{C_R - (1 - \alpha_{\text{ef}})C_C}{2 \left(C_L - \frac{p}{2} (C_R - (1 - \alpha_{\text{ef}})C_C) \right)^p} \quad (4.2)$$

donde C_L es la concentración analítica de ionóforo, C_C de cromoionóforo y C_R de sal lipofílica. El ajuste del pH con una disolución reguladora de pH conocido permitirá la determinación de la actividad en calcio.

2. Medida de absorbancia y parámetro analítico

El parámetro analítico utilizado en este tipo de sensores es el grado de protonación efectivo $1-\alpha_{ef}$.

$$1-\alpha_{ef} = \frac{A - A_C}{A_{\text{tampón}} - A_C} \quad (4.3)$$

Como puede observarse en la ecuación 4.3 para calcularlo es necesaria la medida de la absorbancia de la tira reactiva a la longitud de onda de 659 nm tras haber estado en contacto con el problema, con la disolución reguladora usada y con una disolución de NaOH 0,01 M para obtener los valores de A , $A_{\text{tampón}}$ y A_C , respectivamente.

Las medidas de absorbancia se realizan usando los soportes anteriormente descritos en la Introducción, con lo que se mejora la reproducibilidad de las medidas, al medir en una

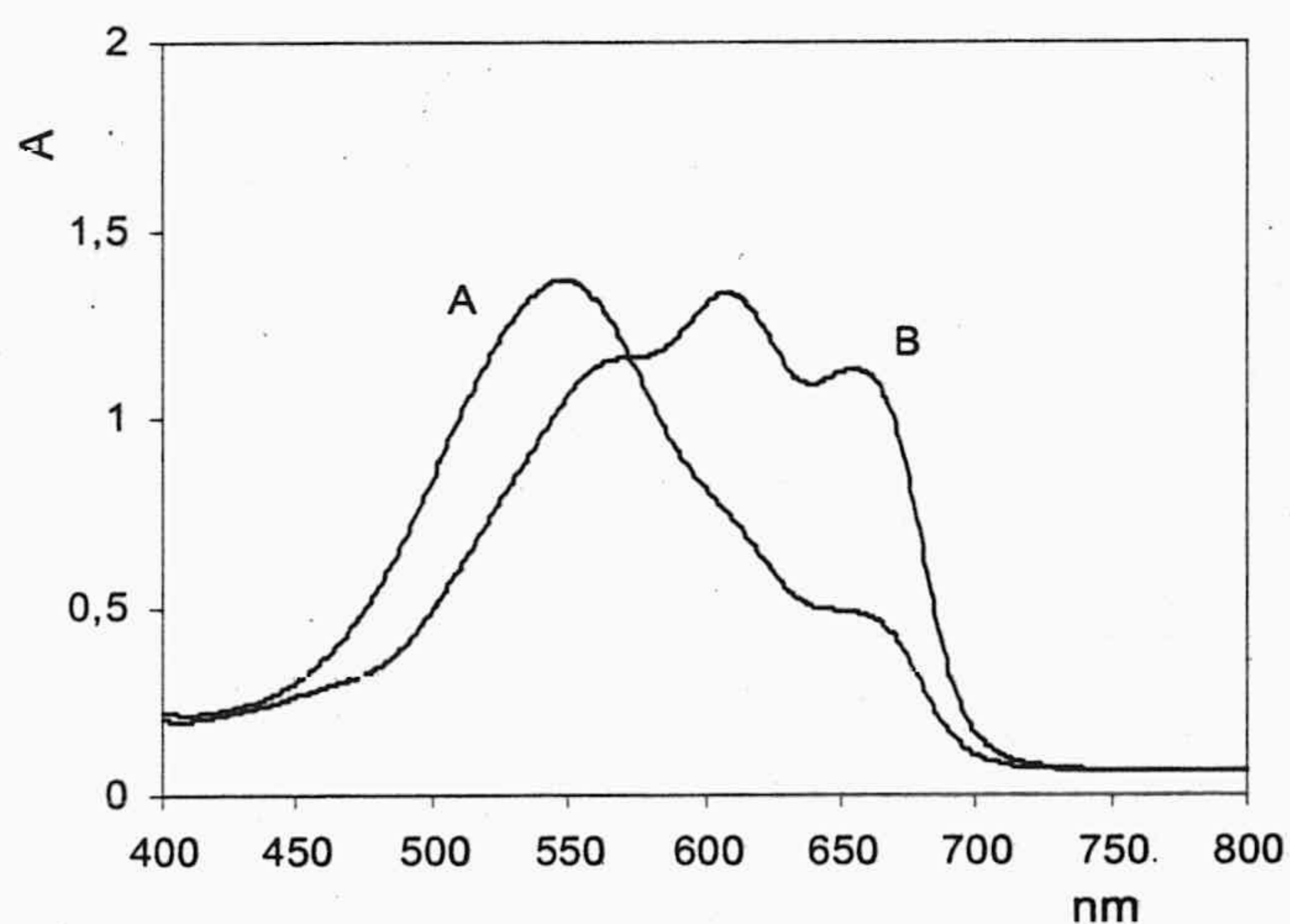


Figura 4.1. Espectro una tira reactiva. A: Después de reaccionar con Ca(II) 0,1 M a pH 8,5. B: Blanco a pH 8,5.

zona con diámetro constante (5 mm) e inferior al diámetro de la zona activa del sensor. De esta manera, obviamos la variabilidad de tamaño de dicha zona entre diferentes membranas así como el grosor variable de los bordes. La Figura 4.1 muestra un espectro de una tira reactiva antes y

después de haber estado en contacto con una disolución de calcio.

3. Optimización de la respuesta del sensor

Los parámetros que influyen en la respuesta de la membrana se pueden dividir en dos grupos: A) Los factores relacionados con el diseño, construcción y composición de la membrana de la membrana, entre los que se encuentran: los componentes del cóctel usado para la preparación de la zona activa de la tira reactiva y sus proporciones, el volumen de cóctel necesario, velocidad de giro del sistema centrífugo, forma de secado de la tira, etc. B) Los factores o parámetros relacionados con el proceso de equilibrio anteriormente mencionado en la ecuación 4.2, como lo son el pH, tiempo de contacto, actividad en calcio, etc.

A lo largo de este apartado detallaremos los distintos experimentos llevados a cabo para establecer la influencia ejercida sobre la respuesta de los diferentes factores, así como los valores óptimos de los mismos.

3.1. Composición y preparación de la membrana

Para el desarrollo del sensor, se procede en primer lugar a la preparación de una disolución en tetrahidrofurano de todos los reactivos necesarios para preparar la zona activa del sensor, a esa disolución se le denominará cóctel, como vimos en el capítulo anterior. A continuación, se deposita un volumen de ese cóctel sobre un soporte inerte y ópticamente transparente mediante el sistema centrífugo comentado con anterioridad, permitiendo que una evaporación lenta del disolvente origine la membrana sensora.

Dicho cóctel se compone de una matriz polimérica, que actúa como medio de inmovilización proporcionando una fase adecuada a los componentes funcionales de la membrana y fácilmente ubicable en un soporte inerte de poliéster, un plastificante apropiado que actúa regulando la permeabilidad y movilidad dentro de la matriz polimérica, un ionóforo selectivo de Ca (II), un cromoionóforo encargado de facilitar una respuesta óptica susceptible de ser medida, como es la absorbancia a una determinada longitud de onda, y,

por último, contiene una sal de anión lipofílico que dota de capacidad de cambio iónico a la membrana, permitiendo tanto que existan especies cargadas en el interior de la membrana lipofílica, como el intercambio de calcio por protones.

Para el establecimiento de la composición más adecuada de la membrana sensora se han seguido dos estrategias complementarias. En primer lugar, ajustar las proporciones óptimas de ionóforo, anión lipofílico y cromoionóforo que originen mejor respuesta y mayor selectividad frente a iones interferentes, que en este caso serán los iones alcalinos y alcalinotérreos. A continuación, una vez fijada la proporción de esos componentes, se estudiará la cantidad de polímero formador de membrana, el PVC, y el tipo y cantidad de plastificante, mediante un estudio de la cinética del proceso de intercambio iónico entre disolución y membrana..

3.2. Selección de reactivos

Para el desarrollo de este sensor óptico para la determinación de calcio basado en dos componentes, es necesario seleccionar un conjunto de reactivos que permitan que se dé la reacción de intercambio iónico entre el calcio presente en la disolución y los protones situados en la membrana, lo que desencadena la reacción de reconocimiento.

Estos reactivos necesarios, tal como quedó dicho en la Introducción de esta Memoria, son: 1) ionóforo selectivo para calcio; 2) ionóforo selectivo para protones o cromoionóforo; 3) sal de anión lipofílico que permita mantener cargas en la membrana lipófila y posibilitar el intercambio iónico; 4) polímero formador de membrana y 5) disolvente de membrana o plastificante.

Con todos estos reactivos es necesario preparar una membrana que se fijará sobre un soporte inerte y ópticamente transparente, sobre el cual se realizará la medida de absorción de radiación por transmisión. Como soporte para la preparación de la membrana sensora se ha usado una lámina de 0,25 mm de politereftalato de etileno (Mylar) que es ópticamente transparente, inerte y estable en las condiciones de trabajo que se establecen.

El ionóforo elegido para este sensor fue el éter 18-corona-6, pues se trata de un reactivo que es económico y fácil de obtener, y que, en esta ocasión, se ha elegido por su

buena selectividad para calcio en las condiciones de trabajo aquí usadas, junto con el ser un reactivo disponible comercialmente.

El ión calcio es atrapado en el interior del macrociclo formándose un complejo de estequiometría 1:1, cuya constante de estabilidad no es excesivamente elevada lo que posibilita la reversibilidad del sistema sensor. Este éter ha sido utilizado como agente extractante de iones alcalinos y alcalinotérreos, presentando una secuencia de selectividad: $K > Rb > Cs > Li > Sr \approx Ba > Ca$ ¹. Sin embargo, una adecuada selección de condiciones de trabajo, componentes y proporciones, posibilitan obtener unos valores de selectividad suficientes para la preparación del sensor y su aplicación al análisis y control rutinario de los niveles de calcio en aguas.

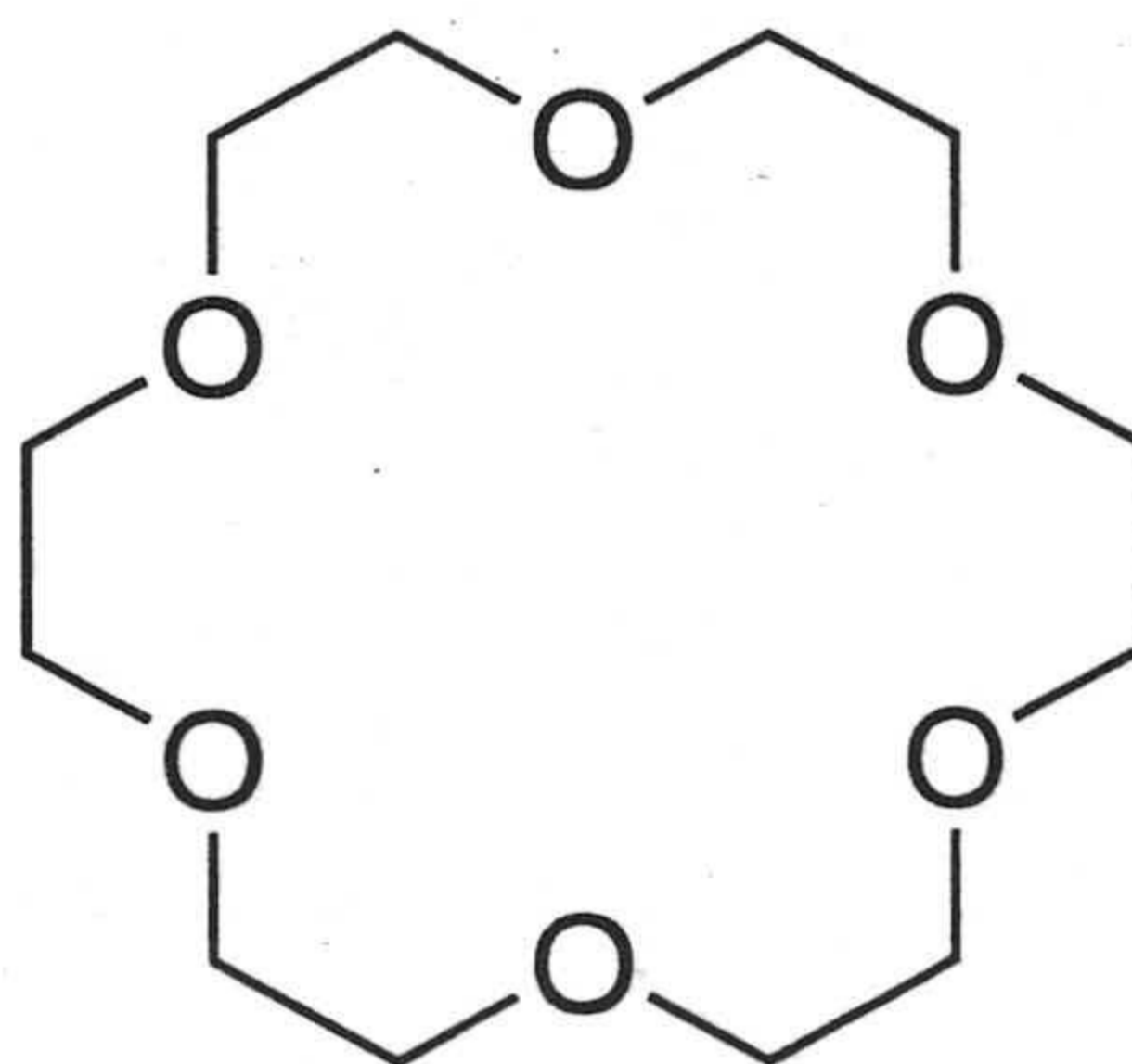


Figura 4.2. Estructura del ionóforo éter 18-corona-6

Como cromoionóforo se eligió el azul Nilo lipofilizado, conocido como ETH 5294, pues en pruebas preliminares se mostró adecuado para el propósito, pues al ser una molécula de alta basicidad compitió adecuadamente con protones permitiendo el intercambio iónico de la membrana con calcio.

¹ Y. Zolotov (Ed.) *Macrocyclic Compounds in Analytical Chemistry*, Wiley, N.Y., 1997, p. 89.

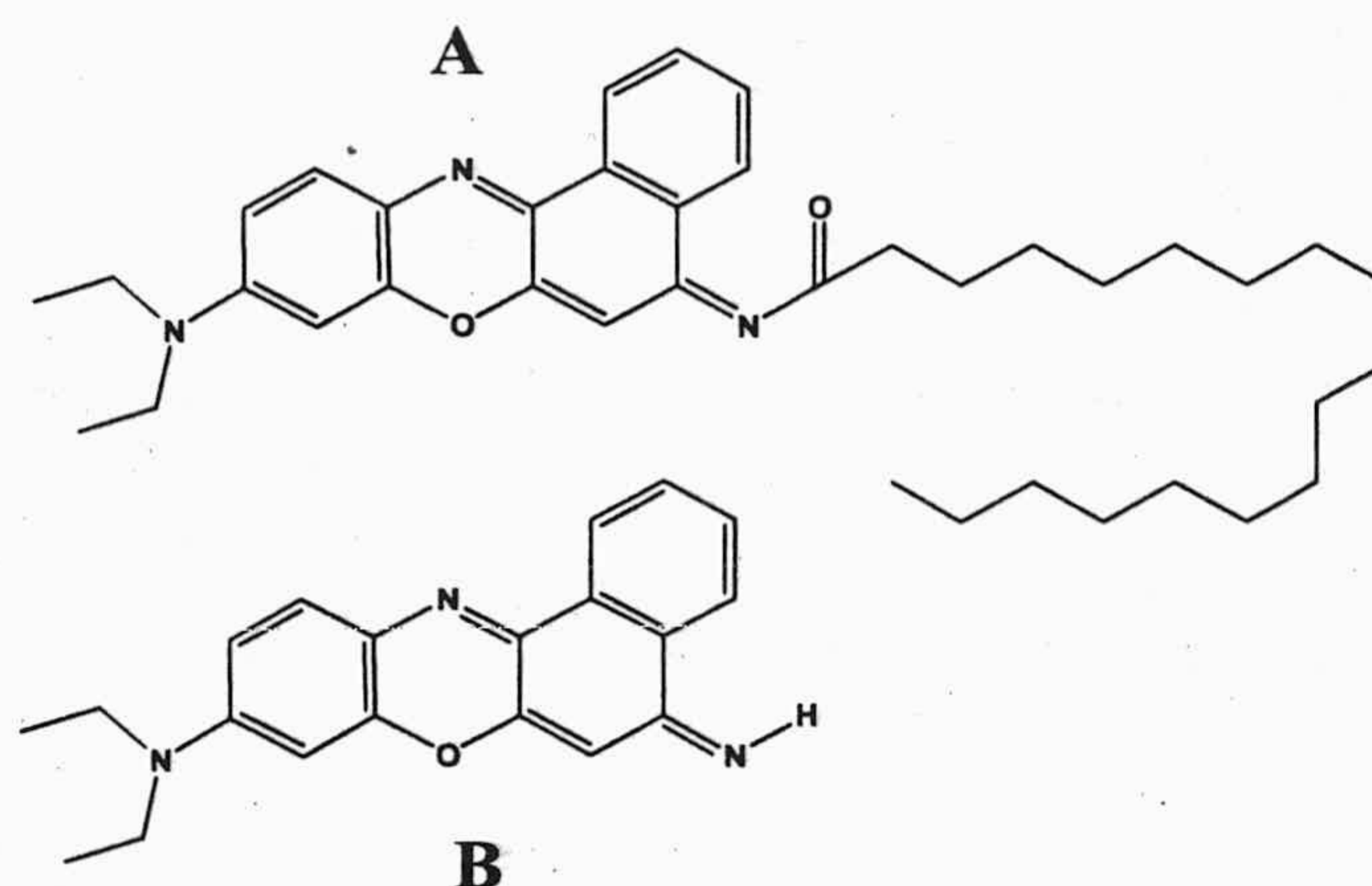


Figura 4.3. A: Azul Nilo lipofilizado; B: Azul Nilo.

Este cromoionóforo fue sintetizado en el laboratorio, tal y como quedó explicado en el Capítulo 2. Se trata de un indicador ácido-base –el azul Nilo– de carácter básico fuerte al que se ha añadido una cadena de diecisiete carbonos, manteniendo intacta su capacidad para reaccionar con protones presentes en el medio modificando su estructura de forma que su espectro de absorción no experimente variación. De este modo, se ha conseguido una molécula hidrófoba soluble en disolventes poco polares como el THF, eliminando de este modo el riesgo de lixiviación hacia la fase acuosa. El espectro de absorción del azul Nilo lipofilizado (Figura 4.4) presenta varios máximos de absorción siendo el de longitud de onda 659 nm, el utilizado para el cálculo de $1-\alpha_{ef}$.

La finalidad del anión lipofílico es mantener la electroneutralidad de la membrana y permitir el intercambio iónico, ya que al encontrarse cargado positivamente el cromoionóforo en su forma protonada, se necesita la presencia de una carga negativa en el interior de la membrana. Dicha carga negativa la proporciona una molécula que no modifique los distintos equilibrios que se dan en la membrana y que sea altamente lipofílica.

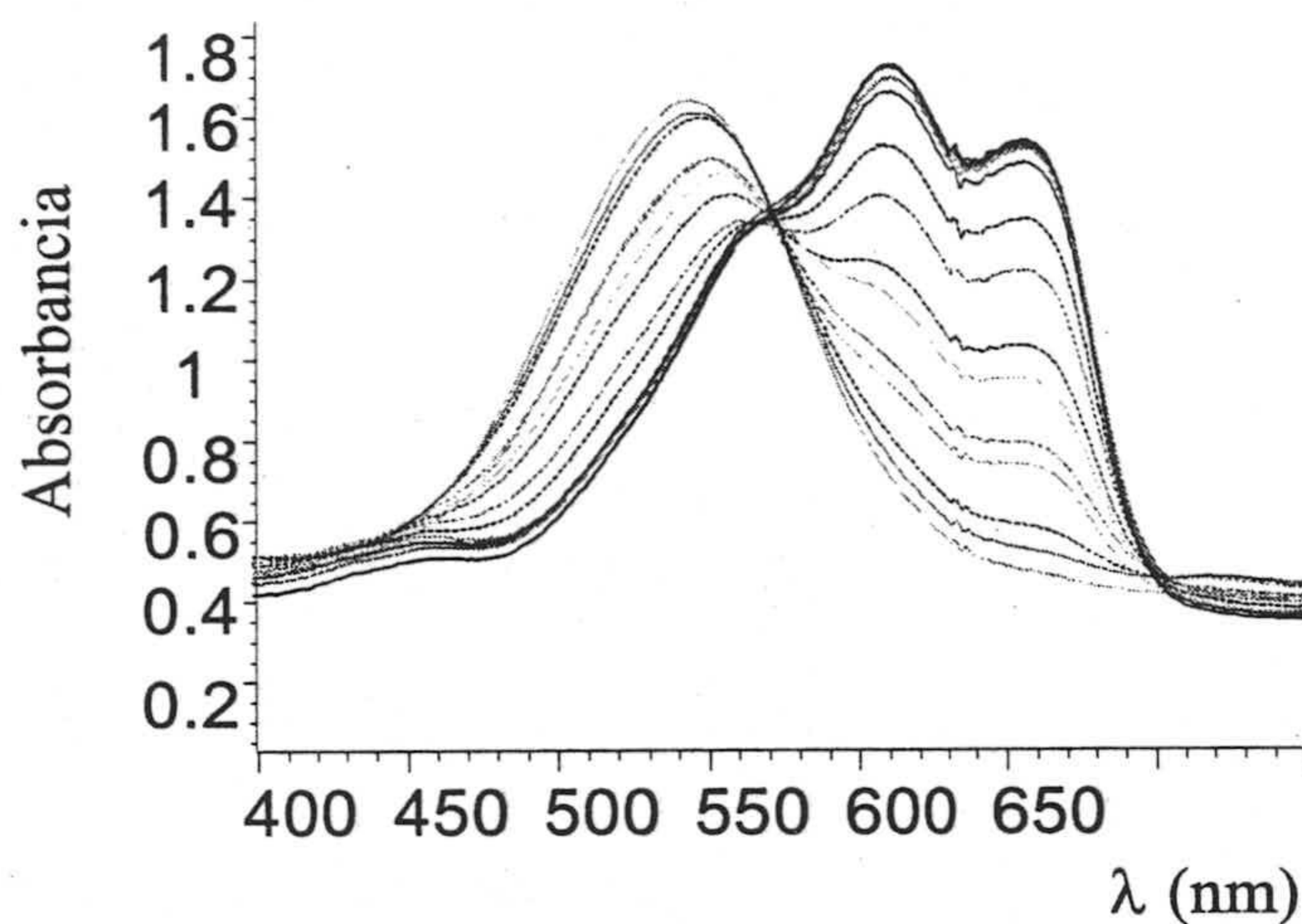


Figura 4.4. Espectros de absorción del azul Nilo lipofilizado a diferentes grados de protonación.

De los diferentes tetrafenilboratos alcalinos ensayados como sal lipofílica, dio buen resultado el tetrakis(7-clorofenil)borato potásico (TCFB), mientras que otras, como el tetrakis(3,5-bis(trifluorometil)fenil)borato sódico, no originaron prácticamente respuesta.

Como polímero hidrófobo para preparar la matriz se seleccionó cloruro de polivinilo (PVC) por las ventajas de sencillez de uso, buenos resultados y bajo precio. Una vez elegido el ionóforo selectivo de Ca (II), el cromoionóforo neutro selectivo de protones, el anión lipofílico y la matriz polimérica adecuada que alberga todos estos componentes, debemos de garantizar la movilidad y/o permeabilidad del analito y de protones a través de dicha matriz, con este objetivo se introduce en la membrana una sustancia plastificante.

Fueron probados tres plastificantes diferentes, como son: tributilfosfato (TBP), *o*-nitrooctilfeniléter (NPOE) y bis(2-etilhexil)sebacato (DOS).

Para seleccionar el plastificante, se prepararon membranas con cada uno de los plastificantes, manteniendo una composición fija del resto de los componentes. Todos ellos contenían 25,00 mg de PVC, 63,00 mg del plastificante correspondiente, 1,70 mg de la sal lipofílica tetrakis(7-clorofenil)borato potásico (TCFB), 2,00 mg de azul Nilo lipofilizado y 0,45 mg del ionóforo, todo ello disuelto en 0,75 ml de THF. Con 15 μ l de cada cóctel se prepararon diferentes membranas, según se indica en el capítulo dedicado a metodología. A

continuación, se puso cada una de las membranas en contacto con una disolución 0,05 M en Ca(II) a pH 8,5 ajustado con tampón dietanolamonio/dietanolamina $2 \cdot 10^{-2}$ M, y se registró la variación de absorbancia a 659 nm en función del tiempo.

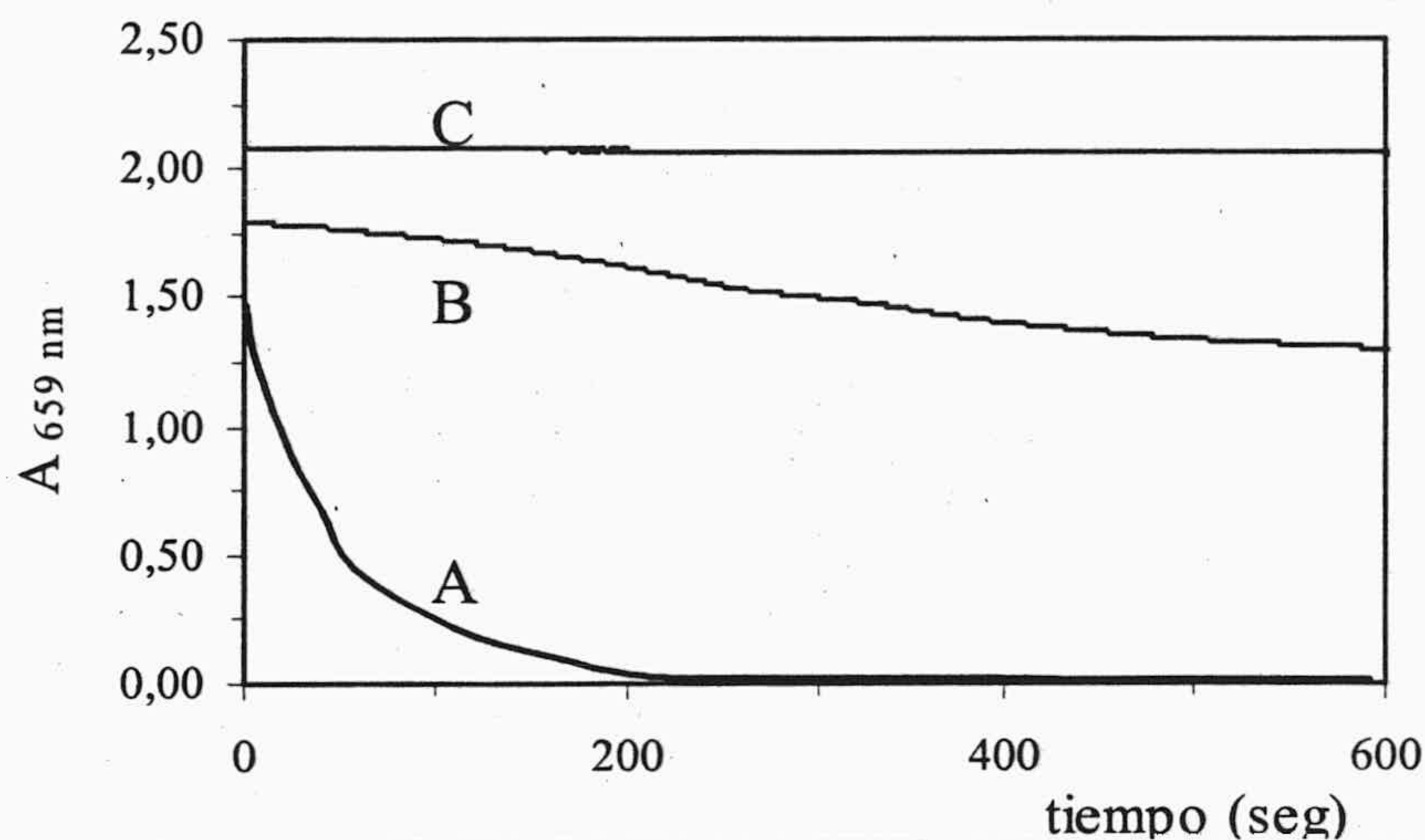


Figura 4.5. Variación de absorbancia en función del tiempo. A) con TBP como plastificante; B) con DOS como plastificante; C) con NPOE como plastificante.

Como puede observarse en la Figura 4.5, el uso del tributilfosfato como plastificante es el que permite una mayor y más rápida respuesta, siguiéndole DOS, mientras que utilizando NPOE apenas fue observada respuesta en un tiempo de reacción de 60 minutos, si bien la Figura 4.5 solo representa los diez primeros minutos

3.2.1. Estudio de la proporción óptima anión lipofílico/ionóforo

Tal y como quedó explicado en la Introducción de esta Memoria, la concentración de sal lipofílica presente en la membrana y, especialmente, su relación molar con la concentración de ionóforo, es un parámetro que afecta de forma crítica a la selectividad de la membrana² frente a iones potencialmente interferentes, tales como magnesio y alcalinos.

² W. Zhang, L. Jenny y U. Spichiger, Anal. Sci., 16, 11 (2000).

Como medida de la selectividad usaremos el coeficiente de selectividad K_{ij}^{opt} , ya definido en la Introducción, para el caso de que junto con el ión primario Ca^{2+} coexista un ión interferente J^{z+} . Ese coeficiente lo calculamos aquí mediante el método de las disoluciones separadas³ y vendrá dado por el cociente entre las actividades de los iones principal e interferente para un valor de $1-\alpha_{ef} = 0,5$.

Con el objetivo de estudiar la influencia de la relación sal lipofílica/ionóforo sobre el coeficiente de selectividad, se prepararon un conjunto de membranas de un solo uso en las que se varió dicho cociente. Se estudiaron cuatro relaciones distintas: 100%, 150%, 200% y 250%. De cada proporción se prepararon tres membranas distintas.

La cantidad del cromoionóforo se mantuvo constante en todas ellas mientras que la proporción molar del anión lipofílico con respecto al ionóforo se varió, según queda dicho. La cantidad de cromoionóforo utilizada fue, como en anteriores ocasiones, la necesaria para minimizar el error fotométrico de las medidas de absorbancia.

Se prepararon series de disoluciones de calcio, magnesio, sodio y potasio con cinco niveles de actividad diferentes en cada serie: $5 \cdot 10^{-4}$, $5 \cdot 10^{-3}$, $1 \cdot 10^{-2}$, $5 \cdot 10^{-2}$ y $1 \cdot 10^{-1}$ M y con el valor de pH ajustado a 8.5 con una disolución reguladora de dietanolamonio/dietanolamina $2 \cdot 10^{-2}$ M. Se analizó cada serie con una misma membrana, efectuando tres réplicas por serie. Cada membrana se introdujo durante 5 minutos para asegurar la consecución del equilibrio y, a continuación, se midió la absorbancia y se establecieron las funciones $1-\alpha_{ef}$ vs $\log a_{Ca^{2+}}$, lo que permitió calcular los coeficientes de selectividad.

Tal y como quedó explicado en la Introducción, el coeficiente selectividad está directamente relacionado con $1-\alpha$ y gráficamente se corresponde a la distancia que separa las funciones respuesta del analito y del interferente. Sin embargo en esta Memoria de Doctorado se han determinado los coeficientes de selectividad de modo matemático, utilizando la ecuación:

³ IUPAC Recommendations for Nomenclature of Ion-Selective Electrodes, Pure Appl. Chem., 48, 127

$$k_{Ca,J}^{opt} = \frac{v}{2} \frac{K_e^{JL^{v+}}}{K_e^{CaL_P^{2+}}} \left(\frac{a_{H^+} + \alpha}{1 - \alpha} \right)^{2-v} \frac{\left(C_L - \frac{q}{v} C_R - (1 - \alpha_{ef}) C_C \right)^q}{\left(C_L - \frac{p}{2} C_R - (1 - \alpha_{ef}) C_C \right)^p} \quad (4.4)$$

Para ello fue necesario estudiar por separado el comportamiento y respuesta para cada uno de los iones, para luego extraer de esos datos experimentales los parámetros de la ecuación (4.4) tales como estequiometrías p y q, $K_e^{JL^q}$, etc.

Tal y como puede observarse en la Figura 4.6 la mayor selectividad frente a los principales iones interferentes, Na (I), K (I), y Mg (II), se obtiene a una relación molar anión lipofílico:ionóforo de 2:1. A pesar de que existe una mayor selectividad frente Mg (II) a una relación 1,5:1, es a relación 2:1 donde se obtiene mejor selectividad frente a alcalinos. En la Tabla 4.1 podemos observar los valores de las constantes de selectividad para cada relación molar.

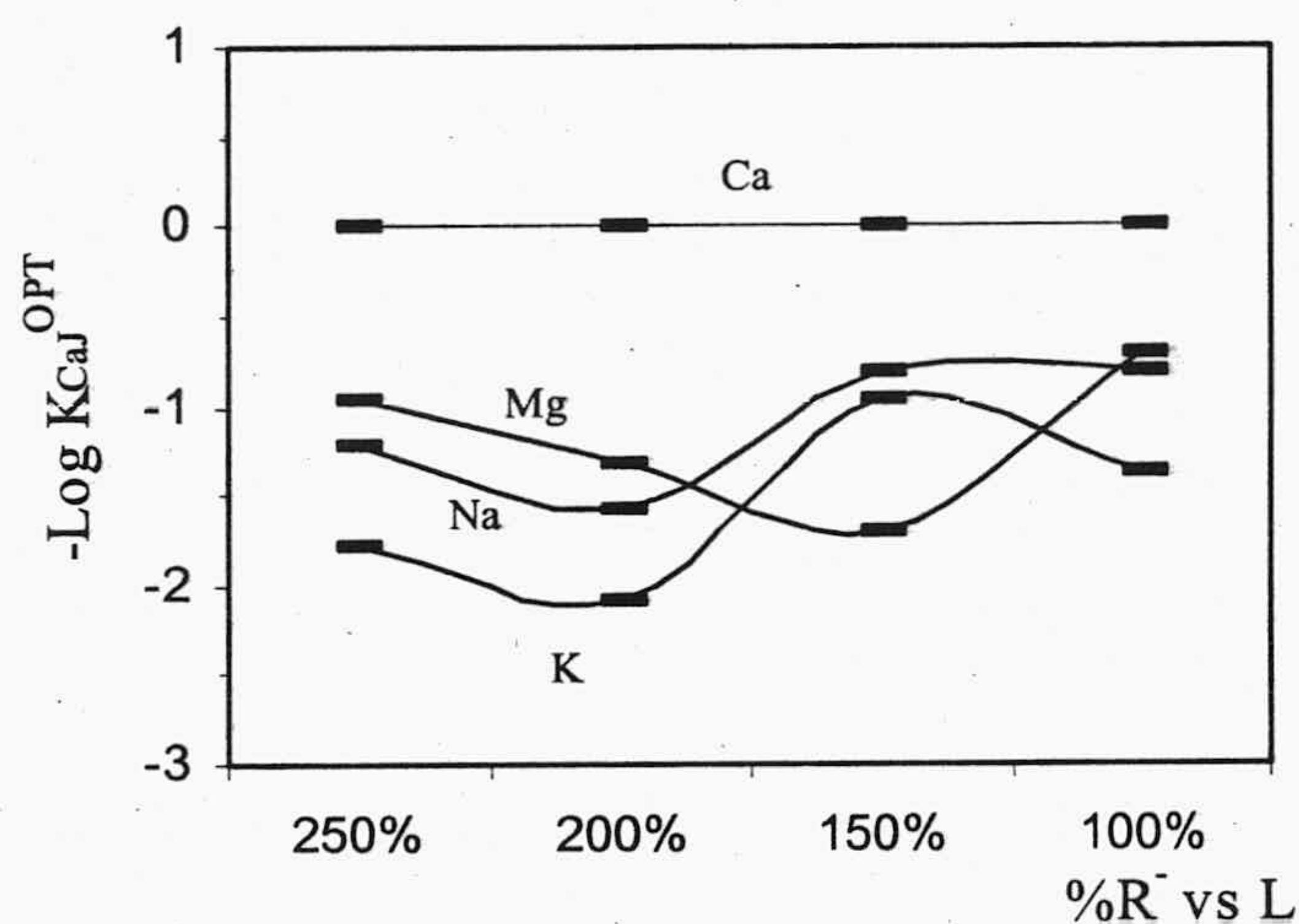


Figura 4.6. Variación de la selectividad del sensor en función de la relación molar anión lipofílico/ionóforo

Tabla 4.1. Valores de los coeficientes de selectividad calculados por el método de las disoluciones separadas.

R%	$-\log K_{Ca,Mg}$	$-\log K_{Ca,Na}$	$-\log K_{Ca,K}$
100	-0,7041	-0,8123	-1,3751
150	-1,7109	-0,8119	-0,9737
200	-1,3092	-1,5802	-2,0767
250	-0,9694	-1,2291	-1,7759

3.2.2. Influencia del porcentaje de plastificante

El estudio de la proporción óptima de plastificante tributilfosfato se llevó a cabo observando como se modifican tanto las propiedades físicas de la membrana, como la cinética de la reacción heterogénea de intercambio iónico; pues un aspecto esencial de estos ensayos rápidos es la velocidad de respuesta.

Para llevar a cabo el estudio de la cinética del proceso, se estudió el tiempo de respuesta utilizando tiras reactivas preparadas conteniendo cantidades diferentes de TBP comprendidas entre un 50% y un 80% con respecto a los demás componentes de la membrana. Además, toda esas disoluciones contenían 25,00 mg de PVC, 1,70 mg de sal lipofílica TCFB, 2,00 mg de cromoionóforo azul Nilo y 0,45 mg de ionóforo en 0,75 ml de THF.

Las tiras reactivas preparadas en la forma habitual se pusieron en contacto con una disolución de Ca (II) $1,57 \cdot 10^{-2}$ M en actividad ($5 \cdot 10^{-2}$ M en concentración), registrando la variación de absorbancia con el tiempo. En cada caso, el tiempo empleado en alcanzar el equilibrio fue el indicado en la Tabla 4.2.

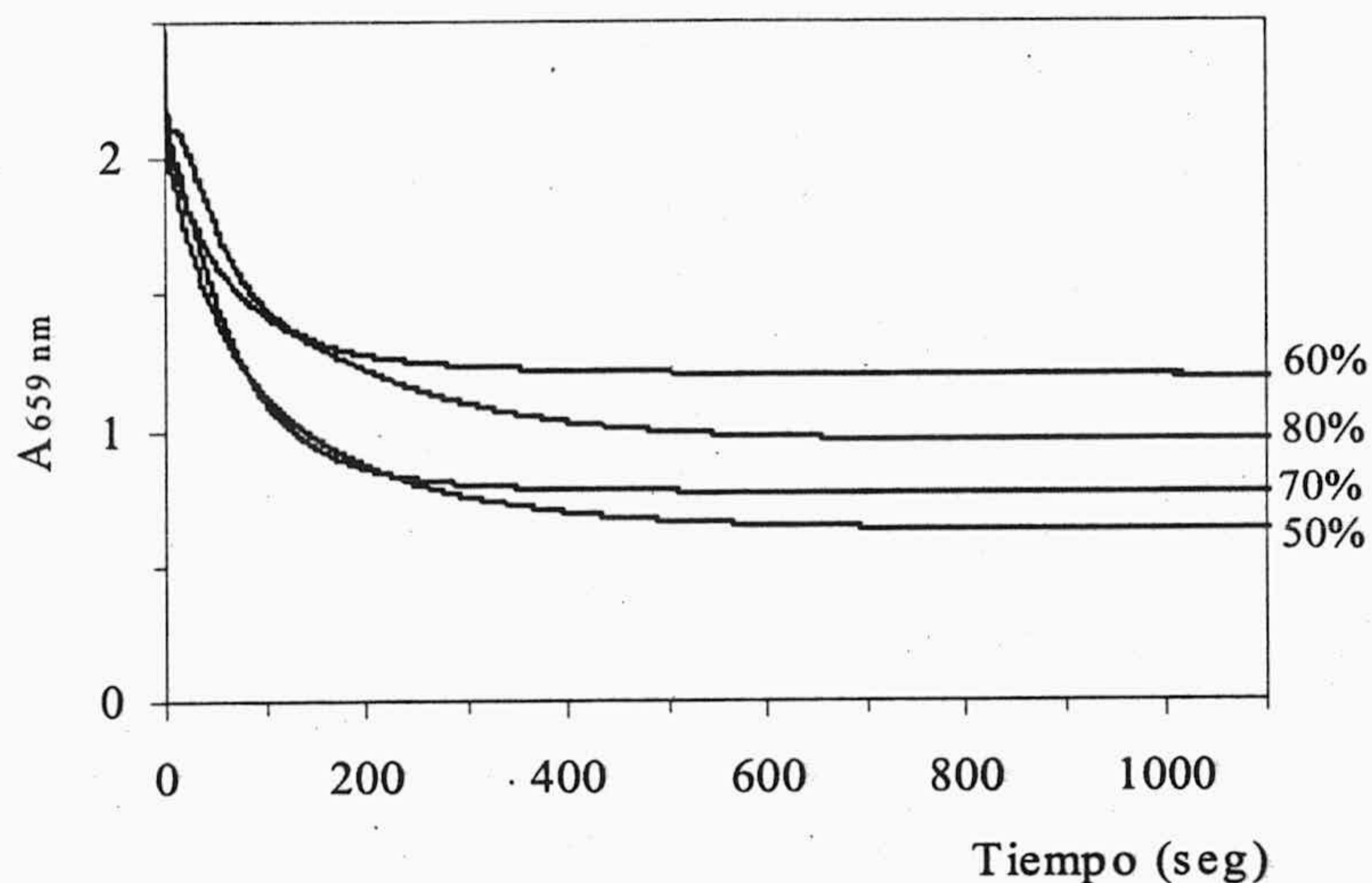


Figura 4.7. Variación del tiempo de respuesta en función del porcentaje de TPB

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

Tabla 4.2. Tiempos de equilibrio en función del porcentaje de TBP en la membrana.

TBP. %	T. min.
50	5,5
60	4,0
70	3,0
80	5,5

La velocidad de la respuesta (Figura 4.7) se incrementa con la cantidad de TBP, así como las propiedades físicas mejoran hasta un porcentaje del 70%. Con cantidades mayores que estas, tanto la velocidad como las características de la membrana empeoran debido a que

la membrana es menos homogénea y aumenta el tiempo de secado. Se seleccionó un 70% como porcentaje adecuado para los experimentos siguientes.

Por otra parte, los tiempos de respuesta obtenidos coinciden razonablemente con los esperados teóricamente para la difusión de calcio dentro de una membrana de PVC plastificada de 5,6 μm de espesor^{4,5,6}.

Esta forma de trabajar se repitió con el PVC obteniéndose unos resultados coherentes que ratifican un 68% TBP y un 28% de PVC, dejando un 4% en peso para componentes minoritarios como son ionóforo, cromoionóforo y aniones lipofílicos.

3.2.3. Influencia del volumen de tetrahidrofurano

Para establecer la cantidad de THF óptima, prepararon diez mezclas de todos los componentes que se disolvieron en distintos volúmenes de THF desde 0,5 a 2,5 ml. Se observó que a volúmenes pequeños de THF se dificulta la construcción de la zona sensora, a la par que, debido al aumento de la viscosidad, disminuye la repetibilidad en la preparación de esa membrana. A valores altos, por el contrario, se ve sensiblemente afectada la señal analítica debido a la disminución del espesor de la membrana. Teniendo en cuenta todos estos factores se seleccionó 1,0 ml de THF como volumen de disolvente en la preparación de los cócteles.

3.2.4. Influencia del volumen de cóctel.

Se estudió la influencia de la cantidad de cóctel que se deposita sobre el soporte de poliéster, sobre la absorbancia de las membranas tras haber reaccionado con calcio. Para ello se prepararon diversas membranas usando volúmenes que varían desde 2,5 hasta 25 μl . Volúmenes inferiores a 10 μl no deben usarse pues el diámetro de la zona sensora es inferior a haz de radiación del espectrofotómetro, originando errores en la lectura. Volúmenes

⁴ Bakker, E., Bühlmann, P. y Pretsch, E. *Chem. Rev.*, 97, 3083 (1997).

⁵ Seiler, K., Morf, W.E., Rusterholz, B. y Simon, W., *Anal. Sci.*, 5, 557 (1989).

⁶ Lerchi, M., Orsini, F., Cimerman, Z., Pretsch, E., Chowdhuey, D. y F. Kamata, *Anal. Chem.*, 68, 3210 (1996).

comprendidos entre 10 y 25 μl conducen a valores de absorbancia prácticamente constantes, aunque conforme mayor es el volumen, lógicamente mayor es el tamaño de gota y estas presentan una mayor homogeneidad. Se selecciona un volumen de 20 μl pues conduce a un menor consumo de cóctel y a una buena respuesta. Por último, volúmenes superiores a 25 μl desbordan el ancho del soporte plástico, por lo que no se pueden usar.

3.2.5. Influencia de la velocidad de rotación.

Al igual que el volumen de cóctel, la velocidad de rotación afecta al diámetro de la zona activa, pero afecta de modo diferente al espesor ya que para un mismo volumen de cóctel, un aumento en las revoluciones conlleva un aumento en la fuerza centrífuga que hace aumentar el diámetro de la zona activa y disminuir el espesor de la misma⁷. Esta variable no afecta solo a la señal analítica sino que afecta también a la homogeneidad de la zona activa, propiedad de vital importancia para obtener una reproducibilidad aceptable. Así, de las velocidades de giro probadas que oscilan entre 90 y 250 r.p.m., se seleccionó como óptima 170 r.p.m.

3.2.6. Sistema usado para la evaporación del disolvente.

Como se ha señalado en capítulos anteriores, la forma en que se lleva a cabo la evaporación del disolvente tiene una gran influencia en la homogeneidad de la zona activa. Se ha comprobado que la evaporación lenta en una atmósfera saturada en vapores del disolvente es la que origina membranas con mayor reproducibilidad. En concreto, se observó que los mejores resultados se obtuvieron dejando evaporar el disolvente durante 30 segundos mientras que el plato giratorio se encontraba rotando, transcurrido este tiempo se colocó la membrana en una atmósfera saturada de THF a temperatura ambiente para conseguir una adecuada velocidad de evaporación.

⁷ Seiler K. y Simon W., Anal. Chim. Acta, 266, 73 (1992).

3.2.7. Preparación de la membrana.

A partir de los datos que acabamos de comentar, se propone la siguiente receta operatoria para la preparación de tiras reactivas para calcio. El cóctel se obtiene pesando 25,00 mg (27,1 % p/p) de PVC, 63,00 mg (68,4 % p/p) de tributilfosfato, 0,45 mg (0,5 % p/p) del éter 18-corona-6, 2,00 mg (2,2 % p/p) de azul Nilo lipofilizado y 1,70 mg (1,8 % p/p) de tetrakis(7-clorofenil)borato potásico en un vial de vidrio y disolviéndolos en 1,0 ml de tetrahidrofurano. Se depositan 20 μ l de ese cóctel sobre una lámina de poliéster de 14 mm \times 40 mm \times 0,25 mm de espesor, con ayuda de un sistema centrífugo de preparación de membranas. Tras dejar la membrana girando a temperatura ambiente, durante 30 segundos, se deja estar en un recipiente hermético con atmósfera saturada de tetrahidrofurano, obteniéndose de este modo una película circular sólida, homogénea, adherida al soporte sólido, transparente y de color rojo.

Las dimensiones de la zona sensora son de 6 mm de diámetro y 7 μ m de espesor. La concentración de ionóforo, cromoionóforo y anión lipofílico en el sensor una vez preparado son 18,47; 37,17; y 37,18 mmol kg⁻¹, respectivamente.

Las características físicas y dimensiones finales del sensor utilizando los componentes seleccionados fueron las reflejadas en la Figura 4.8.

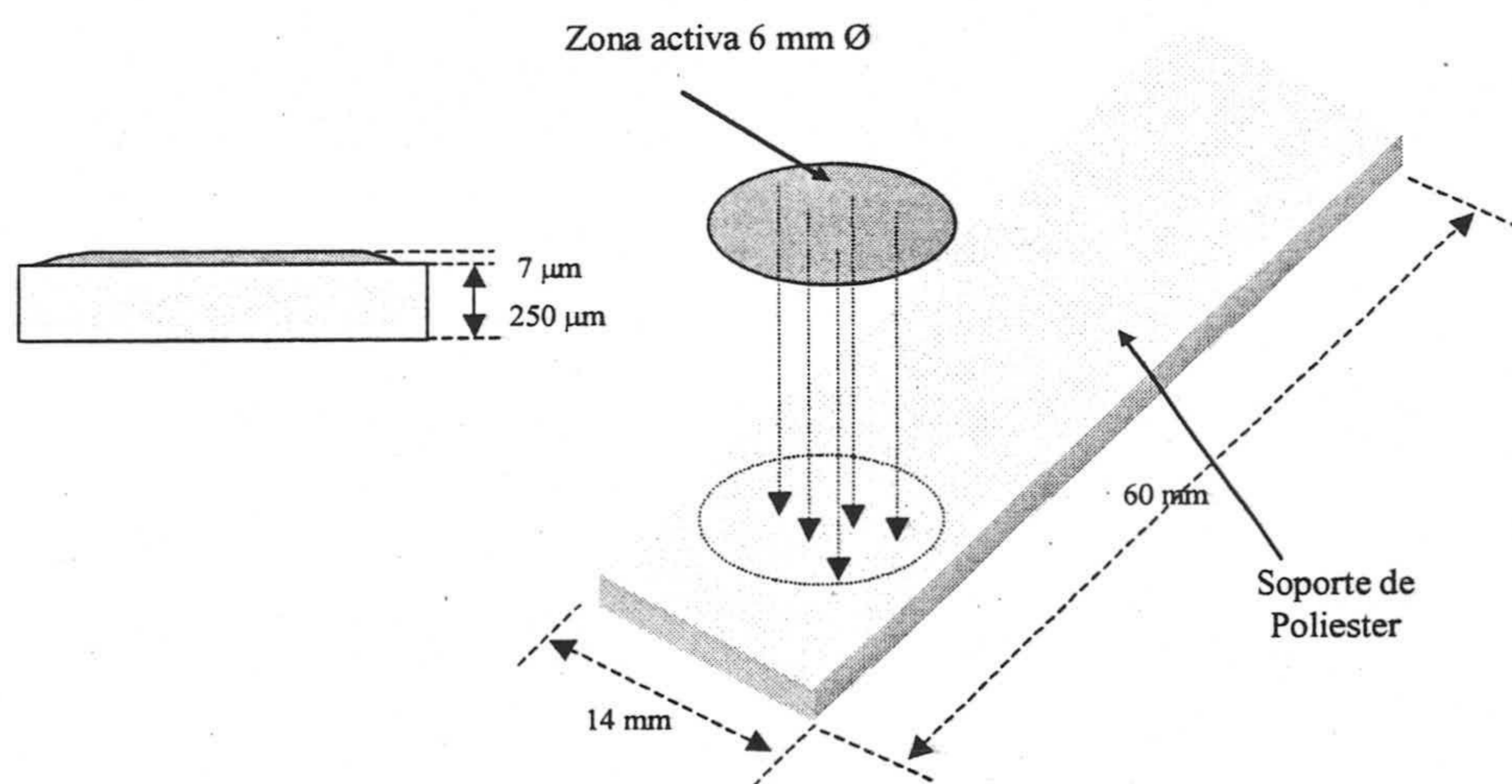


Figura 4.8. Esquema y dimensiones del sensor.

3.3. Parámetros relacionados con el proceso de equilibrio

Los parámetros relacionados con el proceso de equilibración entre la muestra conteniendo analito y la tira reactiva que se han estudiado son pH, tiempo de contacto y actividad en calcio.

3.3.1. pH de la disolución

El azul Nilo es una molécula de alta basicidad y se encuentra protonada en disoluciones con valores de pH por debajo a de 10^8 . Es precisamente la relación entre la constante de acidez del indicador y la constante de estabilidad del complejo, la que indica el intervalo de pH de trabajo del sensor.

Como ya se ha señalado, el valor del parámetro analítico que estamos usando $1-\alpha_{ef}$, depende del cociente de actividades entre calcio y protones y tiene influencia sobre diversos aspectos relacionados con estos sensores, entre ellos, con la forma de la curva respuesta y con la sensibilidad.

Para estudiar esta influencia, se prepararon diferentes membranas con la misma composición: 25,00 mg de PVC, 63,00 mg de TBP, 0,45 mg del ionóforo, 2,00 mg de azul Nilo lipofilizado y 1,70 mg de TCFB en 1,0 ml de THF. Tras preparar las membranas se pusieron en contacto con disoluciones de calcio de pH comprendido entre 5,0 y 9,0. Se prepararon tres series de cinco disoluciones en matraces de 50 ml de capacidad. Las concentraciones de calcio utilizadas para dicho ensayo están comprendidas entre 1×10^{-1} y 1×10^{-4} M. Se adicionó a cada matraz 5 ml del tampón Tris 2×10^{-2} M para pH comprendidos entre 7 y 9; tampón dihidrógenofosfato/monohidrógenofosfato 2×10^{-2} M para pH de 5,8 a 6,8 y dietanolamonio/dietanolamina 2×10^{-2} M para pH entre 7,8 y 8,9. Cada medida se realizó por triplicado.

⁸ Morf, W.E., Seiler, K. Rusterholz, B. y Simon, W., Anal Chem. 62, 738 (1990).

En la Figura 4.9 se muestran los resultados obtenidos, destacando que la membrana sensora comienza a responder a calcio para valores de pH próximos a 7,0. Si aumentamos el pH de la disolución, se va obteniendo mayor respuesta para el analito, como se observa en la figura, pues al presentar mayor respuesta, las curvas están ligeramente desplazadas hacia la izquierda. Recordemos que cuanto más a la izquierda se encuentre la curva, mayor será la constante de intercambio y mayor la respuesta al analito, esto es mayor sensibilidad. Sin embargo, a medida que nos acercamos al pK_a del cromoionóforo, este tiende a protonarse con mayor facilidad, por la tanto hemos de buscar una solución de compromiso entre sensibilidad y selectividad⁹. Con este propósito, fue elegido el valor de 8,5 como pH de trabajo. Como tampón se utilizó el de dietanolamonió/dietanolamina que posee la característica de no utilizar contraiones alcalinos que pudiesen alterar la respuesta del sensor.

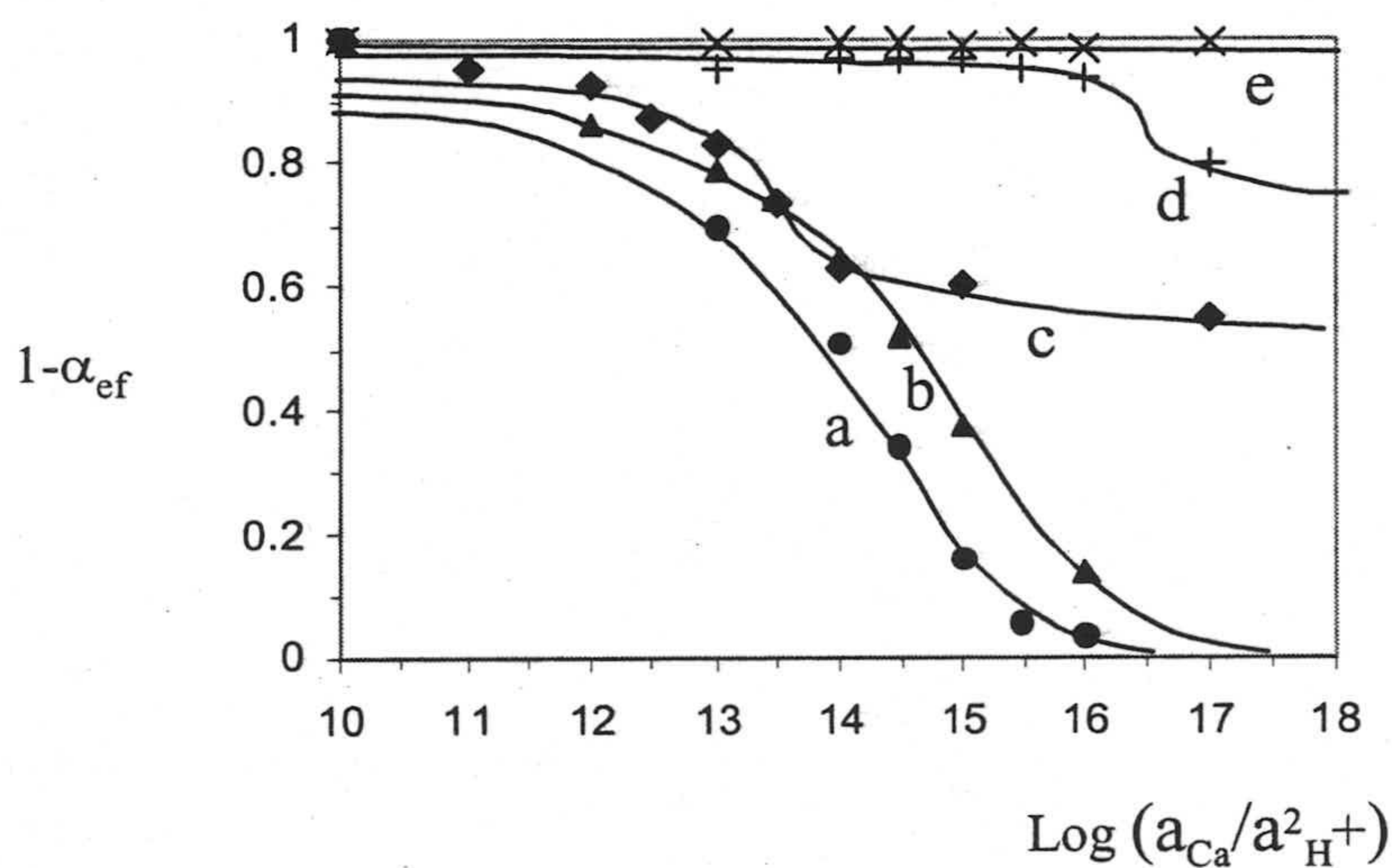


Figura 4.9. Efecto del pH sobre la respuesta de la tira reactiva, a) pH=9,0, b) pH=8,5, c) pH=8,0, d) pH=7,0, e) pH=5,0

⁹ Bakker, E., Bühlmann, P. y Pretsch, E., Chem. Rev., 97, 3083 (1997).

3.3.2. Tiempo de reacción

El tiempo de respuesta del sensor fue uno de los parámetros utilizados tanto a la hora de elegir plastificante como al optimizar la cantidad del mismo. Para establecer dicho tiempo de respuesta, se prepararon tres sensores con la composición óptima antes propuesta y se pusieron en contacto con una disolución de concentración 0,1 M de Ca(II) a pH 8,5, realizando un estudio cinético como los antes comentados. Se observa que la señal se hace estable a los 300 segundos, no encontrando a partir de ahí ninguna variación superior al 5% de la señal a tiempo infinito o superior a la propia variabilidad del sistema. Por ello, se propone usar 300 segundos como tiempo de equilibrio.

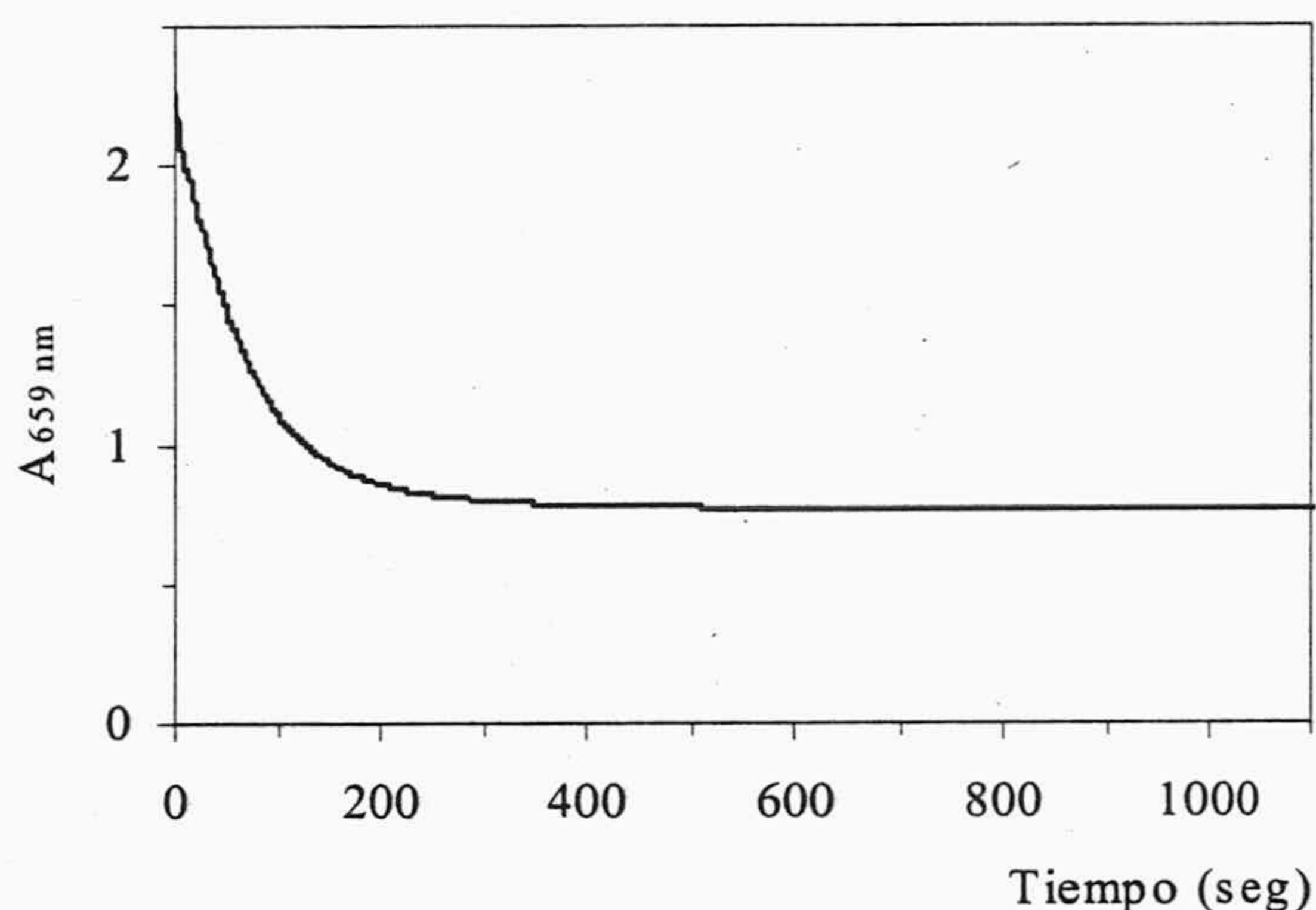


Figura 4.10. tiempo de respuesta de la tira reactiva

3.4. Influencia de la actividad de calcio. Verificación del modelo.

Para establecer la influencia de la actividad de calcio sobre la tira reactiva se fabricaron membranas con la composición antes señalada como óptima. Dichas membranas se pusieron en contacto con disoluciones de calcio de actividad entre $5,2 \cdot 10^{-8}$ y 0,134 M (10^{-7} y 1M en concentración) a pH 8,5. La Tabla 4.3 recoge los valores experimentales encontrados y estos se representan en la Figura 4.11. Para cada nivel de concentración se realizaron nueve réplicas con tres sensores diferentes (3 sensores con 3 réplicas de cada uno).

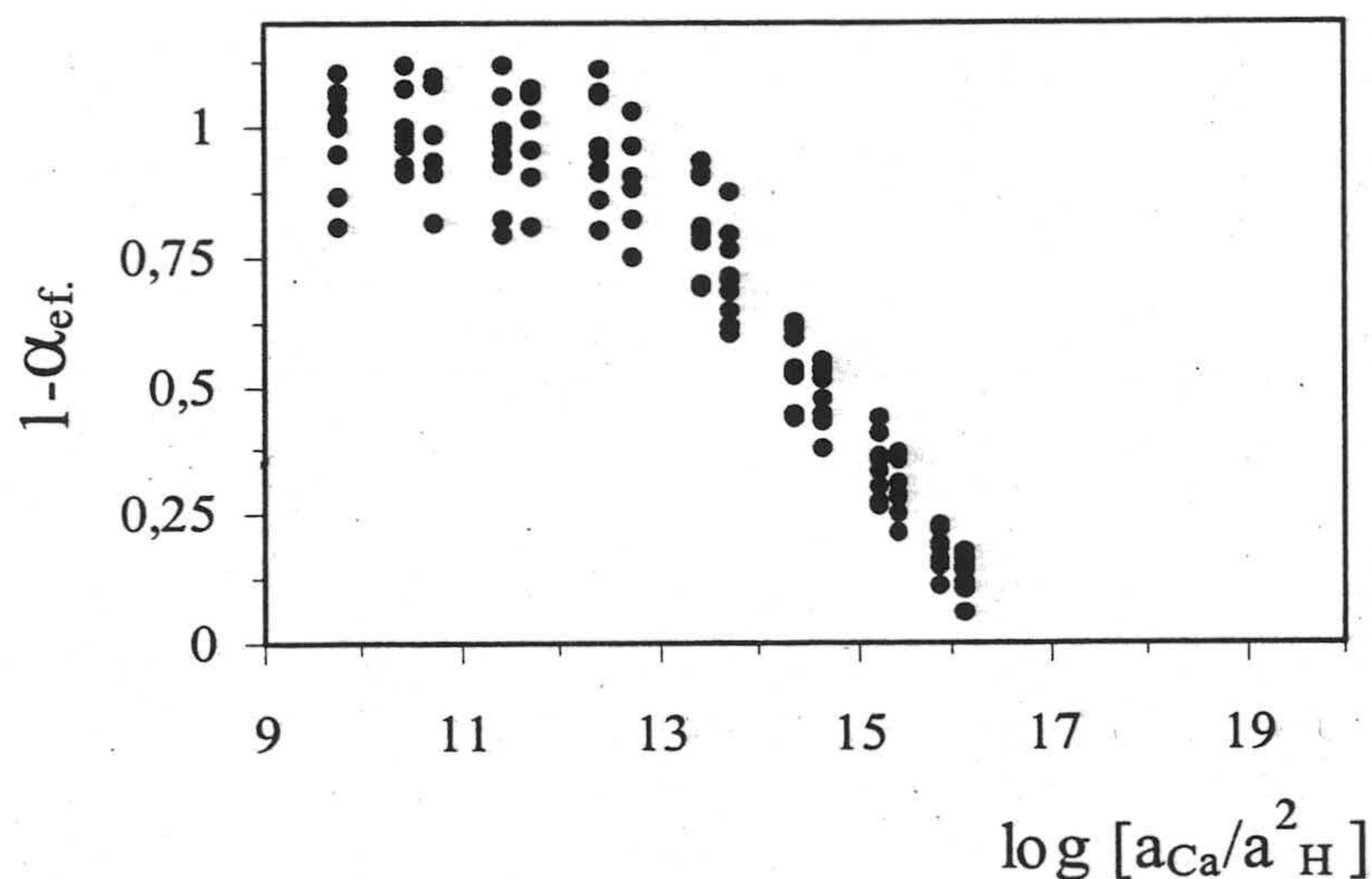


Figura 4.11. Influencia de la actividad en calcio sobre el parámetro analítico $1-\alpha_{ef}$

En la Figura 4.12 podemos comprobar como el modelo matemático establecido (ec. 4.5) predice bien el valor de los puntos experimentales. En este caso, los puntos experimentales están representados por la media aritmética de las nueve réplicas realizadas para cada nivel de concentración.

$$a_{Ca^{2+}} = \frac{1}{K_e^{CaL_p}} \left(\frac{a_{H^+} \alpha}{1 - \alpha} \right)^2 \frac{C_R - (1 - \alpha_{ef}) C_C}{2 \left(C_L - \frac{p}{2} (C_R - (1 - \alpha_{ef}) C_C) \right)^p} \quad (4.5)$$

Como ya se ha indicado anteriormente, recordamos que C_L , C_C y C_R son las concentraciones analíticas de ionóforo, cromoionóforo y anión lipofílico, respectivamente y p la estequiometría del complejo calcio-ionóforo. En la tabla 4.3, podemos ver el valor de cada uno de los puntos experimentales representados

Tabla 4.3 Valores experimentales para la verificación del modelo.

$\text{Log}[a\text{Cl}_2\text{Ca}/a^2_{\text{H}}] (1-\alpha)_{\text{ef}}$	$\text{log}[a\text{Cl}_2\text{Ca}/a^2_{\text{H}}] (1-\alpha)_{\text{ef}}$	$\text{log}[a\text{Cl}_2\text{Ca}/a^2_{\text{H}}] (1-\alpha)_{\text{ef}}$	$\text{log}[a\text{Cl}_2\text{Ca}/a^2_{\text{H}}] (1-\alpha)_{\text{ef}}$	$\text{log}[a\text{Cl}_2\text{Ca}/a^2_{\text{H}}] (1-\alpha)_{\text{ef}}$	$\text{log}[a\text{Cl}_2\text{Ca}/a^2_{\text{H}}] (1-\alpha)_{\text{ef}}$	$\text{log}[a\text{Cl}_2\text{Ca}/a^2_{\text{H}}] (1-\alpha)_{\text{ef}}$	$\text{log}[a\text{Cl}_2\text{Ca}/a^2_{\text{H}}] (1-\alpha)_{\text{ef}}$
16.1273	0.1716	15.1959	0.2654	13.4100	0.8068	11.4146	0.9723
16.1273	0.1459	15.1959	0.2705	13.4100	0.9300	11.4146	1.1177
16.1273	0.1158	14.6417	0.5501	13.4100	0.7970	11.4146	0.9848
16.1273	0.1805	14.6417	0.4474	13.4100	0.6859	11.4146	0.9922
16.1273	0.1667	14.6417	0.4419	13.4100	0.6992	11.4146	0.9236
16.1273	0.1381	14.6417	0.5318	12.7148	1.0285	11.4146	0.8222
16.1273	0.1598	14.6417	0.5241	12.7148	0.9051	11.4146	0.7921
16.1273	0.1035	14.6417	0.5131	12.7148	0.8849	10.7157	1.0790
16.1273	0.0556	14.6417	0.4732	12.7148	1.0298	10.7157	0.9096
15.8843	0.2238	14.6417	0.4275	12.7148	0.9656	10.7157	1.0964
15.8843	0.1501	14.6417	0.3808	12.7148	0.9662	10.7157	0.9880
15.8843	0.1548	14.3733	0.6233	12.7148	0.9061	10.7157	0.9830
15.8843	0.2315	14.3733	0.5248	12.7148	0.7468	10.7157	0.9360
15.8843	0.1816	14.3733	0.5168	12.7148	0.8218	10.7157	0.8131
15.8843	0.1645	14.3733	0.6108	12.4142	1.0582	10.7157	0.8184
15.8843	0.1943	14.3733	0.5938	12.4142	0.9185	10.4147	1.0712
15.8843	0.1526	14.3733	0.6121	12.4142	0.9088	10.4147	0.9678
15.8843	0.1078	14.3733	0.5353	12.4142	1.1134	10.4147	0.9848
15.4091	0.3587	14.3733	0.4438	12.4142	0.9456	10.4147	1.1152
15.4091	0.2850	14.3733	0.4378	12.4142	1.0683	10.4147	0.9609
15.4091	0.2872	13.7065	0.7895	12.4142	0.9615	10.4147	1.0021
15.4091	0.3585	13.7065	0.6831	12.4142	0.7986	10.4147	0.9223
15.4091	0.3622	13.7065	0.6009	12.4142	0.8580	10.4147	0.9123
15.4091	0.3688	13.7065	0.8751	11.7156	1.0631	10.4147	1.1152
15.4091	0.3112	13.7065	0.7119	11.7156	0.9572	9.7157	1.0698
15.4091	0.2533	13.7065	0.7600	11.7156	0.9584	9.7157	0.9991
15.4091	0.2118	13.7065	0.7042	11.7156	1.0711	9.7157	1.0048
15.1959	0.4068	13.7065	0.6470	11.7156	1.0111	9.7157	1.1012
15.1959	0.3343	13.7065	0.6115	11.7156	1.0557	9.7157	1.0375
15.1959	0.3018	13.4100	0.9049	11.7156	0.9060	9.7157	1.0619
15.1959	0.4376	13.4100	0.7919	11.7156	0.8080	9.7157	0.9455
15.1959	0.3335	13.4100	0.7781	11.4146	1.0576	9.7157	0.8698
15.1959	0.3625	13.4100	0.9096	11.4146	0.9518	9.7157	0.8109
15.1959	0.3522						

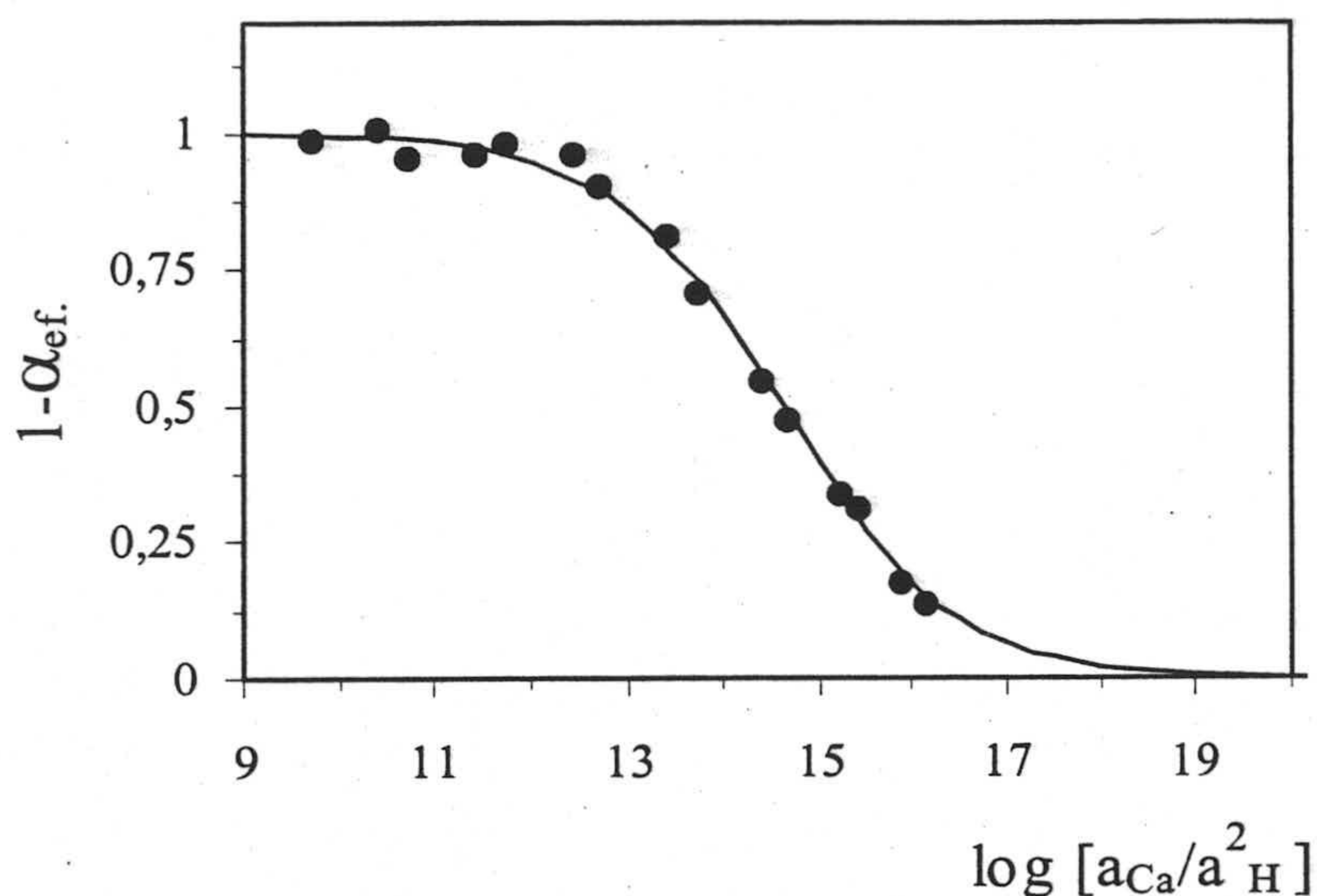


Figura 4.12. Modelo matemático (ec.4.5) y puntos experimentales

Como se comentó en la Introducción, la forma de la curva depende de diversos factores, uno de los cuales es la estequiometría de la reacción de intercambio. Para establecer una posible estequiometría se han representado en la Figura 4.12 las curvas teóricas que resultarían de suponer que el índice estequiométrico p ionóforo:calcio fuera 0,5, 1 ó 2. De la observación de la Figura 4.12 no se concluye ninguna estequiometría, pues la influencia de la estequiometría es muy pequeña sobre la curva teórica de este caso. Estos resultados experimentales concuerdan con lo señalado por Seiler y col.¹⁰ acerca de la pequeña diferencia que se observa en la función teórica para iones divalentes en comparación con lo que ocurre para iones monovalentes. Al objeto de sugerir una posible estequiometría, hacemos uso del ajuste de los puntos experimentales a la curva teórica. Para ello, usamos la suma de los cuadrados de la diferencia entre puntos experimentales y teóricos para las diferentes estequiometrías, tal y como muestra la ecuación 4.6.

$$\Sigma[(1-\alpha)_{teorico}-(1-\alpha)_{experimental}]^2 \quad (4.6)$$

¹⁰ Seiler, K. Morf, W.E., Rusterholz, B. y Simon, W. Anal. Sci., 5, 557 (1989).

Los resultados obtenidos son: $4,6 \cdot 10^{-3}$ ($p=1$); $5,2 \cdot 10^{-3}$ ($p=2$); $6,9 \cdot 10^{-3}$ ($p=3$) lo que podría sugerir una estequiometría 1:1 para el complejo calcio-ionóforo éter 18-corona-6.

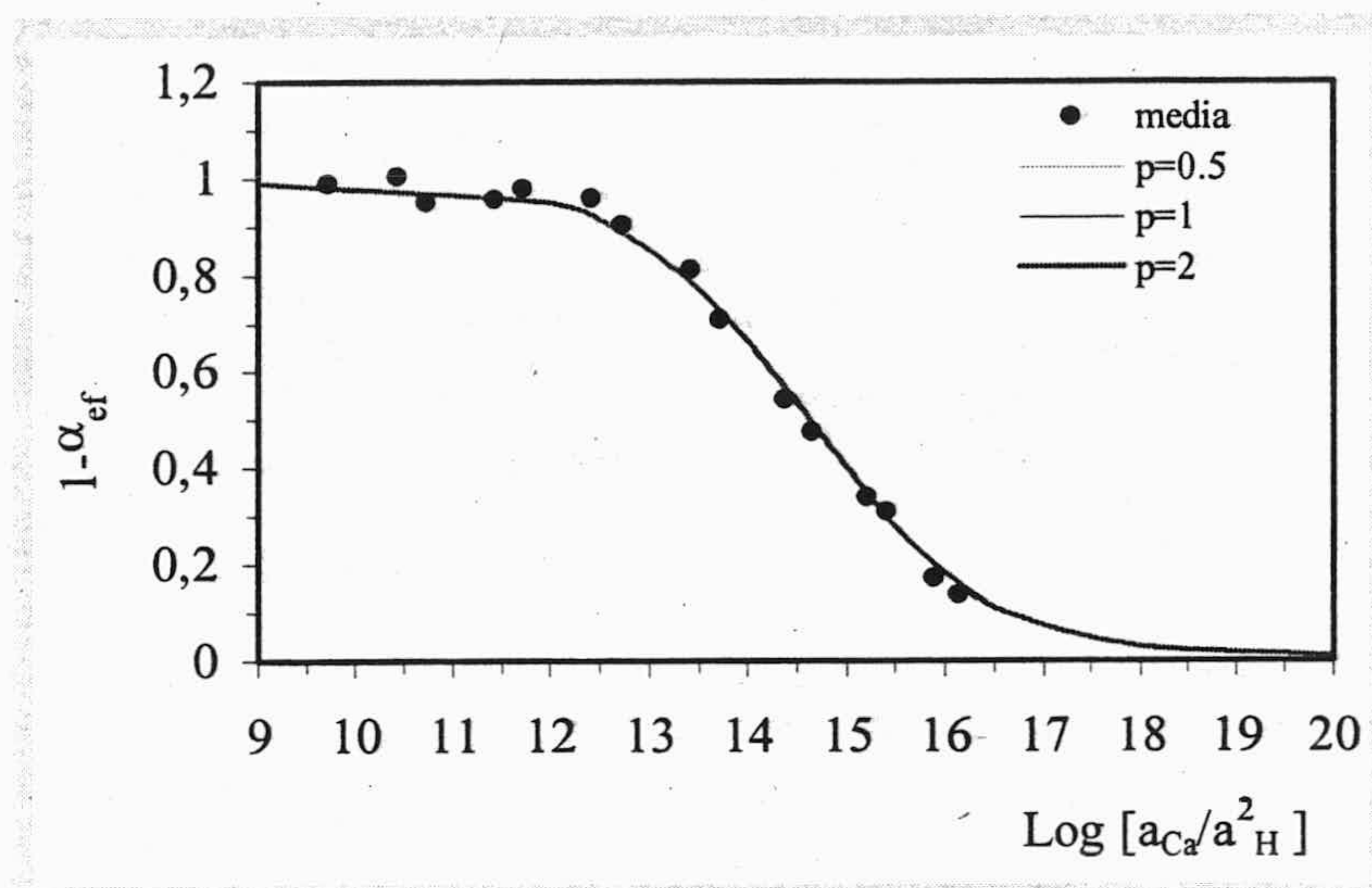


Figura 4.12. Estequiometría de la reacción de intercambio. Curvas teóricas: $p=2, 1, 0,5$.

Por otra parte, si ajustamos mediante mínimos cuadrados los puntos experimentales obtenidos en la zona de máxima pendiente, entre $2,57 \cdot 10^{-4}$ y $2,57 \cdot 10^{-2}$ se han ensayado ocho concentraciones diferentes con nueve réplicas para cada una, se obtiene un valor de $\log K_e^{CaL^{2+}}$ de 15,48.

4. Parámetros analíticos del sensor

4.1. Límite inferior y superior

La forma de calcular los límites inferiores y superiores así como la precisión y demás parámetros analíticos viene reflejada en el Capítulo 2 de la presente Memoria de Doctorado.

Como allí indicamos, el rango de medida de un sensor óptico ha sido definido en la bibliografía desde dos puntos de vista diferentes. A) como una relación lineal en el centro de la curva sigmoideal limitado a que la pendiente no varíe más de un 1% o 0,1%¹¹. Este enfoque es demasiado restrictivo y desperdicia información útil. B) Utilizando una relación no lineal, limitada por un límite superior y otro inferior, calculados según se explica en el apartado 4.2.5.2 del Capítulo 2^{11,12}. Sin embargo, nosotros hemos utilizado un ajuste a un modelo lineal en la zona central, aplicando un test de fallo de ajuste que nos proporciona dos ventajas como son la sencillez de cálculo y una interpolación con menos error. Los límites inferior y superior del rango de medida fueron calculados tal y como reza el apartado 4.2.5.2 del Capítulo 2.

Para establecer los límites inferior y superior, según acabamos de comentar, se prepararon dos series de patrones, uno en la zona de máxima pendiente formado por ocho estándares y nueve réplicas de cada uno; desde $2.6 \cdot 10^{-4}$ y $1.3 \cdot 10^{-1}$ en actividades ($5 \cdot 10^{-4}$ y 1 M en concentración) como se muestra en la tabla 4.4. La otra serie se establece en la zona independiente de la concentración y formado por 6 estándares y 9 réplicas de cada uno; desde $5.2 \cdot 10^{-8}$ y $2.6 \cdot 10^{-5}$ en actividades (10^{-7} y $5 \cdot 10^{-5}$ M en concentración) representados en la tabla 4.5. Cada réplica se mide con la misma tira reactiva.

El ajuste de cada serie se realiza por el método de regresión por mínimos cuadrados obteniéndose las funciones:

$$1-\alpha_{ef} = 0.9762 - 0.0032 \log \frac{a_{Ca^{2+}}}{a_{H^+}^2} \quad (4.8)$$

$$1-\alpha_{ef} = 3.8629 - 0.2311 \log \frac{a_{Ca^{2+}}}{a_{H^+}^2} \quad (4.9)$$

Con estos datos se calculó el límite inferior aplicando los diferentes criterios antes comentados. Los resultados se muestran en la Tabla 4.6

¹¹ Seiler, K. y Simon, W., Anal. Chim. Acta, 266, 73 (1992).

¹² E. Bakker, E., Bühlmann, P. y Pretsch, E., Chem. Rev., 97, 3083 (1997).

Tabla 4.4. Parejas de valores en la zona de máxima pendiente.

$\log[a_{\text{Cl}_2\text{Ca}}/a^2_{\text{H}}]$	$(1-\alpha)_{\text{ef}}$	$\log[a_{\text{Cl}_2\text{Ca}}/a^2_{\text{H}}]$	$(1-\alpha)_{\text{ef}}$	$\log[a_{\text{Cl}_2\text{Ca}}/a^2_{\text{H}}]$	$(1-\alpha)_{\text{ef}}$
13,4100	0,9049	12,4142	0,9615	10,7157	0,9880
13,4100	0,7919	12,4142	0,7986	10,7157	0,9830
13,4100	0,7781	12,4142	0,8580	10,7157	0,9360
13,4100	0,9096	11,7156	1,0631	10,7157	0,8131
13,4100	0,8068	11,7156	0,9572	10,7157	0,8184
13,4100	0,9300	11,7156	0,9584	10,4147	1,0712
13,4100	0,7970	11,7156	1,0711	10,4147	0,9678
13,4100	0,6859	11,7156	1,0111	10,4147	0,9848
13,4100	0,6992	11,7156	1,0557	10,4147	1,1152
12,7148	1,0285	11,7156	0,9060	10,4147	0,9609
12,7148	0,9051	11,7156	0,8080	10,4147	1,0021
12,7148	0,8849	11,4146	1,0576	10,4147	0,9223
12,7148	1,0298	11,4146	0,9518	10,4147	0,9123
12,7148	0,9656	11,4146	0,9723	10,4147	1,1152
12,7148	0,9662	11,4146	1,1177	9,7157	1,0698
12,7148	0,9061	11,4146	0,9848	9,7157	0,9991
12,7148	0,7468	11,4146	0,9922	9,7157	1,0048
12,7148	0,8218	11,4146	0,9236	9,7157	1,1012
12,4142	1,0582	11,4146	0,8222	9,7157	1,0375
12,4142	0,9185	11,4146	0,7921	9,7157	1,0619
12,4142	0,9088	10,7157	1,0790	9,7157	0,9455
12,4142	1,1134	10,7157	0,9096	9,7157	0,8698
12,4142	0,9456	10,7157	1,0964	9,7157	0,8109
12,4142	1,0683				

Tabla 4.5. parejas de valores para la zona de mínima pendiente.

$\text{Log}[a\text{Cl}_2\text{Ca}/a^2_{\text{H}}]$	$(1-\alpha)_{\text{ef}}$	$\log[a\text{Cl}_2\text{Ca}/a^2_{\text{H}}]$	$(1-\alpha)_{\text{ef}}$
16,1273	0,1716	15,1959	0,4068
16,1273	0,1459	15,1959	0,3343
16,1273	0,1158	15,1959	0,3018
16,1273	0,1805	15,1959	0,4376
16,1273	0,1667	15,1959	0,3335
16,1273	0,1381	15,1959	0,3625
16,1273	0,1598	15,1959	0,3522
16,1273	0,1035	15,1959	0,2654
16,1273	0,0556	15,1959	0,2705
15,8843	0,2238	14,6417	0,5501
15,8843	0,1501	14,6417	0,4474
15,8843	0,1548	14,6417	0,4419
15,8843	0,2315	14,6417	0,5318
15,8843	0,1816	14,6417	0,5241
15,8843	0,1645	14,6417	0,5131
15,8843	0,1943	14,6417	0,4732
15,8843	0,1526	14,6417	0,4275
15,8843	0,1078	14,6417	0,3808
15,4091	0,3587	14,3733	0,6233
15,4091	0,2850	14,3733	0,5248
15,4091	0,2872	14,3733	0,5168
15,4091	0,3585	14,3733	0,6108
15,4091	0,3622	14,3733	0,5938
15,4091	0,3688	14,3733	0,6121
15,4091	0,3112	14,3733	0,5353
15,4091	0,2533	14,3733	0,4438
15,4091	0,2118	14,3733	0,4378

Tabla 4.6. Límite inferior calculado según varios criterios

Método utilizado	Límite inferior
Dispersión ruido fondo (Capítulo II. 4.2.5.2-a1)	0,144 mM
Caída de pendiente a_2 (Capítulo II. 4.2.5.2-a2)	0,102 mM
Intersección de rectas (Capítulo II. 4.2.5.2-a3)	0,046 mM

El límite superior, que viene definido por el punto de corte entre la función lineal de máxima pendiente y el eje de abscisas, muestra aquí un valor de 519 mM. Por ello, el rango de medida estaría comprendido entre 0,046 mM y 519 mM, expresados ambos en actividades. Sin embargo, se ha optado por utilizar como límite superior 134 mM (1000 mM en concentración), ya que es el mayor valor de concentración ensayado (Figura 4.14).

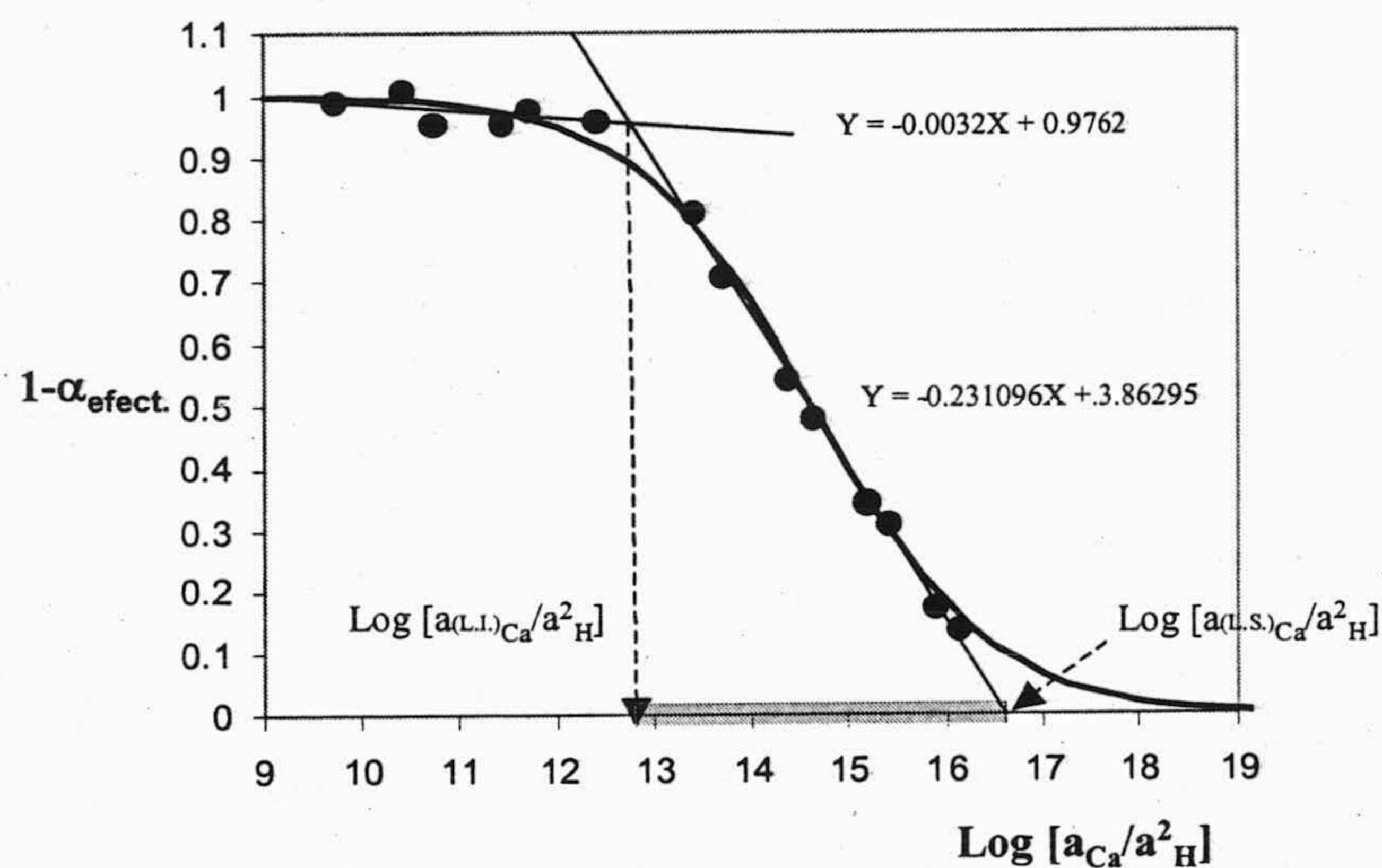


Figura 4.14. Límite superior (L.S.); límite inferior (L.I.) y rango de medida sombreado en verde.

4.2. Rango dinámico lineal

El rango dinámico lineal viene dado por la zona central de la curva de calibrado, la cual ha sido establecida como una recta mediante un ajuste por medio de mínimos cuadrados, verificando su correcto ajuste al modelo lineal mediante la aplicación del test de fallo de ajuste. El rango dinámico lineal esta acotado por sendos límites inferior y superior y por tanto está comprendido entre las actividades de calcio 0,045 y 134 mM.

4.3. Precisión

Para evaluar la precisión del procedimiento propuesto (expresada como la desviación estándar relativa) se realizó un estudio a tres niveles de actividad usando disoluciones de Ca (II) 0,26, 2,40 y 77,00 mM (0,5; 5,00 y 500 mM en concentración) que se encuentran situadas en la zona alta, media y baja de la función de calibrado.

Para cada una de estas concentraciones se realiza un doble estudio de la precisión: usando distintas membranas, esto es, la precisión intermembrana y usando una misma membrana, esto es, la precisión intramembrana.

a) Precisión intermembrana. En este caso se utilizan diez sensores diferentes con la misma composición óptima y se ponen en contacto con cada disolución de los diferentes niveles de concentración de calcio. En la Tabla 4.7 se muestran los resultados obtenidos.

Tabla 4.7. Reproducibilidad intramembrana del sensor de calcio

Actividad	log a_{Ca}									DER (%)
Baja	-3,244	-3,415	-3,202	-3,993	-3,838	-3,882	-3,235	-3,700	-3,339	8,9
Media	-2,420	-2,591	-2,543	-2,950	-2,931	-3,005	-2,555	-2,934	-2,522	8,5
Alta	-0,818	-1,077	-0,997	-1,276	-1,085	-1,191	-0,984	-1,146	-1,026	12,5

La repetibilidad del método usando diferentes sensores se determinó de la misma forma que antes, usando los mismos niveles de actividad anteriores y realizando diez réplicas de cada uno obteniéndose unos valores de 8,9, 8,5 y 12,5 % en términos de $\log a_{\text{Ca}^{2+}}$.

b) Precisión intramembrana. Se utiliza una sola membrana con la composición óptima establecida y se introduce por diez veces en cada disolución de las diferentes concentraciones de calcio estudiadas. Tras cada equilibrado con la disolución se trata la membrana con HCl 0,1 M para dejarla preparada para una nueva medida. Los resultados se recogen en la tabla 4.8.

Tabla 4.8. Reproducibilidad intramembrana del sensor de calcio

	$\log a_{\text{ca}}$										DER (%)
Baja	-3,459	-3,522	-3,328	-3,654	-3,606	-3,467	-3,579	-3,593	-3,639	-3,609	2,9
Media	-2,645	-2,662	-2,666	-2,665	-2,633	-2,657	-2,676	-2,777	-2,764	-2,854	2,7
Alta	-1,185	-1,099	-1,026	-1,076	-1,043	-0,948	-0,963	-1,209	-1,121	-1,184	8,5

La precisión usando la misma tira reactiva y expresada como desviación estándar relativa de diez réplicas realizadas a tres niveles diferentes de concentración de fue 2,9, 2,7 y 8,5 % en términos de $\log a_{\text{Ca}^{2+}}$. De este experimento se concluye no solo que las medidas son razonablemente reproducibles, sino también que el sensor de un solo uso desarrollado presenta un comportamiento reversible, pudiendo ser utilizado más de una vez.

4.4. Tiempo de vida.

El tiempo de vida de la tira sensora desarrollada se ha establecido ensayando de forma periódica su capacidad de respuesta. Para ello se preparó un conjunto de tiras reactivas con las que se procedió de la forma siguiente: se conservó cada tira en un tubo de plástico cerrado, alejado de la luz para evitar la fotodescomposición de los componentes de la membrana y evitando posible humedad. Cada semana se comprobó el estado de la misma

realizando un espectro previo y, a continuación, estableciendo su respuesta frente a una disolución de calcio 0,01 M. Posteriormente se trata con HCl 0,1 M, se lava con agua y se seca, siendo conservada de la misma forma. Tras el estudio se pudo concluir que las tiras sensoras desarrolladas tienen una duración máxima de un mes y medio.

4.5. Costo

El costo de cada sensor ha sido estimado utilizando el coste de cada uno de los componentes del sensor cuyos precios han sido obtenidos de los respectivos catálogos actualizados. Así pues, el costo es un estimado para el prototipo desarrollado que en ningún caso coincidiría con el costo estándar de una fabricación en serie. Como vemos en la tabla dicho costo es aproximadamente de 1 céntimo de euro.

En la tabla 4.10 podemos ver de forma resumida los valores de los distintos parámetros analíticos del sensor desarrollado.

Tabla 4.9. Costo total del sensor divididos por materia primas

Componente	Precio (€/mg ó €/ml)	Cantidad utilizada	Precio prorrateado
éter 18-corona-6	0.00242	0.0090 mg	0.00002178
Azul Nilo	0.06	0.0400 mg	0.0024
TCFB	0.1	0.0340 mg	0.0034
PVC	0.0001	0.5000 mg	0.00005
TBP	0.1	0.0126 mg	0.00126
THF	0.03	0.0200 ul	0.0006
Soborte Mvlar	0.00048	4.0000 cm ²	0.00192
Total			0.0097 €

Tabla 4.10. Parámetros analíticos.

Parámetro		Valor; S
Ordenada en el origen		3,863; 0,0895
Pendiente		-0,231; 0,0062
Nivel de probabilidad % (lack-of-fit test)		50,85
Límite inferior (mM)		0,046
Rango lineal (mM)		0,046 – 134
DER (%) ^a	0,26 mM ^b	2,9
Intrasensor	2,4 mM ^b	2,7
	77 mM ^b	8,4
DER (%) ^a	0,26 mM ^b	8,9
Intersensor	2,4 mM ^b	8,5
	77 mM ^b	12,5

a: DSR en términos de $\log a_{Ca^{2+}}$; b: Actividades

Por comparación de esta tira reactiva con la presentada en el Capítulo 3, basada en la formación de quelato con CPA III¹³, comprobamos que el rango de aplicación es sensiblemente mayor y que la precisión es similar a pesar de tratarse de una respuesta logarítmica y no lineal como en el caso anteriormente mencionado.

5. Procedimiento propuesto.

Se toma una alícuota de una disolución patrón conteniendo entre 0,046 y 134 mM de calcio en actividad (0,26 y 1000 mM en concentración), se coloca en una matraz de 50 ml y se le añaden 5 ml de una disolución reguladora dietanolamonio/dietanolamina $2 \cdot 10^{-2}$ M. de pH 8,5, enrasando con agua. Se toman 10,0 ml de la anterior disolución que se introducen en un tubo de polietileno de 10x1,5 cm. A continuación, se equilibra la membrana durante cinco minutos y sin agitación. Tras la equilibración se extrae la membrana, se sacude para eliminar

las gotas de disolución que la puedan mojar, y se mide la absorbancia a 659 nm. A continuación se equilibra la membrana con la misma disolución reguladora y, posteriormente con disolución de NaOH 0,01 M, midiendo en ambos casos la absorbancia a la misma longitud de onda. Con estos datos se calcula $1-\alpha_{ef}$. La estimación de la actividad en calcio se realiza mediante calibrado de $1-\alpha_{ef}$ frente a $\log a_{Ca^{2+}}$. Todas las medidas se realizan a temperatura ambiente. No es necesario acondicionar las membranas antes de su uso.

En el caso de muestras de agua, se introducen 9 ml de agua en un tubo de polietileno junto con 1 ml de tampón dietenolmanio/dietanolamina $2 \cdot 10^{-2}$ M. de pH 8,5, operando igual que antes.

6. Aplicaciones y Validación.

Con el objetivo de comprobar la utilidad y validez del procedimiento propuesto se aplicó este a muestras de agua de diversa procedencia (mineral, manantial, y aguas de abastecimiento urbano). En la Tabla 4.9 observamos los valores obtenidos por los procedimientos propuestos y de referencia, que es el de Espectroscopia de Absorción Atómica. Los valores reflejados en dicha tabla corresponden a la media de tres réplicas de cada muestra para cada uno de los métodos. También está incluida la desviación estándar de estas réplicas así como el valor P del test de comparación de medias, quien nos indica que, en todos los casos, no existe diferencia significativa entre los resultados obtenidos mediante la tira reactiva desarrollada y los obtenidos mediante el método de referencia, pues en todos los casos el valor $P_{value} > 5\%$.

¹³ Capitán-Vallvey, L.F., Alvarez de Cienfuegos-Gálvez, P. Fernández Ramos, M.D. y Avidad-Castañeda, R. Sens. Actuators B, 71, 140 (2000).

Tabla 4.9. Determinación de calcio en diferentes tipos de agua usando AAS como método de referencia

Muestra	Tira reactiva (mM Ca)	S	AAS (mM Ca)	S	P _{val} (%)
Agua urbana <i>Granada</i>	0,88	0,058	1,017	0,006	6,0
Agua mineral <i>Sierra Cazorla</i>	1,9	0,181	1,77	0,023	18,7
Agua mineral <i>San Vicente</i>	0,67	0,058	0,55	0,012	7,6
Agua mineral <i>Lanjaron</i>	0,70	0,096	0,67	0,023	77,3
Agua mineral <i>Villadrau</i>	0,86	0,054	0,76	0,012	8,8
Agua mineral <i>Monte Pinos</i>	2,4	0,148	2,28	0,020	19,3
Agua mineral <i>Fontvella</i>	0,96	0,083	0,94	0,020	33,1
Agua mineral <i>Fuente Liviana</i>	1,6	0,201	1,61	0,023	73,1
Agua mineral <i>Zambra</i>	2,2	0,388	2,27	0,012	71,2
Agua mineral <i>Solan de Cabras</i>	1,5	0,126	1,48	0,012	99,0
Agua de manantial <i>Berja</i>	1,84	0,046	1,68	0,023	21,1

CAPÍTULO 5
PREPARACIÓN Y
CARACTERIZACIÓN DE UN SENSOR
DE UN SOLO USO PARA LA
DETERMINACIÓN
DE CALCIO

CAPITULO 5

PREPARACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UN SENSOR DE UN SOLO USO PARA LA DETERMINACIÓN DE CALCIO

1. Introducción

El presente capítulo se centra en el desarrollo de un sensor de un solo uso para la determinación de Ca(II) basado en un sistema ionóforo-cromoionóforo y que emplea un nuevo ionóforo neutro selectivo para Ca (II) sintetizado por nosotros en el laboratorio, tal y como queda expuesto en el Capítulo 2.

La principal novedad que tiene este sensor respecto del descrito en el Capítulo 4, es el ionóforo utilizado, lo que nos ha permitido desarrollar un sensor cuyas aplicaciones han ido más lejos que las allí propuestas, permitiendo la determinación de calcio no solo en

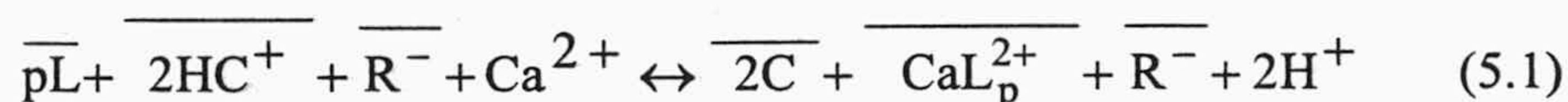
diferentes tipos de aguas, sino también la determinación en leche, como así lo demuestran los resultados obtenidos a lo largo de este capítulo. Así pues, aquí se describe el trabajo realizado para poner a punto y posteriormente caracterizar, una tira reactiva o sensor óptico de un solo uso reversible, que permite la determinación de calcio de forma rápida y selectiva.

Esta tira reactiva presenta una zona sensora compuesta por un ionóforo neutro selectivo para calcio como es el 4,13-[bis(N-adamantilcarbamoil)propionil]-1,7,10,16-tetraoxa-4,13,-diazaciclooctadecano (SPS1), un cromoionóforo como es el 1,2-benzo-7-(dietilamino)-3-octade-canoiliminofenooxazina, llamado azul Nilo y la sal lipofílica tetrakis (7-clorofenil)borato potásico. Como en el caso anterior, la tira reactiva desarrollada es transparente, de color rojo y responde de forma selectiva y rápida a la presencia de calcio.

Todas las variables experimentales que influyen o pueden influir en la respuesta de la tira reactiva han sido estudiadas y optimizadas, especialmente aquellas que afectan a la selectividad de la respuesta. Esta tira reactiva ha sido ensayada con muestras reales de aguas de diferente tipo, como son aguas urbanas, pozo, fuente y mineral y con leches de diferente contenido en calcio, tanto enteras como desnatadas. Los resultados obtenidos han sido contrastados y validados con un método de referencia.

Esta tira reactiva se basa en un mecanismo de intercambio catiónico entre una membrana orgánica de PVC plastificado y una fase acuosa que contiene el analito, tal como se ha descrito en la Introducción de esta Memoria de Doctorado. La membrana sensora de la tira reactiva contendrá un ionóforo selectivo para calcio L, un cromoionóforo selectivo para protones C, que originan las especies CaL_p^{2+} y HC^+ , respectivamente, y, además, una sal de anión lipofílico que permite ese intercambio iónico.

En la zona sensora en contacto con una disolución acuosa que contiene ión calcio tendrá lugar la siguiente reacción, suponiendo que la estequiometría del proceso es 1:p (M:L):



Como consecuencia, se producirá una transferencia de calcio desde la muestra problema a la membrana, en proporción a la razón de actividades de calcio a protones en disolución. La medida de la absorbancia de la forma protonada del cromoionóforo permitirá el cálculo del grado de protonación $1-\alpha$, que será el parámetro analítico, tal como hemos visto. Como ya se ha dicho, usaremos el grado de protonación en nuestras condiciones de trabajo, esto es, el grado de protonación efectivo $1-\alpha_{ef}$. La actividad en calcio en fase acuosa se relaciona con la constante de equilibrio del proceso $K_e^{CaL^{2+}}$, α_{ef} y la actividad en protones, a_{H^+} según la ecuación:

$$a_{Ca^{2+}} = \frac{1}{K_e^{CaL_p^{2+}}} \left(\frac{a_{H^+} \alpha_{ef}}{1 - \alpha_{ef}} \right)^2 \frac{C_R - (1 - \alpha_{ef})C_C}{2 \left(C_L - \frac{p}{2} (C_R - (1 - \alpha_{ef})C_C) \right)^p} \quad (5.2)$$

Donde como sabemos C_L es la concentración analítica de ionóforo, C_C de cromoionóforo y C_R de sal lipofílica. El ajuste del pH con una disolución reguladora de pH conocido permitirá la determinación de la actividad en calcio.

El cálculo del parámetro analítico utilizado que es el grado de protonación efectivo, $1-\alpha_{ef}$, se hace mediante la absorbancia del cromoionóforo presente en la tira reactiva tras haber estado en contacto con el problema. Como se ha dicho, el cromoionóforo que aquí usaremos es el azul Nilo lipofilizado, que es el mismo empleado en el Capítulo anterior, en el que desarrollamos una tira reactiva para calcio basada en un ionóforo comercial. Esto significa

que realizaremos las medidas de absorbancia a la misma longitud de onda, 659 nm. Además de esto, tendremos que medir la absorbancia A_C de la tira reactiva en contacto con una disolución de NaOH 0,01M y, por último, la absorbancia $A_{\text{tampón}}$ de la tira reactiva en contacto con la disolución reguladora usada. Con estos valores calcularemos el parámetro analítico $1-\alpha_{\text{ef}}$, según:

$$1-\alpha_{\text{ef}} = \frac{A - A_C}{A_{\text{tampón}} - A_C} \quad (5.3)$$

Estas medidas se realizan usando el tipo de soportes ya descritos en la Introducción, con lo que se mejora la reproducibilidad de las medidas, al medir en una zona con diámetro constante e inferior al diámetro de la zona activa del sensor.

2. Optimización de la respuesta de la tira reactiva

La respuesta óptica de la tira reactiva para calcio puede estar influida por dos grupos de factores: A) Parámetros relacionados con el diseño y composición de la membrana. Así tenemos los componentes del cóctel usado para la preparación de la membrana y sus proporciones, el volumen de cóctel usado para hacer la membrana y otras condiciones usadas. B) Parámetros relacionados con el proceso de equilibración de la muestra conteniendo el analito con la tira reactiva; así pH, tiempo de contacto y actividad de calcio.

Exponemos a continuación, de forma resumida, los experimentos realizados para conocer la influencia de estos factores y los valores de los mismos que originan la mejor respuesta.

2.1. Composición y preparación de la membrana

Para el establecimiento de la composición más adecuada de la membrana sensora se han seguido dos estrategias complementarias, ya antes indicadas. Ajustar, en primer lugar, la proporciones óptimas de ionóforo, anión lipofílico y cromoionóforo que originen la mejor respuesta y proporcionen la mayor selectividad a la membrana frente a iones interferentes, que serán magnesio y los iones alcalinos. A continuación, una vez fijada la proporción de esos componentes, se estudiará la cantidad de polímero formador de membrana, el PVC, y el tipo y cantidad de plastificante, mediante un estudio de la cinética del proceso de intercambio iónico entre disolución y membrana.

2.1.1. Selección de los reactivos

Para el desarrollo de esta tira reactiva de tipo óptico para la determinación de calcio basada en dos componentes, es necesario seleccionar un conjunto de reactivos que permitan que se dé la reacción de intercambio iónico entre el calcio presente en la disolución y los protones situados en la membrana.

Los reactivos necesarios son: 1) ionóforo selectivo para calcio, 2) ionóforo selectivo para protones o cromoionóforo; 3) sal de anión lipofílico que permita mantener cargas en la membrana lipofílica y posibilitar el intercambio iónico; 4) polímero formador de membrana y 5) disolvente de membrana o plastificante. Con todos estos reactivos se deberá preparar una membrana sobre un soporte inerte y ópticamente transparente, sobre el que se realizará la medida de absorción de radiación por transmisión.

Como soporte para la preparación de la membrana sensora se ha usado una lámina de 0,25 mm de politereftalato de etileno (Mylar) que es ópticamente transparente, inerte y estable en nuestras condiciones de trabajo. Para la formar la membrana sensora se preparado un cóctel con todos los componentes en un disolvente adecuado, como es el tetrahidrofurano, y depositar un volumen de ese cóctel sobre el soporte mediante un sistema centrífugo, permitiendo que una evaporación lenta del disolvente origine la membrana.

Como ionóforo se ha seleccionado un éter aza corona bipodal, en concreto el 4,13-[bis(N-adamantilcarbamoil)propionil]-1,7,10,16-tetraoxa-4,13,-diazaciclooctadecano, denotado con el acrónimo SPS1.

Se pensó en un principio en la posibilidad de aplicar este ionóforo a la determinación de magnesio y esa era la intención al diseñarlo, ya que su estructura es muy similar al 4,13-[bis(N-adamantilcarbamoil)acetil]-1,7,10,16-tetraoxa-4,13,-diazaciclooctadecano, denominado K22B5¹ y que se usará en el capítulo 7 de este Memoria para la determinación de dureza en aguas. La diferencia entre el ionóforo SPS1 y el K22B5 estriba en que los brazos que rodean al éter corona incorporan un grupo metileno (CH₂) más entre ambos grupos carboxilo (-CO-). De esta manera, se imita en esta parte de la estructura, la de otro ionóforo selectivo de Mg(II) como lo es el ETH 1117,² tal y como podemos observar en la Figura 5.1.

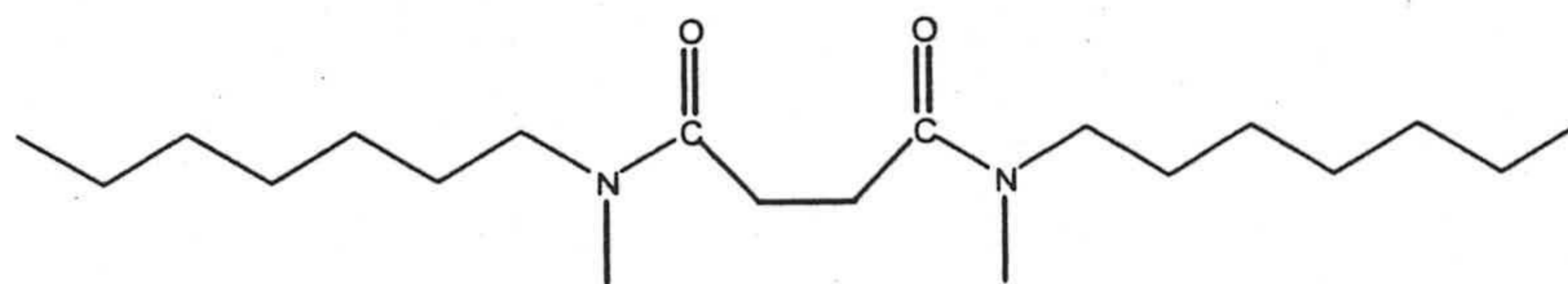


Figura 5.1. Estructura del ionóforo selectivo de Mg (II) ETH1117.

Sin embargo, una vez sintetizado y realizados los estudios necesarios, resultó ser un ionóforo altamente selectivo de Ca (II) frente a iones alcalinos y magnesio con unas adecuadas condiciones de lipofilicidad y tiempo de vida, como tendremos oportunidad de ver a lo largo del presente capítulo.

¹ Suzuki, K. Watanabe, K., Matsumoto, Y., Kobayashi, M., Sato, S. Siswanta, D. y H. Hisamoto, *Anal. Chem.*, 67, 324 (1995).

² Seki, A., Motoya, K., Watanabe, S. y Kubo, I., *Anal. Chim. Acta*, 382, 131 (1999).

Se trata pues, de un derivado diazacorona con un anillo de 18 miembros, con dos brazos laterales simétricos de tipo succinimida sustituidos ambos con grupos finales de tipo adamantilo (Figura 5.2).

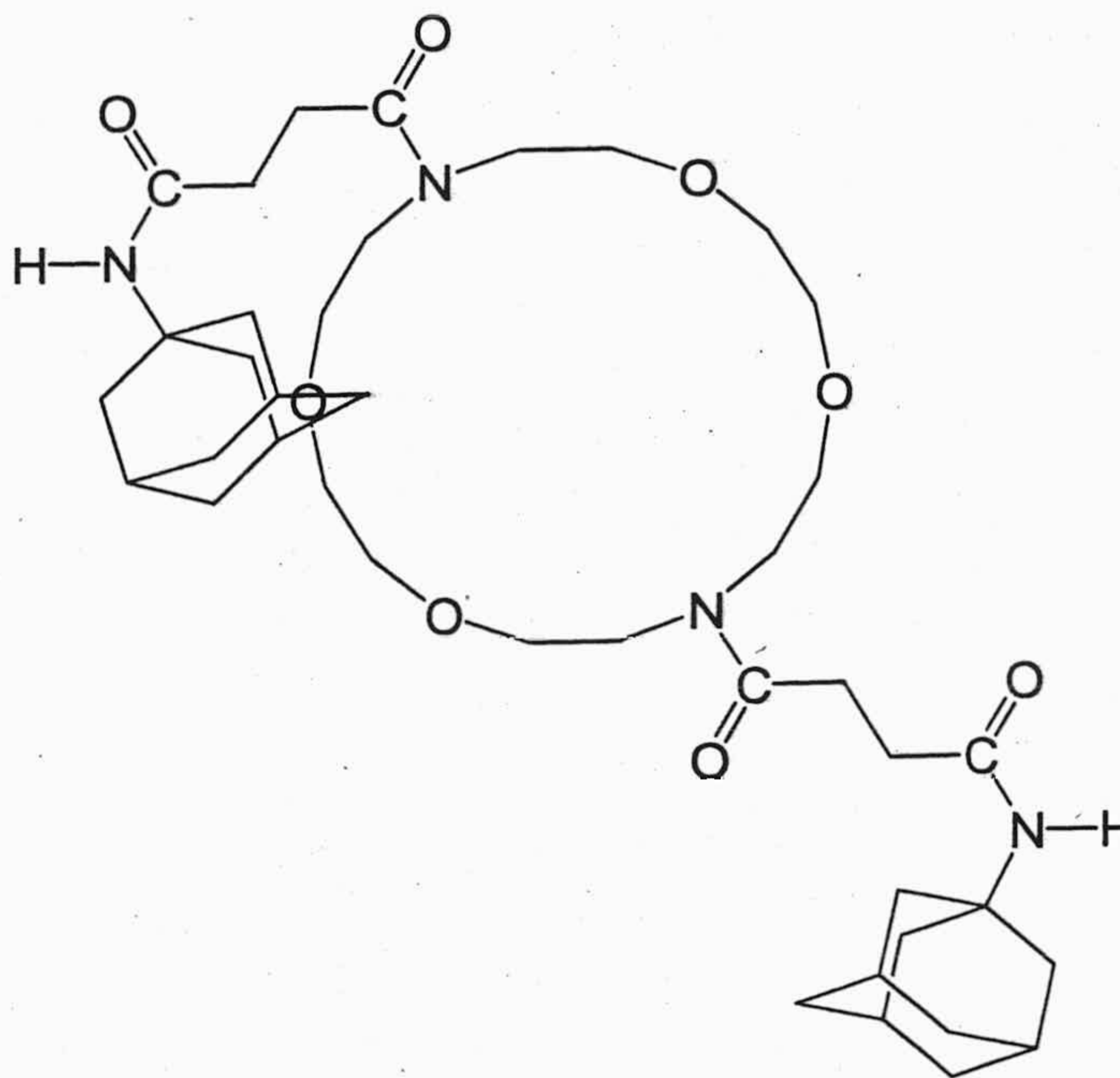


Figura 5.2. Estructura del ionóforo SPS1.

Se ha descrito en bibliografía que la presencia de grupos adamantilo, que son muy voluminosos, en los brazos laterales de derivados del diazacorona, incrementa de forma muy considerable la selectividad de tales ionóforos para calcio y magnesio. Así ocurre para el K23E5 para Ca(II) y con el K22B5 para magnesio. El éter azacorona bipodal K23E1 utilizado en electrodos selectivos de iones de membrana de PVC, muestra una selectividad para calcio frente a magnesio y cationes monovalentes suficiente como para permitir su aplicación en muestras reales sin que sean necesarios emplear métodos de enmascaramiento

de interferentes³. Es importante señalar que los datos de selectividad provenientes de estudios con electrodos selectivos de iones, esto es de sensores eléctricos, no son directamente extrapolables a sensores ópticos y menos aún cuando dichos sensores ópticos están basados en un segundo componente, pues estos utilizan el concurso de dos reacciones, complejación con ionóforo y desplazamiento de un indicador ácido-base, que ocurren en una membrana plastificada; mientras que los electrodos selectivos de membrana solo usan la reacción de complejación con el ionóforo. El balance de energía libre que señalará la extensión de la reacción como conjunto, es distinto en ambos casos.

Como cromoionóforo se ha elegido el azul Nilo lipofilizado, conocido como ETH 5294, pues en pruebas preliminares ofreció buenos resultados. De los diferentes tetrafenilboratos alcalinos ensayados como sal lipofílica, se mostró adecuado el tetrakis(7-clorofenil)borato potásico (TCFB), mientras que otras como el tetrakis(3,5-bis(trifluorometil)fenil)borato sódico no originó prácticamente respuesta.

El polímero formador de membrana utilizado es el cloruro de polivinilo y el plastificante fue elegido de entre los grupos habituales (éteres, ésteres de ácidos carboxílicos y ésteres del ácido fosfórico). Se probaron cuatro plastificantes diferentes tales como: tributilfosfato (TBP), tris(2-etilhexil)fosfato (TEHP), dioctilftalato (DOP) y bis(2-etilhexil)sebacato (DOS).

Para ello, se prepararon tiras reactivas que contenían 25,00 mg de PVC, 63,00 mg del plastificante correspondiente, 0,51 mg de la sal lipofílica tetrakis(7-clorofenil)borato potásico (TCFB), 0,48 mg de azul Nilo lipofilizado y 0,30 mg del ionóforo SPS1, todo ello disuelto en 1,0 ml de THF. Con 20 μ l de cada cóctel se prepararon tantas membranas como plastificantes se probaron, según se indica en el Capítulo 2. A continuación, se introdujo cada membrana en un tubo de plástico conteniendo 10 ml de disolución de Ca(II) 0,01 M a pH 8,5 ajustado con tampón Tris 0,2 M.

³ Suzuki, K., Watanabe, K., Matsumoto, Y., Kobayashi, M., Sato, S., Siswanta, D. Y Hisamoto, H., Anal. Chem., 67, 324 (1995).

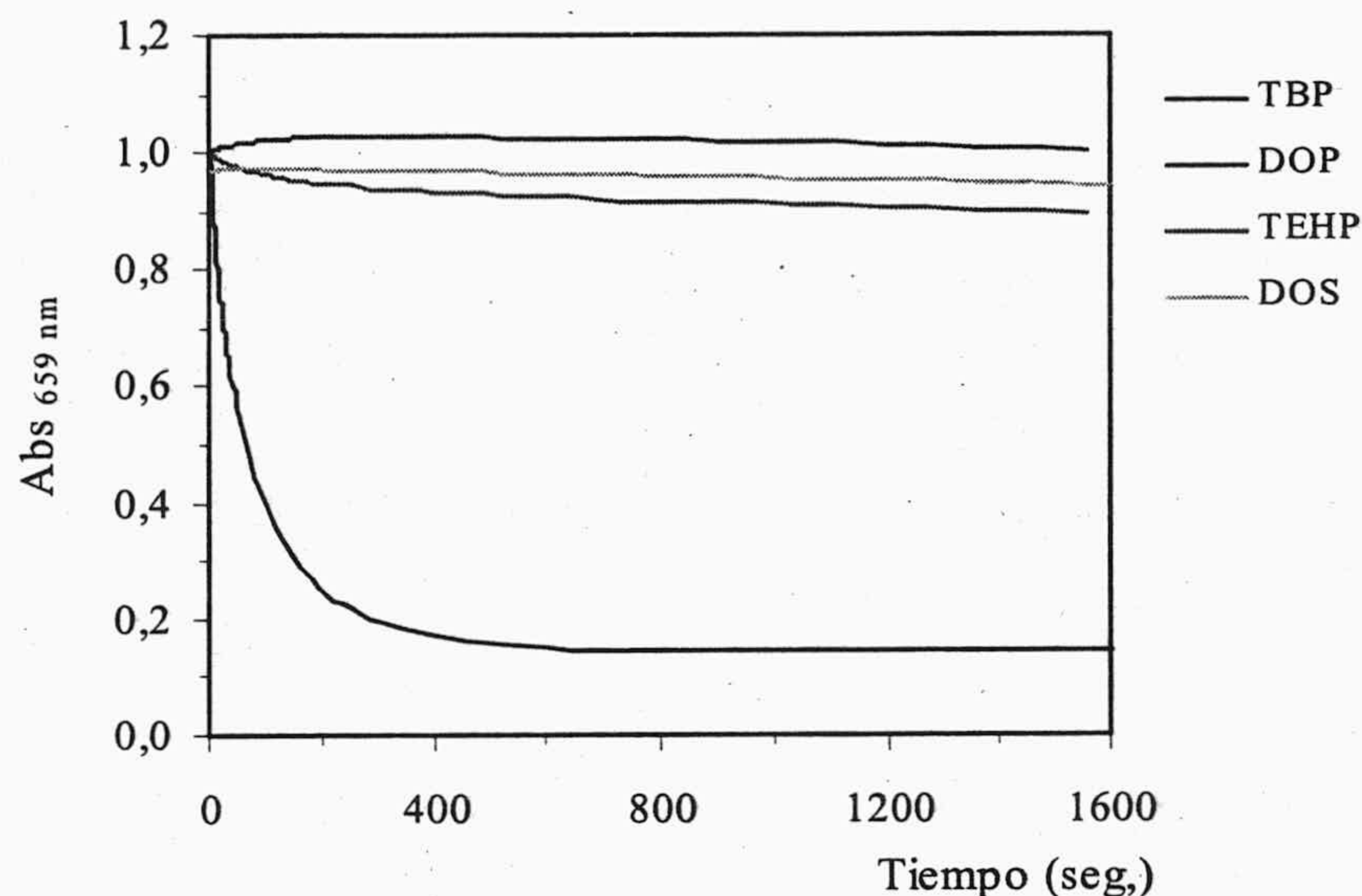


Figura 5.3. Influencia del plastificante sobre la respuesta del sensor a una disolución de Ca(II) 0,01M.

Como se puede observar en la Figura 5.3, el único plastificante eficaz y que produce una respuesta en el intervalo de tiempo estudiado es el TBP, pues transcurridos 400 segundos alcanza un 95% de la señal máxima, mientras que con TEHP el proceso de intercambio iónico se muestra extremadamente lento y es prácticamente nulo con el resto de los plastificantes ensayados.

2.1.2. Estudio de la proporción óptima anión lipofílico/ionóforo

Como se indicó en la Introducción, la proporción de sal lipofílica presente y, sobre todo, su relación con el ionóforo, tiene una gran importancia para lograr una adecuada selectividad frente a iones potencialmente interferentes.⁴

⁴ Zhang, W., Jenny, L. y Spichiger-Keller, U., Anal. Sci., 16, 11 (2000).

Como medida de la selectividad hemos usado el coeficiente de selectividad, K_{ij}^{opt} , coeficiente que se calcula mediante el método de las disoluciones separadas. Vendrá dado por el cociente de las actividades de los iones principal e interferente para un valor de $1-\alpha_{ef} = 0,5$.

Para determinar el coeficiente de selectividad y la influencia de la relación sal lipofílica/ionóforo, se prepararon un conjunto de membranas de un solo uso, en las que se varió dicho cociente entre un 50% y un 300%, si bien se comprobó que para valores inferiores al 150% la señal analítica disminuía de tal forma que se imposibilitaba la medida del coeficiente de selectividad. Así pues, se estudiaron detalladamente cuatro relaciones distintas: 150%, 200%, 250% y 300%. De cada proporción se prepararon tres membranas distintas.

La cantidad del cromoionóforo se mantuvo constante mientras que la proporción molar del anión lipofílico con respecto al ionóforo fue la que se varió. La cantidad de cromoionóforo utilizada fue, como en anteriores ocasiones, la necesaria para minimizar el error fotométrico de las medidas de absorbancia. De esta forma se fijó la concentración de cromoionóforo en membrana en 9,21 mmol de cromoionóforo por kilogramo de membrana.

Se prepararon series de disoluciones de calcio, magnesio, sodio y potasio con cinco niveles de concentración diferentes cada serie: $5 \cdot 10^{-4}$, $1 \cdot 10^{-3}$, $1 \cdot 10^{-2}$, $5 \cdot 10^{-2}$, $1 \cdot 10^{-1}$ M y con el valor de pH ajustado a 8,5 con una disolución reguladora de TRIS 0,2 M. Se analizó cada serie con una membrana, efectuando tres réplicas por serie, Cada membrana se introdujo en la disolución durante 5 minutos para asegurar la consecución del equilibrio y, a continuación, se midió la absorbancia y se establecieron las funciones $1-\alpha_{ef}$ vs $\log a_{I^{z+}}$, lo que permitió calcular los coeficientes de selectividad.

$$k_{IJ}^{opt} = \frac{v K_e^{JLq}}{z K_e^{ILp}} \left(\frac{a_{H^+} \alpha}{1-\alpha} \right)^{z-v} \frac{\left(C_L - \frac{q}{v} C_R - (1-\alpha) C_C \right)^q}{\left(C_L - \frac{p}{z} C_R - (1-\alpha) C_C \right)^p} \quad (5.4)$$

Tal y como quedó explicado en la Introducción, el coeficiente de selectividad está directamente relacionado con $1-\alpha$ y gráficamente se corresponde con la distancia que separa la función de calibrado del analito y de la del interferente, sin embargo en esta Memoria de Doctorado se han determinado los coeficientes de selectividad de modo matemático, según la expresión:

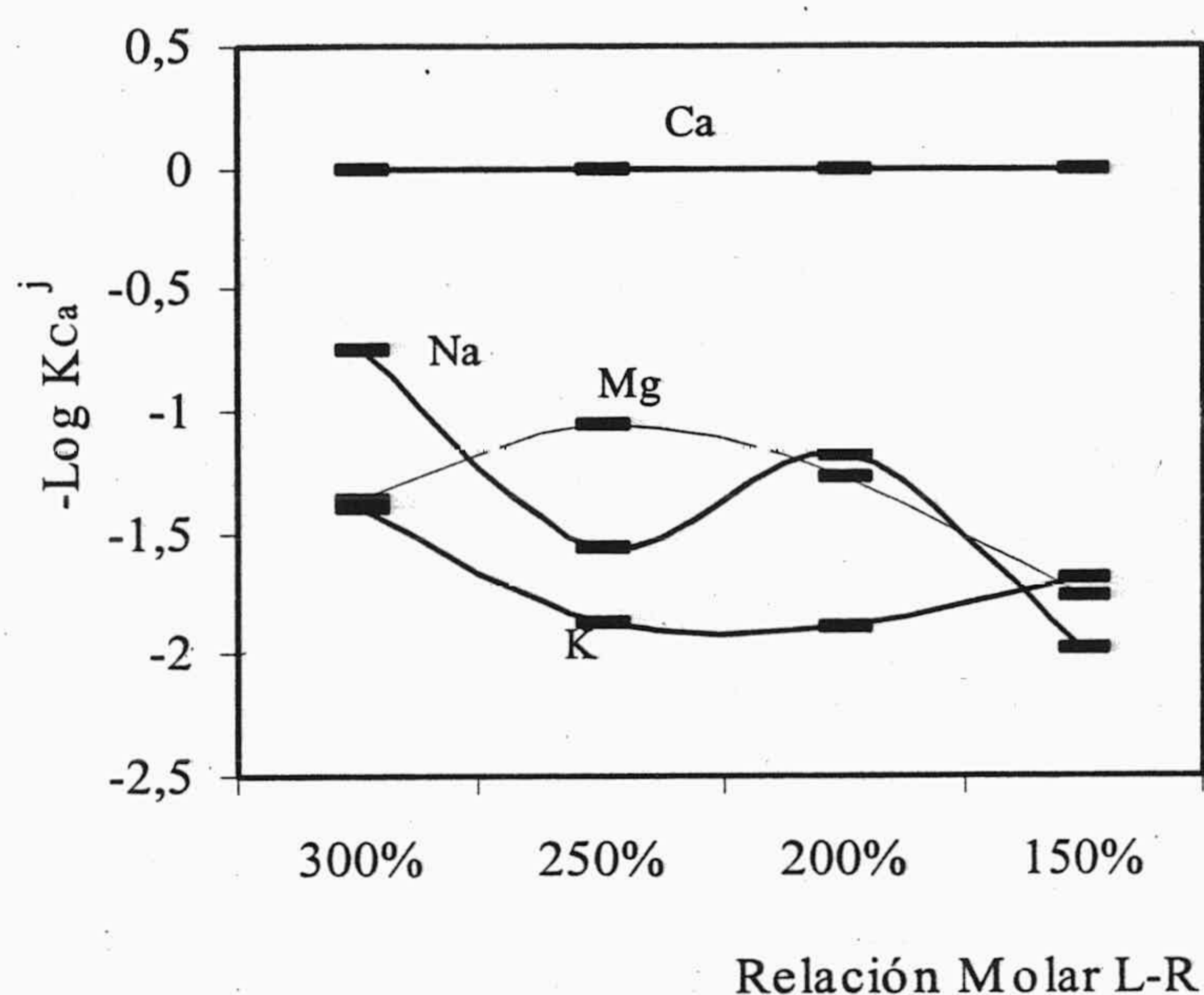


Figura 5.4. Valores de coeficientes de selectividad en función de la relación molar L-R

En la Tabla 5.1 se recogen los valores de los coeficientes de selectividad calculados para cada cociente de anión lipofílico a ionóforo ensayado. La evolución de la selectividad se puede observar en la Figura 5.4. Si bien es a 150% donde se observa una mayor discriminación entre Ca (II) y metales alcalinos y Mg (II), sin embargo, tal como nos indica la Figura 5.5, la señal analítica es sensiblemente menor que para otras relaciones. Por ello, se decidió estudiar la influencia del pH a dos relaciones molares: a relación 250 % que donde se obtiene una señal analítica máxima y a 150% donde se obtiene una mayor selectividad.

Tabla 5.1. Valores de los coeficientes de selectividad en función de la relación molar anión lipofílico/ionóforo

R%	$-\log K_{Ca,Mg}$	$-\log K_{Ca,Na}$	$-\log K_{Ca,K}$
150	-1,766	-1,974	-1,679
200	-1,277	-1,174	-1,883
250	-1,052	-1,554	-1,860
300	-1,365	-0,740	-1,399

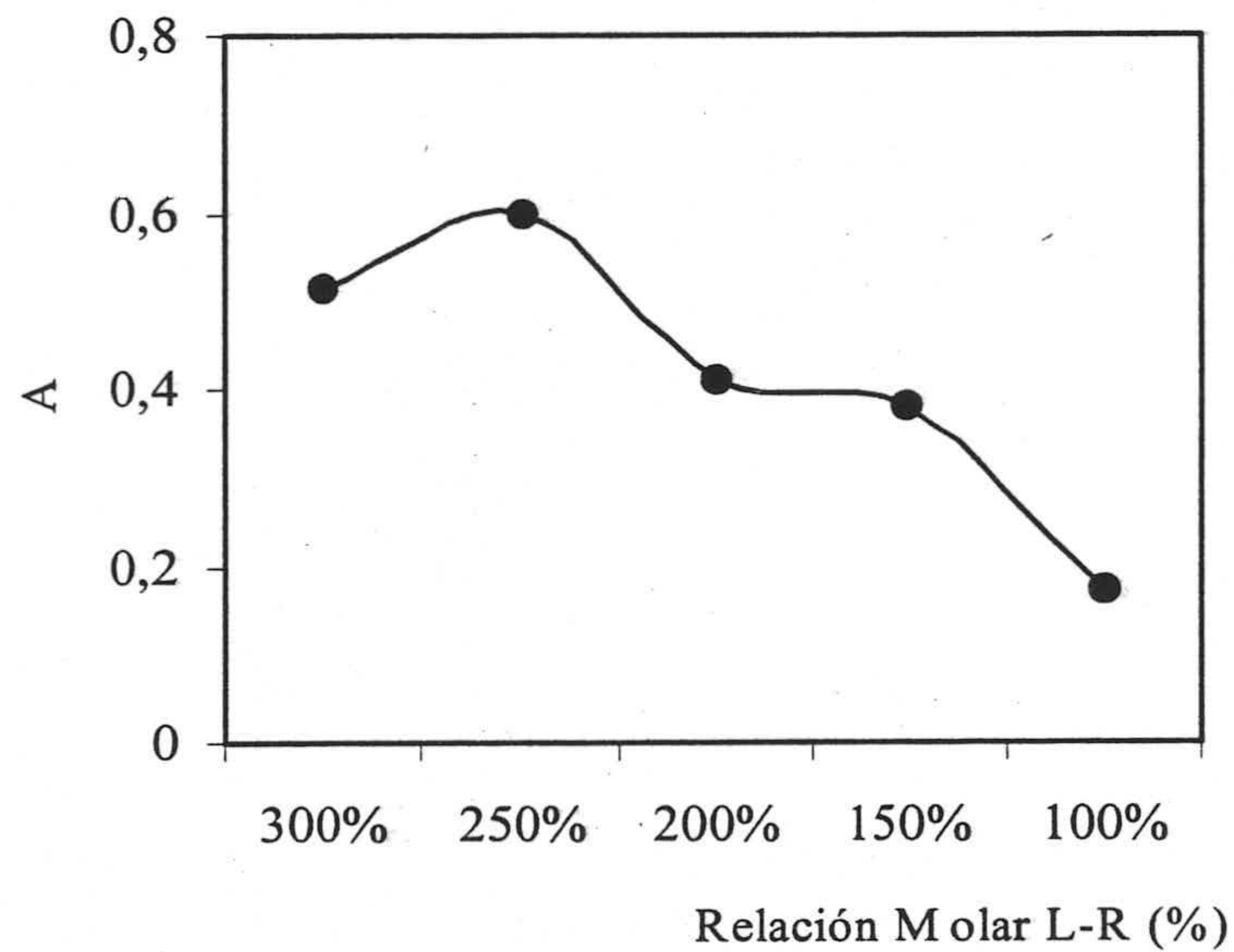


Figura 5.5. Variación de la señal analítica relativa en función de la relación molar L-R.

2.1.3. Influencia del porcentaje de plastificante

El estudio de la proporción óptima del plastificante tributilfosfato, se llevó a cabo observando como se modifican tanto las propiedades físicas de la membrana, como la cinética de la reacción heterogénea de intercambio iónico; pues un aspecto esencial en estos

ensayos rápidos es la velocidad de respuesta, la que depende principalmente del tipo y proporción de plastificante presente .

Para ello, se prepararon cuatro cócteles con porcentajes de TBP que se modifican desde un 50 a un 80%, con respecto a los demás componentes de la membrana. Además todas esas disoluciones contenían 25,00 mg de PVC, 0,51 mg de sal lipofílica TCFB, 0,48 mg de cromoforo azul Nilo y 0,30 mg del ionóforo SPS1 en 1,0 ml de THF. Tras preparar las membranas, se registró la cinética de la reacción heterogénea, que puede verse en la Figura 5.6.

Observamos que utilizando una proporción de 50% de TBP en peso, tarda 10 minutos en alcanzarse el equilibrio, tiempo que se ve sensiblemente reducido con proporciones mayores de plastificante, tales como 60, 70 u 80 %. Si bien cuando usamos un 80 % de TBP, las propiedades físicas de la zona activa son muy deficientes y el tiempo de preparación aumenta hasta 1 hora. Por otra parte, el comportamiento de la membrana no es poco reproducible. Por todo ello, fue establecida como proporción óptima de plastificante un 70%.

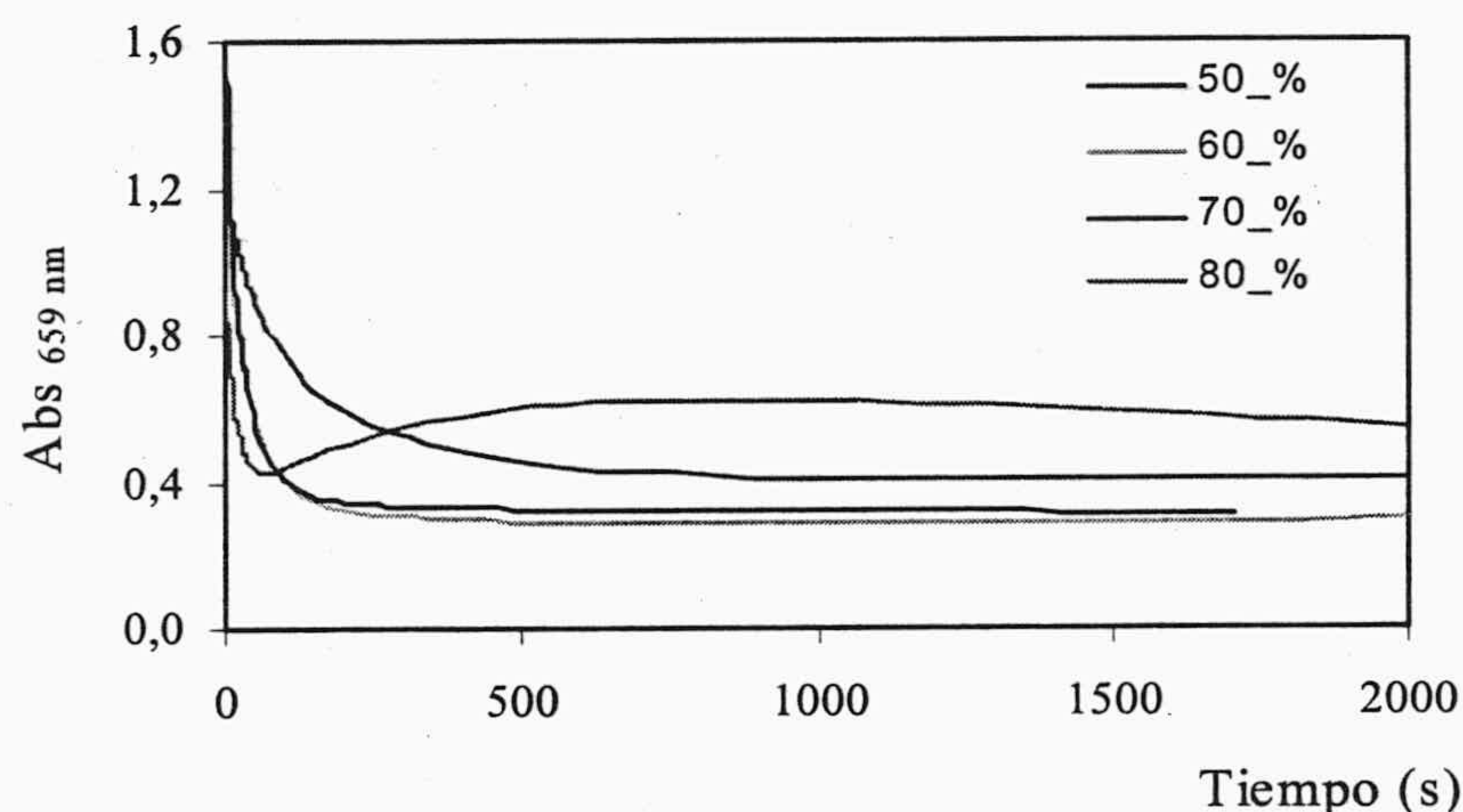


Figura 5.6. Influencia del porcentaje de plastificante TBP sobre el tiempo de respuesta

Por último, los tiempos de respuesta obtenidos coinciden razonablemente con los esperados teóricamente para la difusión de calcio dentro de una membrana de PVC plastificada de 5,6 μm de espesor^{5,6,7}

En conclusión, al haberse optimizado todas los diversos componentes, ionóforo, cromoionóforo, sal lipofílica y plastificante, la única variable de composición restante, el PVC, queda condicionada a un 28%.

2.1.4. Influencia del volumen de tetrahidrofurano

Para establecer la cantidad de THF óptima, se prepararon cuatro cócteles con cantidades fijas de todos los componentes de la membrana, aunque disueltas en cantidades diferentes de disolvente, desde 0,5 a 2,0 ml. Una vez preparadas se realiza un estudio cinético como el anteriormente comentado

En el caso de usar 0,5 ml de THF la señal analítica no es estable, mientras que con 2,0 ml las señales son bajas, por lo que se descartan ambas. Con 1,5 ml las señales son mayores, pero el tiempo de respuesta también es mayor. Con 1,0 ml la señal es mayor que en el caso anterior y el tiempo de respuesta es de 4 minutos. Por lo tanto se eligió como volumen óptimo 1,0 ml de THF.

2.1.5. Influencia del volumen de cóctel.

Se realizó un estudio de la influencia de la cantidad de cóctel que se utiliza para preparar la zona sensora de la tira reactiva. Como en el capítulo anterior se prepararon diversas membranas usando volúmenes que varían entre 10 y 25 μl . Los volúmenes entre 10 y 25 μl son los que conducen a valores de absorbancia mayores y similares, aunque cuanto

⁵ E. Bakker, P. Bühlmann and E. Pretsch, *Chem. Rev.*, 97, 3083, (1997).

⁶ K. Seiler, W.E. Morf, B. Rusterholz and W. Simon, *Anal. Sci.*, 5, 557, (1989).

⁷ M. Lerchi, F. Orsini, Z. Cimerman, E. Pretsch, D. Chowdhuey y F. Kamata, *Anal. Chem.*, 68, 3210, (1996).

mayor es el volumen, mayor es el tamaño de gota y estas presentan mayor homogeneidad. Se selecciona un volumen de 20 μl pues necesita menos cóctel y da buena respuesta. Volúmenes superiores a 25 μl desbordan el ancho del soporte plástico e inferiores a 10 μl originan una zona sensora de diámetro inferior al haz de radiación del espectrofotómetro.

2.1.6. Influencia de la velocidad de rotación.

Al igual que el volumen utilizado, la velocidad de rotación afecta al diámetro de la zona activa, pero afecta de modo diferente al espesor, ya que para un mismo volumen de cóctel, un aumento en las revoluciones conlleva un aumento en la fuerza centrífuga que hace aumentar el diámetro de la zona activa y disminuir el espesor de la misma.⁸ Esta variable no solo afecta a la señal analítica, sino también a la homogeneidad de la zona activa, propiedad de gran importancia para obtener una reproducibilidad aceptable. La velocidad de giro utilizada fue de 170 r.p.m.

2.1.7. Sistema usado para la evaporación del disolvente.

Como se ha señalado en capítulos anteriores, la forma en que se lleva a cabo la evaporación del disolvente tiene una gran influencia en la homogeneidad de la zona activa. Se ha comprobado que la evaporación lenta en una atmósfera saturada en vapores del disolvente es la que origina membranas con mayor reproducibilidad. En concreto, se observó que los mejores resultados se obtuvieron dejando evaporar el disolvente durante 30 segundos mientras que el plato giratorio se encontraba rotando, transcurrido el cual se deja reposar en un recipiente con una atmósfera saturada de THF a temperatura ambiente.

2.1.8. Preparación de la membrana.

Como consecuencia del estudio anterior se propone la siguiente receta operatoria para la preparación de tiras reactivas para calcio. El cóctel se obtiene pesando 25,0 mg (28,0 %

⁸ Seiler, K. y Simon, W., Anal. Chim. Acta, 266, 73 (1992).

p/p) de PVC, 63,00 mg (70,6 % p/p) de tributilfosfato, 0,30 mg (0,3 % p/p) de 4,13-[bis(N-adamantilcarbamoil)propionil]-1,7,10,16-tetraoxa-4,13,-diazaciclooctadecano, 0,48 mg (0,5 % p/p) de azul de Nilo lipofilizado y 0,50 mg (0,6 % p/p) de tetrakis(7-clorofenil)borato potásico en un vial de vidrio y disolviéndolos en 1,0 ml de tetrahidrofurano. Se depositan 20 μl de ese cóctel sobre una lámina de poliéster de 14 mm \times 40 mm \times 0,25 mm de espesor con ayuda de un sistema centrífugo. Tras dejar la membrana a vacío y a temperatura ambiente durante 3 minutos, para permitir una lenta evaporación del disolvente, se obtiene una película circular sólida, homogénea, adherida al soporte sólido, transparente y de color rojo. Las dimensiones de la zona sensora son de 6 mm de diámetro y 7 μm de espesor. La concentración de ionóforo, cromoionóforo y anión lipofílico en el sensor seco son de 4,61 mmol kg⁻¹, 9,21 mmol kg⁻¹ y 11,56 mmol kg⁻¹, respectivamente.

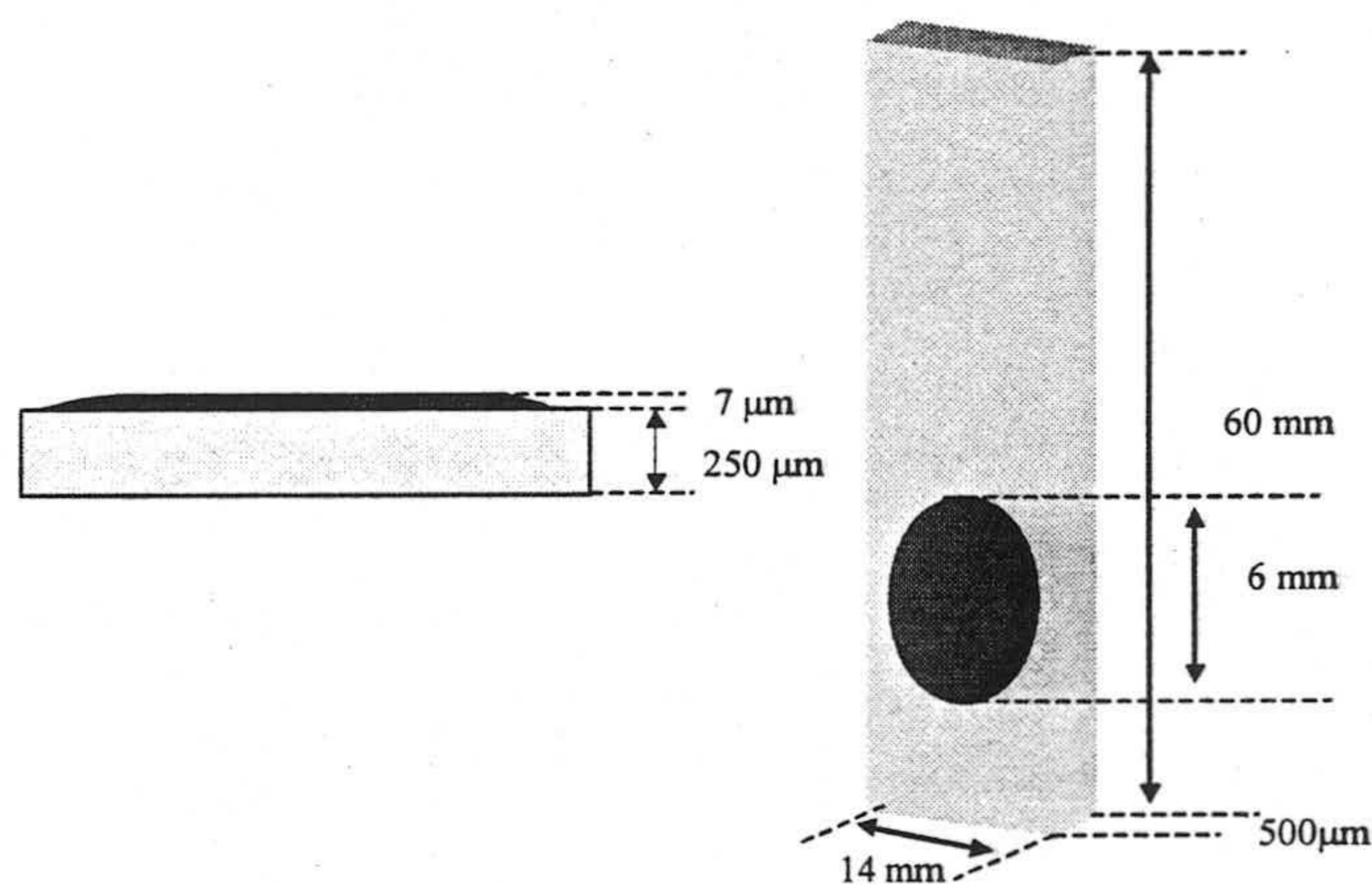


Figura 5.7. Esquema de la tira reactiva para Ca(II) basada en el ionóforo SPS1

En la Figura 5.7 podemos observar las dimensiones y características físicas del sensor, tal y como fue diseñado para su uso y registro de la señal analítica con la instrumentación mencionada en el Capítulo 2.

Tabla 5.2. Componentes y proporciones de la zona sensora

Componente	%	Cantidad	Unidad
SPS1	0.34	0.34	mg
TCFB	0.56	0.51	mg
Azul Nilo lip.	0.54	0.48	mg
TBP	70.56	63.00	mg
PVC	28.00	25.00	mg

2.2. Parámetros relacionados con el proceso de equilibración

Los parámetros relacionados con el proceso de equilibración entre la muestra conteniendo analito y la tira reactiva que se han estudiado son pH, tiempo de contacto y actividad en calcio.

2.2.1. Influencia del pH.

Como ya se ha señalado, el valor del parámetro analítico que estamos usando $1-\alpha_{ef}$, depende del cociente de actividades entre calcio y protones y tiene influencia sobre diversos aspectos relacionados con estos sensores, entre ellos, con la forma de la curva respuesta y con la sensibilidad.

Así pues, se estudió la evolución de la selectividad en función del valor de pH para dos valores de relación molar L-R: 250 % que como vimos origina la máxima señal analítica y 150% que origina la máxima selectividad frente a alcalinos y magnesio.

Para ello, se prepararon diferentes membranas con la misma composición: 25,00 mg de PVC, 63,00 mg de TBP, 0,30 mg de SPS1, 0,48 mg de azul de Nilo lipofilizado y 0,50 mg TCFB, y se ponen en contacto con disoluciones de Ca(II), Mg(II), Na(II), K(II) a seis niveles de concentración diferentes. Con los valores de absorbancia obtenidos se calculó $1-\alpha_{ef}$ y los

demás parámetros necesarios para calcular el coeficiente de selectividad tal como se ha explicado con anterioridad. La tabla 5.3 muestra los valores obtenidos.

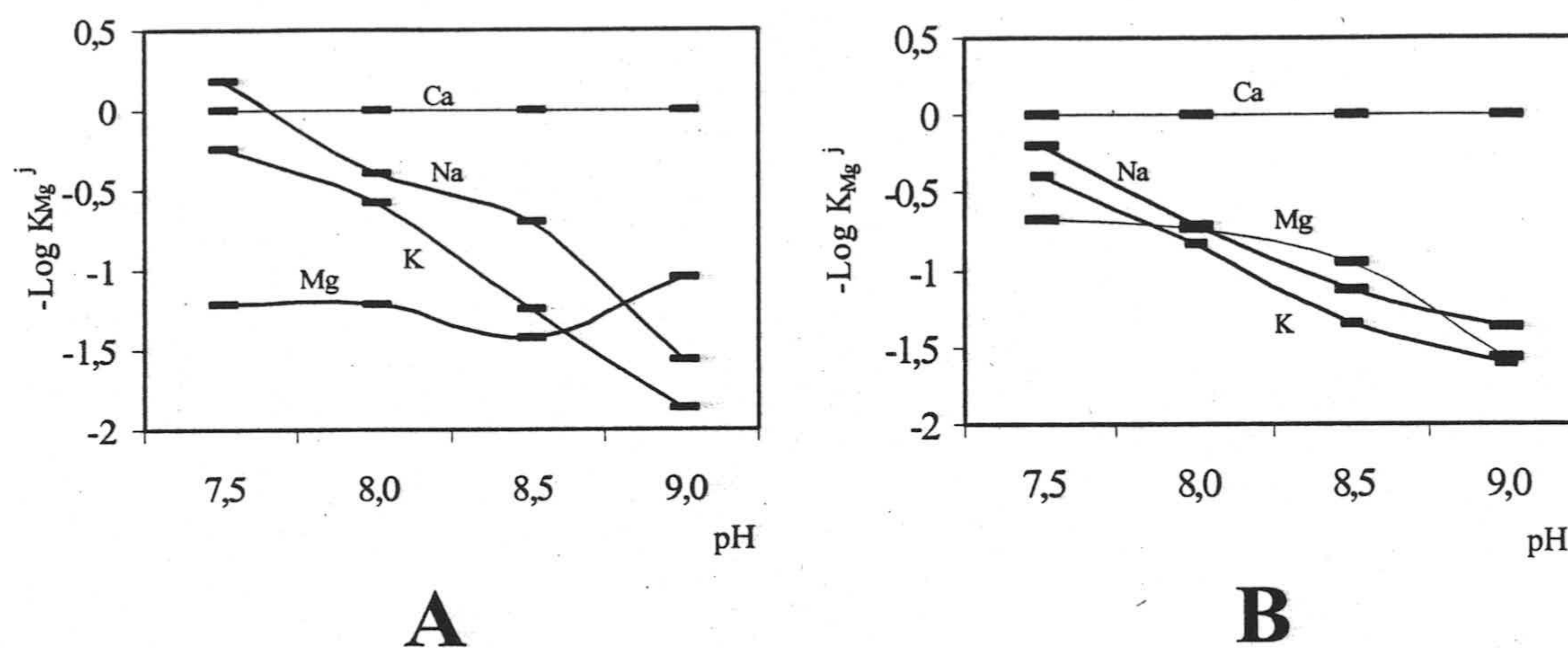


Figura 5.8. Evolución del coeficiente de selectividad en función del pH para diferentes relaciones molares L-R: A) 250 %; B) 150%

Los datos representados en la Figura 5.8, demuestran que variando el pH de la disolución de trabajo varía sustancialmente la selectividad, pues al aumentar el pH aumenta el coeficiente de selectividad. Este hecho nos permite adaptar las condiciones de medida a un problema concreto, según que los interferentes mayoritarios sean alcalinos o alcalinotérreos, y todo ello utilizando el mismo sensor. Se obtienen mejores valores de coeficiente de selectividad, especialmente para magnesio, cuando se utiliza una relación molar de 150%.

Por ello, en el desarrollo del sensor que se describe en el presente capítulo se ha optado por usar una relación molar L-R de 250% y un pH 8,5. Utilizando estos valores obtenemos una solución de compromiso entre señal analítica y selectividad.

Tabla 5.3. valores de los coeficientes de selectividad a diferentes valores de pH y relación L-R

pH	L-R 150%				L-R 250%			
	7,5	8,0	8,5	9,0	7,5	8,0	8,5	9,0
K	-0,392	-0,825	-1,347	-1,607	-0,243	-0,571	-1,245	-1,860
Na	-0,194	-0,716	-1,118	-1,375	0,178	-0,397	-0,698	-1,554
Ca	0	0	0	0	0	0	0	0
Mg	-0,668	-0,736	-0,939	-1,564	-1,216	-1,206	-1,421	-1,052

2.2.2. Selección de la disolución amortiguadora.

Para elegir la disolución reguladora de pH 8,5 más adecuada para la determinación de calcio se ensayaron tres tampones diferentes. Estos fueron: 1) ácido bórico/borato sódico 0,2 M; 2) dietanolamónio/dietanolamina 0,2 M y 3) Tris 0,2 M. Con los tres tampones se obtiene una buena respuesta a pH 8,5 pero se diferencian en una serie de características. En el caso del ácido bórico se produce interferencia en la señal debido al ión Na(I) presente, pues el borato presente lo está como borato sódico. El tampón dietanolamónio/dietanolamina presenta poca estabilidad, deteriorándose rápidamente con el tiempo. Por último, el tampón Tris no origina interferencia y es estable. Por lo tanto, se elige como adecuado para llevar a cabo esta determinación. Para optimizar la concentración del tampón elegido, se ensayan concentraciones 0,1, 0,2 y 0,3 M. Para una concentración 0,1 M no hay suficiente capacidad amortiguadora para todas las concentraciones ensayadas y para 0,3 M la disolución presenta interferencias en la señal; es decir, se observa un aumento del ruido en las medidas de absorbancia. Sin embargo, para una concentración 0,2 M hay buena capacidad amortiguadora y no hay interferencias, siendo, por tanto, seleccionada.

2.2.3. Influencia de la actividad de calcio. Verificación del modelo.

Para estudiar la influencia de la actividad de calcio sobre la respuesta de la tira reactiva se preparan membranas que presentan la composición antes señalada como óptima. Dichas membranas se ponen en contacto con disoluciones de calcio, a pH 8,5 ajustado con tampón Tris 0,2 M, de concentraciones que van desde $1,35 \cdot 10^{-1}$ M y $7,41 \cdot 10^{-8}$ M en actividades (1 M y 10^{-7} M en concentraciones). En la Tabla 5.4 se muestran los valores de $1-\alpha_{ef}$ obtenidos y en la Figura 5.9 se representan dichos resultados. Cada punto en esa figura corresponde a cada una de las nueve réplicas realizadas por nivel de concentración (tres sensores por tres réplicas por sensor).

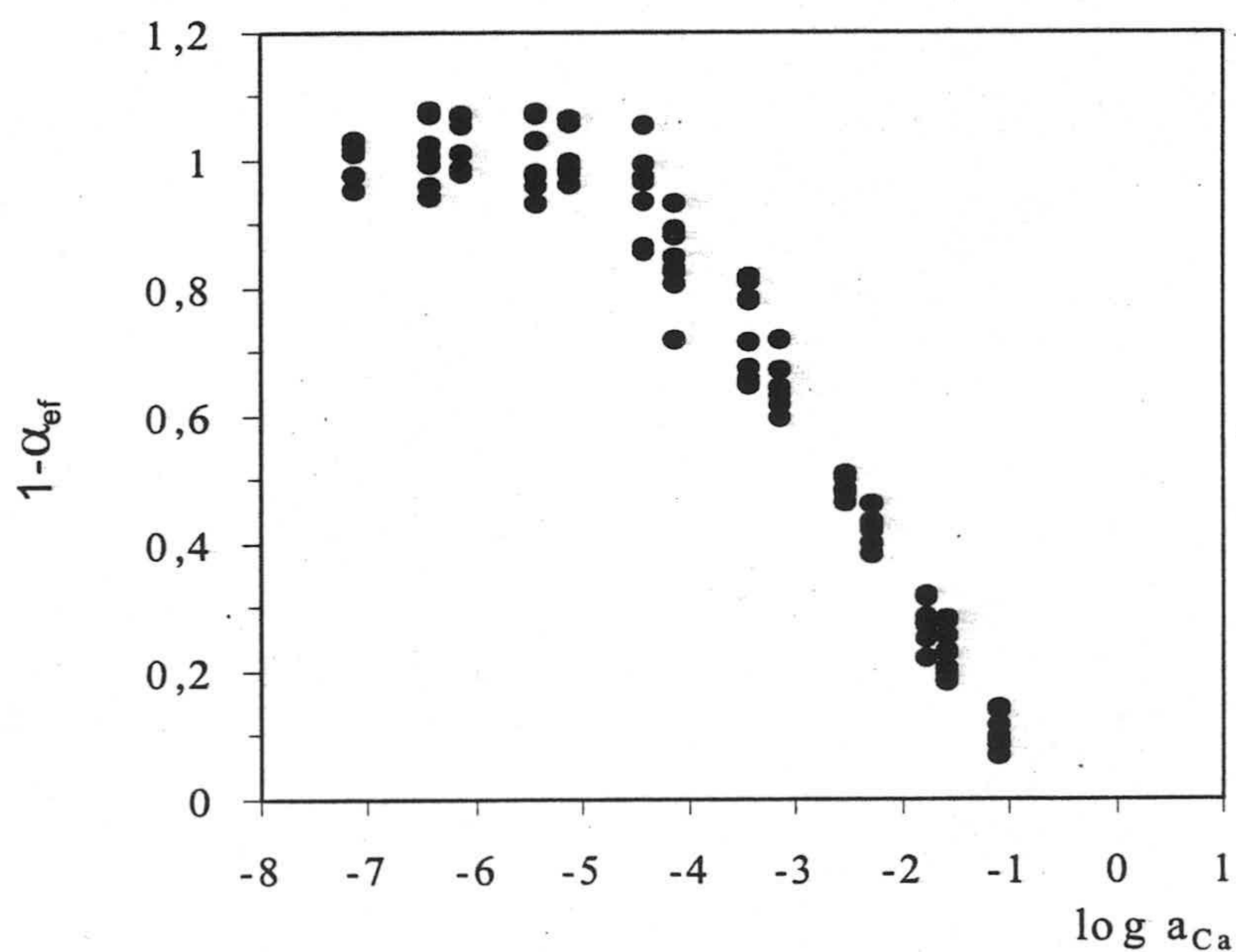


Figura 5.9. Comportamiento de la respuesta de la tira reactiva en función de la actividad de Ca (II). Nueve réplicas por cada nivel de concentración.

Si representamos la media aritmética para cada nivel de concentración y sobre la misma gráfica sobreponemos la representación de la ecuación teórica (ec. 5.2) teniendo en cuenta diferentes estequiometrías posibles ($M:L_p$: 0,33, 0,5 y 1) obtenemos la Figura 5.10

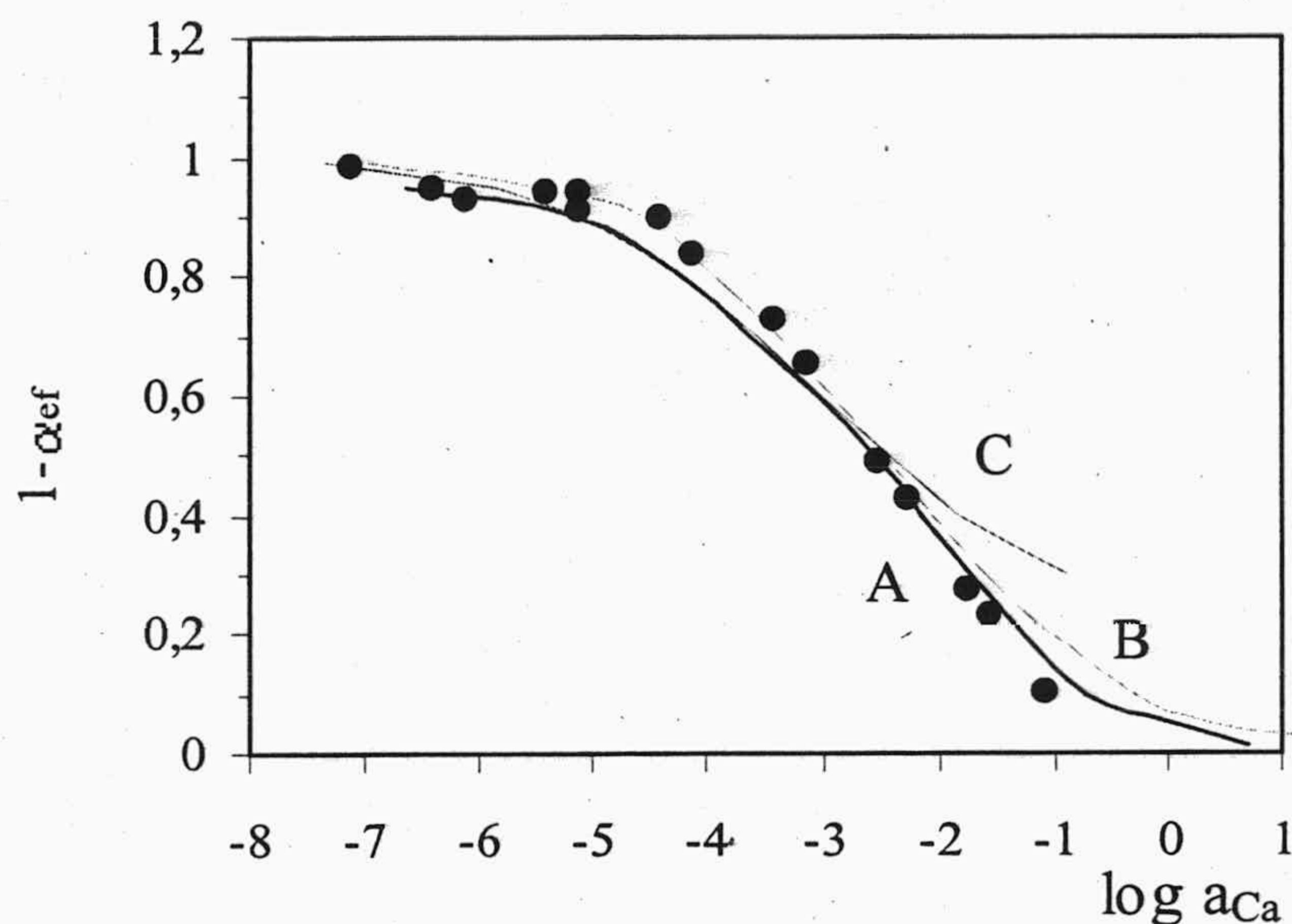


Figura 5.10. Estequiometría de la reacción de intercambio.
Curvas teóricas: A : $p=0,33$; B: $p=0,5$; C : $p=1$.

Como se comentó en la Introducción, la forma de la curva depende de diversos factores, uno de los cuales es la estequiometría de la reacción de intercambio. Para establecer una posible estequiometría se han representado en la figura anterior la curva teórica que resultaría de suponer que el índice estequiométrico p ionóforo:calcio fuera 0,5, 1 ó 2. Como vemos el índice 1 parece descartarse. Para sugerir una posible estequiometría se utiliza el grado de ajuste de los puntos experimentales a la función teórica mediante la sumatoria de los cuadrados de las diferencias entre el grado de protonación experimental y el teórico, tal y como nos muestra la ec. 5.5.

$$\Sigma[(1-\alpha)_{\text{teorico}}-(1-\alpha)_{\text{experimental}}]^2 \quad (5.5)$$

Los resultados obtenidos son: 0,0241 (p=0,33); 0,0249 (p=0,5); 0,0947 (p=1). Nuevamente no nos ofrecen información más allá de lo que lo hacía la inspección visual de la Figura 5.10. No obstante y dado que es necesario establecer una estequiometría para poder calcular la constante de intercambio K_e^{CaLp} se ha considerado que la estequiometría fuese 0,5, esto es 2:1 para el complejo calcio-ionóforo. Con este y los otros valores necesarios de la ecuación 5.1 y mediante ajuste por mínimos cuadrados de los puntos experimentales en la zona lineal de máxima pendiente (8 concentraciones diferentes y 9 réplicas de cada una) de las curvas respuesta para calcio, al modelo teórico conocido es posible calcular para $\log K_e^{\text{CaLp}}$ el valor de 14,36. Evidentemente, el considerar esa estequiometría implica una cierta indeterminación, pero la diferencia entre una y otra estequiometría realmente es muy pequeña y no es obstáculo para el establecimiento de un procedimiento analítico como veremos más adelante.

Tabla 5.4. Influencia de la actividad de calcio. Valores experimentales.

Nº	Log a_{Ca}	1- α_{Ca}	nº	Log a_{Ca}	1- α_{Ca}	nº	Log a_{Ca}	1- α_{Ca}	nº	Log a_{Ca}	1- α_{Ca}
1	-7.1304	0.9513	4	-5.4316	1.0699	8	-4.1336	0.8916	12	-2.2875	0.3827
1	-7.1304	1.0277	4	-5.4316	1.0729	8	-4.1336	0.8236	12	-2.2875	0.4331
1	-7.1304	1.0317	5	-5.1307	0.9878	8	-4.1336	0.8460	12	-2.2875	0.4354
1	-7.1304	0.9771	5	-5.1307	0.9860	8	-4.1336	0.9321	12	-2.2875	0.3990
1	-7.1304	1.0093	5	-5.1307	0.9867	9	-3.4466	0.7155	12	-2.2875	0.4232
1	-7.1304	1.0105	5	-5.1307	0.9619	9	-3.4466	0.8101	12	-2.2875	0.4209
1	-7.1304	1.0109	5	-5.1307	0.9809	9	-3.4466	0.8153	13	-1.7793	0.2730
1	-7.1304	1.0175	5	-5.1307	0.9816	9	-3.4466	0.6473	13	-1.7793	0.3142
1	-7.1304	1.0166	5	-5.1307	0.9981	9	-3.4466	0.6537	13	-1.7793	0.3177
2	-6.4314	0.9588	5	-5.1307	1.0649	9	-3.4466	0.6571	13	-1.7793	0.2494
2	-6.4314	0.9935	5	-5.1307	1.0582	9	-3.4466	0.6729	13	-1.7793	0.2842
2	-6.4314	0.9927	6	-5.1307	0.9878	9	-3.4466	0.7830	13	-1.7793	0.2859
2	-6.4314	1.0231	6	-5.1307	0.9860	9	-3.4466	0.7800	13	-1.7793	0.2208
2	-6.4314	0.9428	6	-5.1307	0.9867	10	-3.1588	0.6698	13	-1.7793	0.2709
2	-6.4314	0.9433	6	-5.1307	0.9619	10	-3.1588	0.7200	13	-1.7793	0.2755
2	-6.4314	1.0063	6	-5.1307	0.9809	10	-3.1588	0.7200	14	-1.5775	0.2034
2	-6.4314	1.0792	6	-5.1307	0.9816	10	-3.1588	0.5978	14	-1.5775	0.2536
2	-6.4314	1.0711	6	-5.1307	0.9981	10	-3.1588	0.6433	14	-1.5775	0.2548
3	-6.1304	0.9877	6	-5.1307	1.0649	10	-3.1588	0.6433	14	-1.5775	0.1948
3	-6.1304	1.0711	6	-5.1307	1.0582	10	-3.1588	0.6322	14	-1.5775	0.2783
3	-6.1304	1.0690	7	-4.4330	0.9662	10	-3.1588	0.6289	14	-1.5775	0.2808
3	-6.1304	1.0089	7	-4.4330	0.9934	10	-3.1588	0.6159	14	-1.5775	0.1821
3	-6.1304	0.9782	7	-4.4330	0.9948	11	-2.5323	0.5028	14	-1.5775	0.2288
3	-6.1304	0.9796	7	-4.4330	1.0553	11	-2.5323	0.5076	14	-1.5775	0.2297
3	-6.1304	1.0098	7	-4.4330	0.8637	11	-2.5323	0.5090	15	-1.0981	0.0863
3	-6.1304	1.0711	7	-4.4330	0.8560	11	-2.5323	0.4652	15	-1.0981	0.1400
3	-6.1304	1.0550	7	-4.4330	0.9917	11	-2.5323	0.4764	15	-1.0981	0.1415
4	-5.4316	0.9597	7	-4.4330	0.9368	11	-2.5323	0.4787	15	-1.0981	0.0927
4	-5.4316	0.9794	7	-4.4330	0.9721	11	-2.5323	0.4779	15	-1.0981	0.1145
4	-5.4316	0.9775	8	-4.1336	0.8818	11	-2.5323	0.4864	15	-1.0981	0.1164
4	-5.4316	0.9330	8	-4.1336	0.8080	11	-2.5323	0.4830	15	-1.0981	0.0691
4	-5.4316	1.0710	8	-4.1336	0.8075	12	-2.2875	0.4262	15	-1.0981	0.0969
4	-5.4316	1.0710	8	-4.1336	0.8320	12	-2.2875	0.4598	15	-1.0981	0.0992
4	-5.4316	1.0321	8	-4.1336	0.7196	12	-2.2875	0.4627			

2.2.4. Tiempo de contacto.

Para establecer el tiempo necesario que debe estar la tira reactiva desarrollada en contacto con la disolución problema, se prepararon tres sensores con la composición óptima antes estudiada y se pusieron en contacto con una disolución 0,1 M de Ca(II) en concentración (0,0265 M. en actividad) a pH 8,5, realizando un estudio cinético como los anteriormente comentados. Se observa que la señal se hace estable a los 200 segundos, no encontrando a partir de ahí ninguna variación superior al 5% de la señal a tiempo infinito o superior a la propia variabilidad del sistema. No obstante, se ha establecido como tiempo de respuesta 300 segundos, ampliando de este modo el margen de seguridad.

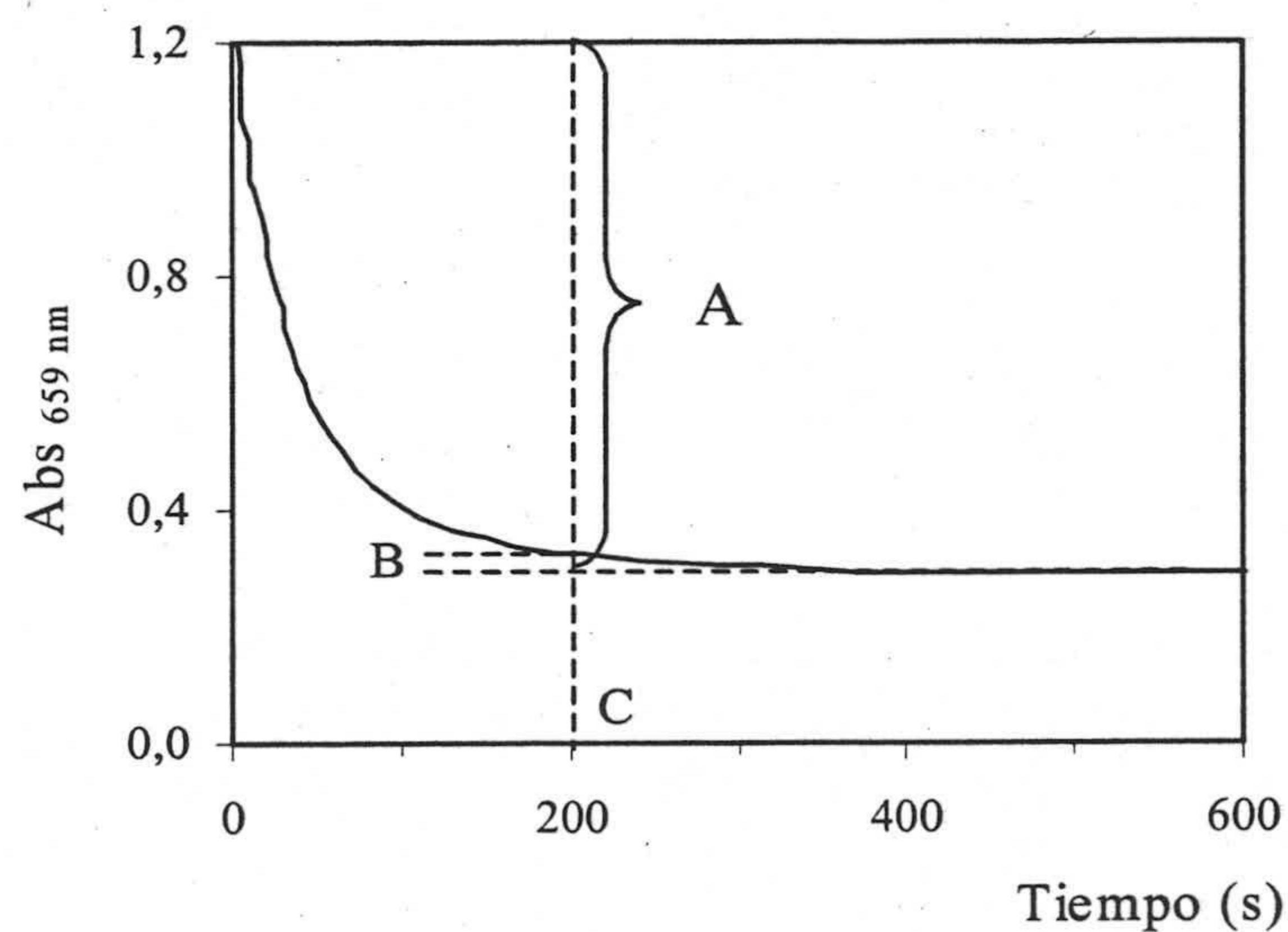


Figura 5.10. El tiempo de respuesta es para el cual la distancia B se hace igual o menor al 95% de la distancia A o bien es igual a la propia variabilidad del método.

3. Parámetros analíticos de la tira reactiva.

3.1. Límite superior e inferior

Como ya quedó descrito en el Capítulo 2, definimos el límite inferior, como la actividad que corresponde a la intersección de la función de calibrado y la función lineal ajustada en la zona de mínima pendiente.

Para determinarlo usamos dos series de patrones, una en la zona de máxima pendiente con ocho estándares y nueve réplicas de cada uno comprendidos entre los valores $7,35 \cdot 10^{-5}$ y $1,35 \cdot 10^{-1}$ en actividades ($1 \cdot 10^{-4}$ y 1 M en concentración), y otra en la zona de mínima pendiente de menor actividad (6 niveles y 9 réplicas por nivel) entre $7,41 \cdot 10^{-8}$ y $3,69 \cdot 10^{-5}$ en actividades ($1 \cdot 10^{-7}$ y $5 \cdot 10^{-5}$ M en concentración). La linealidad de las dos rectas fue comprobada aplicando un test de fallo de ajuste. Las ecuaciones de las rectas obtenidas son:

$$\alpha_{ef} = 0,99968 - 0,0020 \log a_{Ca} \quad (5.6)$$

$$\alpha_{ef} = 0,0945 - 0,2558 \log a_{Ca} \quad (5.7)$$

El límite superior viene definido por el punto de corte entre la función lineal de máxima pendiente y el eje de abcisas y arroja un valor de 519 mM. Por ello, el rango de medida estaría comprendido entre 0,05 mM y 369 mM expresados ambos en actividades, sin embargo se ha optado por tomar como límite superior 135 mM (1000 mM en concentración) ya que es el punto ensayado de mayor actividad.

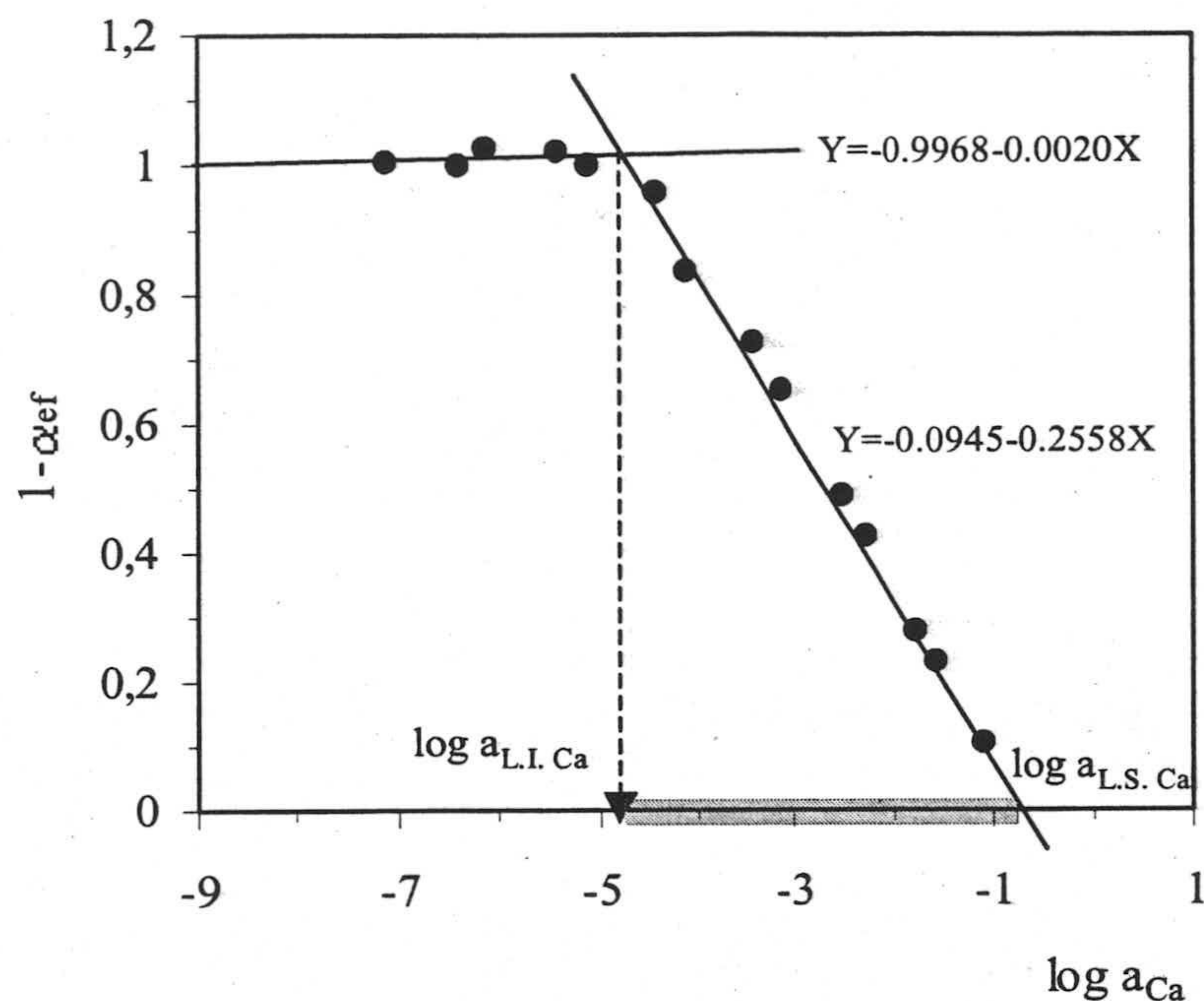


Figura 5.11. Límite superior (L.S.); límite inferior(L.I.) y rango de medida sombreado en verde.

3.2. Rango dinámico lineal

El rango dinámico lineal viene dado por la zona central de la curva de calibrado, la cual ha sido establecida como una recta mediante un ajuste por medio de mínimos cuadrados. Su correcto ajuste al modelo lineal ha sido verificado mediante la aplicación de un test de fallo de ajuste. El rango dinámico lineal está acotado por sendos límites inferior y superior y, por tanto, se encuentra comprendido entre las actividades en calcio 0,050 y 135 mM.

3.3. Precisión

Para evaluar la precisión del procedimiento propuesto (expresada como desviación estándar relativa) se realizó un estudio a tres niveles de concentración usando disoluciones de calcio que se encuentran situadas en la zona alta, media y baja de la curva de calibrado, en concreto $3,69 \cdot 10^{-5}$, $6,94 \cdot 10^{-4}$ y $7,98 \cdot 10^{-2}$ M ($5 \cdot 10^{-5}$, $1 \cdot 10^{-3}$ y $5 \cdot 10^{-1}$ M en concentración).

Para cada una de estas concentraciones se realiza un estudio de la precisión usando una misma membrana, esto es, se calcula la precisión intramembrana y usando distintas membranas, esto es, la precisión intermembrana.

b) Precisión intermembrana. En este caso se utilizan diez sensores diferentes preparados con la misma composición, que se ponen en contacto con cada una de las disoluciones de calcio de las concentraciones antes indicadas. En la Tabla 5.5 se muestran los resultados obtenidos.

Tabla 5.5 .Reproducibilidad intermembrana del sensor de calcio

Actividad	log a _{Ca}										DER (%)
BAJA	-4,136	-4,229	-4,203	-4,200	-4,242	-3,983	-4,064	-4,481	-4,201	-4,086	3,2
MEDIA	-3,015	-3,011	-3,008	-3,114	-3,026	-2,870	-3,405	-2,991	2,910	2,671	6,2
ALTA	-0,529	-0,361	-0,598	-0,636	-0,649	-0,481	-0,389	-0,540	-0,610	-0,443	-19,6

La precisión usando diferentes tiras reactivas y expresada como desviación estándar relativa de diez réplicas realizadas a tres niveles diferentes de concentración fue de 3,2, 6,2 y 19,6 % en términos de log a_{Ca²⁺}. No se observó tendencia alguna entre cada una de las distintas series de diez réplicas estudiadas. Observamos que conforme mayor es la actividad, menor es la señal y, en consecuencia, mayor la desviación estándar relativa encontrada.

a) Precisión intramembrana. Se utiliza una sola membrana con la composición óptima establecida y se introduce por diez veces en cada disolución de las diferentes actividades estudiadas. Tras cada equilibrado con la disolución se trata con HCl 0,1 M para dejarla preparada para una nueva medida. Los resultados se recogen en la Tabla 5.6.

Tabla 5.6. Reproducibilidad intramembrana del sensor de dureza

Actividad	Log a_{Ca}									D.E.R.(%)
BAJA	-4,306	-4,308	-4,272	-4,262	-4,372	-4,372	-4,135	-4,138	-4,132	2,3
MEDIA	-3,056	-3,076	-3,125	-3,116	-3,099	-3,115	-2,905	-2,899	-2,891	3,4
ALTA	-0,554	-0,586	-0,438	-0,450	-0,527	-0,520	-0,510	-0,530	-0,527	9,0

La repetibilidad del método usando un solo sensor se determinó de la misma forma que antes, usando los mismos niveles de actividad anteriores y realizando de nuevo diez réplicas de cada uno, obteniéndose unos valores de 2,3, 3,4 y 9,0 % en términos de $\log a_{Ca^{2+}}$. Destaca que la precisión es mejor que cuando se usan diferentes membranas, ya que no hay que considerar la reproducibilidad de la preparación de las mismas. Por otra parte, es de destacar que la tira reactiva desarrollada muestra un comportamiento reversible, pudiendo ser utilizado en más de una ocasión.

3.4. Tiempo de vida.

El tiempo de vida de la tira sensora desarrollada se ha establecido ensayando de forma periódica su capacidad de respuesta. Para ello, fueron preparadas un conjunto de tiras reactivas con las que se procedió de la siguiente forma: se conservó cada tira en un tubo de plástico cerrado, alejado de la luz para evitar la posible fotodegradación de los componentes de la membrana y evitando posible humedad. Cada semana se comprobó el estado de la misma realizando un espectro previo y, a continuación, estableciendo su respuesta frente a una disolución de calcio 0,01 M. Posteriormente se trata con HCl 0,1 M, se lava con agua y seca, siendo conservada de la misma forma. Tras el estudio se pudo concluir que las tiras sensoras desarrolladas tienen una duración máxima de un mes y medio.

3.5. Costo

El coste unitario de cada sensor se obtiene por la suma de costes prorrateados de cada uno de sus componentes sin tener en cuenta la mano de obra. Se debe de tener en cuenta que

este precio unitario es el adjudicado a prototipos de laboratorio y en ningún caso sería el precio de su producción industrial. En la tabla 5.7 se detalla el coste de este sensor, destacando que el coste de materiales es aproximadamente de medio céntimo de euro.

Tabla 5.7. Coste del sensor desglosado por componentes

Componente	Precio (€/mg ó ml)	Cantidad/sensor	Precio (€)
SPS1	0,0024	0,006 mg	0,0000144
Azul Nilo lip.	0,06	0,0096 mg	0,000576
TCFB	0,1	0,01 mg	0,001
PVC	0,0001	0,5 mg	0,00005
TBP	0,1	0,0126 mg	0,00126
THF	0,03	0,02 ml	0,0006
Mylar	0,00048	4 cm ²	0,00192
Total			0,0054 €

Tabla 5.8. Parámetros analíticos

Parámetros	Valor: S	
Ordenada en el origen	-0.095: 0.020	
Pendiente	-0.256: 0.008	
Nivel de probabilidad % (lack-of-fit test)	8.8	
Limite inferior (mM)	0.050	
Rango lineal (mM)	0.050 – 135	
DER(%) ^a Intrasensor	0.04 mM ^b	2.3
	0.69 mM ^b	3.4
	79.80 mM ^b	9.0
DER(%) ^a Intersensor	0.04 mM ^b	3.2
	0.69 mM ^b	6.2
	79.80 mM ^b	19.6
Costo	0.0054 €	

a: DSR en términos de $\log a_{Ca^{2+}}$; b: Actividades

En la Tabla 5.8 se recogen los parámetros analíticos establecidos para el procedimiento propuesto de determinación de calcio

4. Procedimiento propuesto.

Se toma una alícuota de una disolución patrón conteniendo entre 0,050 y 135 mM en actividades (0,07 y 1000 mM en concentraciones) de una disolución de calcio y se coloca en una matraz de 50 ml, añadiendo 5 ml de una disolución reguladora de tris(hidroximetil)aminometano 0,2 M de pH 8,5, enrasando con agua. Se toman 10,0 ml de la anterior disolución que se introducen en un tubo de polietileno de 10x1,5 cm junto con el sensor desechable para calcio durante cinco minutos y sin agitación. A continuación, la membrana se saca de la disolución y se sacude para eliminar las gotas de disolución que la puedan mojar; tras lo cual se mide la absorbancia a 659 nm en la forma anteriormente descrita. Por otra parte, se mide la absorbancia de cada membrana tras haberla equilibrado con NaOH 0,01 M, por una parte, y con disolución reguladora de pH 8,5, por otra. Con estos datos se calcula $1-\alpha_{ef}$. La estimación de la actividad de calcio se realiza mediante calibrado de $1-\alpha_{ef}$ frente a $\log a_{Ca^{2+}}$. Todas las medidas se realizan a temperatura ambiente. No es necesario acondicionar las membranas antes de su uso.

En el caso de muestras de agua, se introducen 9 ml de muestra en un tubo de polietileno junto con 1 ml de tampón Tris 0,2 de pH 8,5, operando igual que antes. En el caso de muestras lácteas se realiza una dilución 1:100 con agua y, a continuación, se procede del mismo modo que para las muestras de agua.

5. Aplicaciones y validación

Para comprobar la validez del método, se aplicó este a diversas muestras reales, utilizando como método de referencia la espectrofotometría de absorción atómica (EEA), sometiendo los resultados obtenidos a una comparación estadística para comprobar que no existen diferencias estadísticamente significativas entre ambos métodos.

Las muestras reales analizadas se dividen en dos grupos: aguas de diversa procedencia y leche de vaca con diferentes concentraciones de Ca (II). Es de resaltar que este sensor ha sido aplicado con éxito al análisis de calcio en leche con una mínima manipulación de la muestra y sin necesidad de desproteinizar.

En la Tabla 5.9 podemos ver los resultados obtenidos mediante la tira reactiva y el método de referencia utilizado. Los valores reflejados en dicha tabla corresponden a la media de tres réplicas de cada muestra para cada uno de los métodos. También está incluida la desviación estándar de estas réplicas, así como el valor P del test de comparación de medias, que nos indica, en todos los casos, que no existe diferencia significativa entre los resultados obtenidos mediante la tira reactiva y los obtenidos mediante el método de referencia, ya que en todos los casos el valor P_{value} es $>5\%$

Tabla 5.9. Determinación de calcio en diferentes tipos de agua usando EEA como método referencia

Muestra	Tira reactiva (mM Ca)	S	EEA (mM Ca)	S	P _{val} (%)
Agua urbana Granada	0.75	0.11	0.818	0.067	5.4
Agua urbana Almuñecar	1.52	0.46	1.693	0.034	42.0
Agua urbana Otura	0.58	0.17	0.721	0.034	62.3
Agua urbana Berja	1.94	0.48	2.082	0.058	4.9
Agua de pozo, Colomera	1.76	0.51	1.563	0.010	58.3
Agua de manantial Berja	1.39	0.19	1.790	0.001	35.5
Agua mineral San Vicente	0.90	0.31	0.616	0.013	41.3
Agua mineral Lanjaron	0.66	0.35	0.685	0.027	23.8
Agua mineral Villadrau	0.76	0.39	0.810	0.023	47.6
Agua mineral Evian	2.60	0.82	2.14	0.10	45.6
Agua mineral Fontvella	1.008	0.059	1.035	0.027	44.4
Agua mineral Fuente Liviana	2.0	1.0	1.790	0.058	38.0
Agua mineral Zambra	3.2	1.0	2.743	0.034	24.6
Leche entera (Puleva Peques)	29.6	3.8	26.23	0.73	41.9
Leche entera (RAM)	27.3	2.6	27.54	0.71	12.9
Leche desnatada (Pascual)	31.5	6.9	27.62	0.13	24.6
Leche entera (Puleva Calcio)	25.3	5.5	29.382	0.090	33.9
Leche desnatada (Puleva Calcio)	29.6	4.4	32.98	0.49	31.9
Leche entera (Puleva Omega)	32.1	7.1	31.19	0.23	38.0

CAPÍTULO 6
DETERMINACIÓN DE MAGNESIO
EN AGUA MEDIANTE UNA
TIRA REACTIVA

CAPÍTULO 6

DETERMINACIÓN DE MAGNESIO EN AGUA MEDIANTE UNA TIRA REACTIVA

1. Introducción.

En este capítulo se expone el trabajo que hemos llevado a cabo para a punto y caracterizar un sensor óptico de un solo uso reversible o tira reactiva dedicada a la determinación rápida y selectiva de magnesio en aguas. Durante el trabajo desarrollado en esta Memoria hemos constatado las considerables dificultades para desarrollar ionóforos selectivos para magnesio, pues muchos de los descritos en bibliografía para este alcalinotérreo, especialmente si proceden del desarrollo de electrodos selectivos de iones, no son suficientemente selectivos e incluso muy poco selectivos para magnesio en su uso para sensores de tipo óptico. El siguiente capítulo es un ejemplo de lo dicho.

Esta tira reactiva está compuesta por un soporte inerte y transparente de politereftalato de etileno sobre el que se halla dispuesta una zona activa que contiene los reactivos necesarios para producir una respuesta selectiva para magnesio, en concreto, el ionóforo neutro N,N'-diheptil-N,N'-dimetil-aspartamida, el cromoionóforo azul Nilo lipofilizado y la sal lipofílica tetrakis(4-clorofenil) borato potásico.

Esta tira reactiva se basa, al igual que las dos anteriores, en un mecanismo de intercambio catiónico entre una membrana orgánica de PVC plastificado y una fase acuosa que contiene el analito, tal como se ha descrito en la Introducción de esta Memoria de Doctorado. La zona sensora de la tira reactiva contendrá un ionóforo selectivo para magnesio L y un cromoionóforo selectivo para protones C, que originan las especies MgL_p^{2+} y HC^+ , respectivamente, y, además, una sal de anión lipofílico que permite ese intercambio iónico.

En la zona sensora en contacto con una disolución acuosa que contiene el analito tendrá lugar, suponiendo que la estequiometría del proceso es 1:p (Mg:L), la siguiente reacción:



Como consecuencia de esa reacción tendrá lugar una transferencia de magnesio desde la disolución a la membrana, en razón al cociente de actividades de alcalinotérreo a protones en disolución. La medida de la absorbancia de la forma protonada del cromoionóforo permitirá el cálculo del grado de protonación $1-\alpha$, que será el parámetro analítico, tal como hemos visto con anterioridad. Sin embargo, por las razones ya comentadas, nosotros usaremos el grado de protonación en nuestras condiciones de trabajo; esto es, el grado de protonación efectivo $1-\alpha_{ef}$.

La actividad en magnesio en fase acuosa se relaciona con la constante de equilibrio del proceso $K_e^{Mg^{2+}}$, α_{ef} y la actividad en protones a_{H^+} , según la ecuación:

$$a_{Mg^{2+}} = \frac{1}{K_e^{Mg^{2+}}} \left(\frac{a_{H^+} \alpha_{ef}}{1 - \alpha_{ef}} \right)^2 \frac{C_R - (1 - \alpha_{ef})C_C}{2 \left(C_L - \frac{p}{2} (C_R - (1 - \alpha_{ef})C_C) \right)^p} \quad (6.1)$$

En ella, C_L es la concentración analítica de ionóforo, C_C de cromoionóforo y C_R de sal lipofílica. El ajuste del pH con una disolución reguladora de pH conocido permitirá la determinación de la actividad en magnesio.

El grado de protonación efectivo $1 - \alpha_{ef}$, que es el parámetro analítico utilizado que se calcula midiendo la absorbancia de la forma protonada del cromoionóforo presente en la tira reactiva tras haber estado en contacto con el problema. Como se ha dicho más arriba el cromoionóforo que aquí usaremos es el azul Nilo, que es el mismo empleado en las dos tiras reactivas anteriores. Esto significa que realizaremos las medidas de absorbancia a la misma longitud de onda, 659 nm. Además de esto tendremos que medir la absorbancia A_C de la tira reactiva en contacto con una disolución de NaOH 0,1 M y, por último, la absorbancia $A_{tampón}$ de la tira reactiva en contacto con la disolución reguladora usada. Con estos valores calcularemos el parámetro analítico $1 - \alpha_{ef}$, definido como:

$$1 - \alpha_{ef} = \frac{A - A_C}{A_{tampón} - A_C} \quad (6.2)$$

2. Optimización de la respuesta de la tira reactiva

Al igual que en anteriores ocasiones, los factores que influyen sobre la respuesta de la tira reactiva para magnesio, se pueden dividir en dos grupos: A) Los parámetros relacionados con el diseño y composición de la membrana. Estos son los constituyentes del cóctel usado para la preparación de la membrana y sus proporciones, el volumen de cóctel usado para hacer la membrana y otras condiciones. B) Los parámetros relacionados con el proceso de equilibración de la muestra conteniendo el analito con la tira reactiva; estos son pH, tiempo de contacto y actividad en amonio.

Resumimos a continuación los experimentos realizados para conocer las influencia de estos factores y los valores de los mismos que originan la mejor respuesta.

2.1. Composición y preparación de la membrana

Para el establecimiento de la composición más adecuada de la membrana sensora se han seguido dos estrategias complementarias como ha sido indicado con anterioridad. En primer lugar, ajustar las proporciones de ionóforo, anión lipofílico y cromoionóforo que originen la mejor respuesta y mayor selectividad de la membrana frente a iones interferentes, tales como calcio, sodio y potasio. A continuación, una vez fijadas la proporción de esos componentes, se estudiará la cantidad de polímero formador de membrana, que es el PVC, y el tipo y cantidad de plastificante necesario, mediante un estudio de la cinética del proceso de intercambio iónico entre disolución y membrana.

2.1.1. Selección de los reactivos

Para el desarrollo de esta tira reactiva de tipo óptico para la determinación de magnesio basada en dos componentes, es necesario seleccionar un conjunto de reactivos que permitan que se dé la reacción de intercambio iónico entre el magnesio presente en la disolución y los protones situados en la membrana.

Estos reactivos necesarios, tal como quedó dicho más arriba y discutido en la Introducción de esta Memoria, son: 1) ionóforo selectivo para magnesio; 2) ionóforo selectivo para protones o cromoionóforo; 3) sal de anión lipofílico que permita mantener cargas en la membrana lipófila y posibilitar el intercambio iónico; 4) polímero formador de membrana y 5) plastificante.

Con todos estos reactivos es necesario preparar una membrana que se fijará sobre un soporte inerte y ópticamente transparente, sobre el cual se realizará la medida de absorción de radiación por transmisión.

Como ionóforo se ha seleccionado un derivado lipofílico de la aspartamida como es el N,N'-diheptil-N,N'-dimetil-aspartamida (DDA). Se trata de un ligando capaz de formar complejo con magnesio con una coordinación octaédrica. Este derivado de la aspartamida, conocido bajo el acrónimo ETH2220, fue diseñado como un ionóforo muy efectivo para magnesio en electrodos selectivos de iones¹, obteniéndose unos buenos resultados en cuanto a selectividad, si bien los datos no son directamente extrapolables a sensores ópticos, y menos aún cuando dichos sensores ópticos están basados en un segundo componente, pues se emplea el concurso de dos reacciones que ocurren en una membrana plastificada, complejación con ionóforo y desplazamiento de un indicador ácido-base, mientras que los electrodos selectivos de membrana solo usan la reacción de complejación con el ionóforo. El balance de energía libre que señalará la extensión de la reacción como conjunto, es distinto en ambos casos. Una serie de experiencias preliminares demostraron que este ionóforo presenta selectividad suficiente para esta aplicación.

¹ Rouilly, M.V., Badertscher, M., Pretsch, E, Suter, G. y Simon, W., Anal. Chem., 60, 2013 (1988).

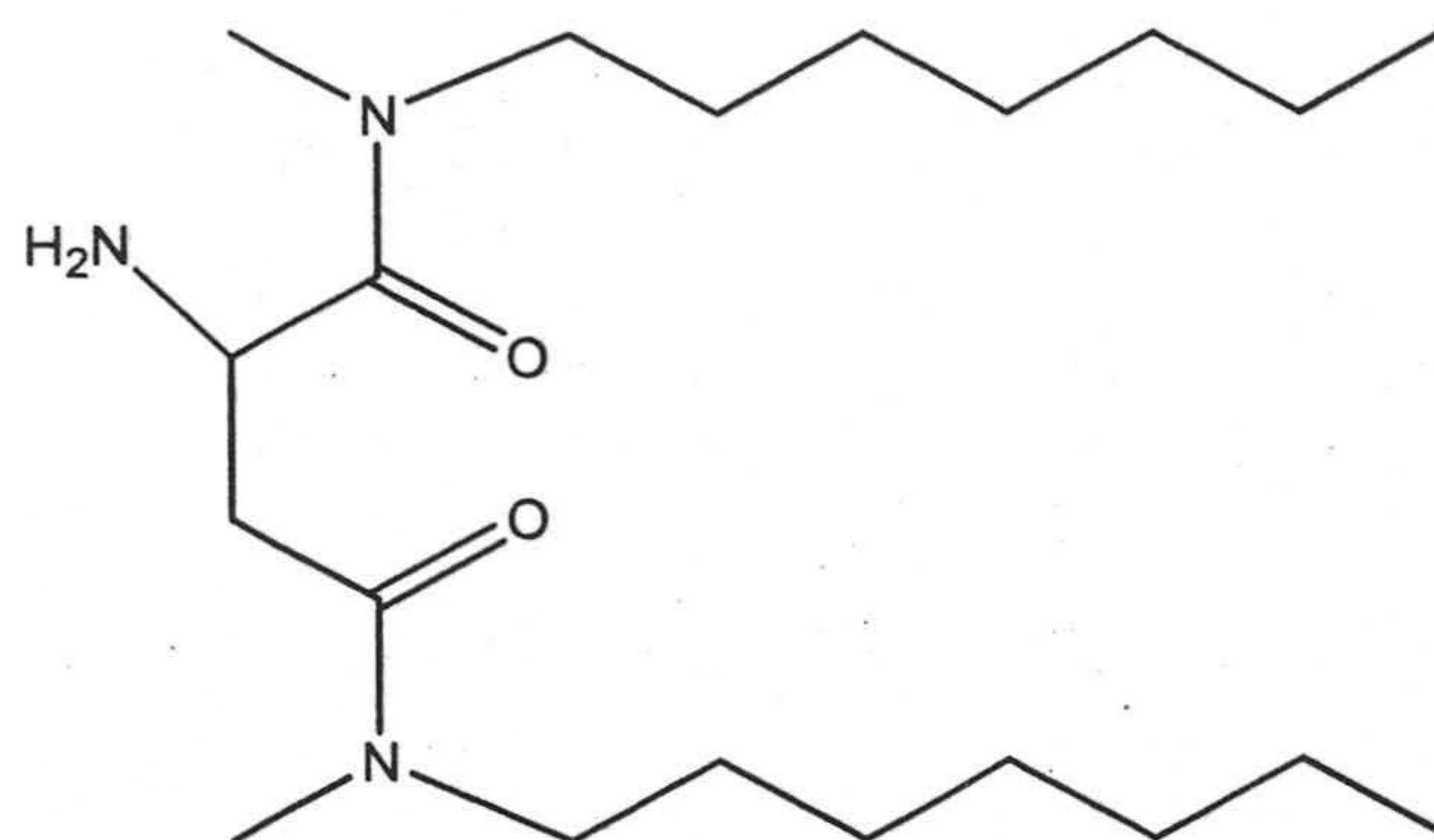


Figura 6.1. Estructura del ionóforo DDA

Como cromoióforo se ha elegido el azul Nilo lipofilizado pues experiencias previas indicaron que daba buenos resultados. De los diferentes tetrafenilboratos alcalinos ensayados como sal lipofílica, dio buen resultado el tetrakis(7-clorofenil)borato potásico (TCFB), mientras que otras, como el tetrakis(3,5-bis(trifluorometil)fenil)borato sódico, no originó prácticamente respuesta. El polímero formador de membrana utilizado fue el cloruro de polivinilo y el plastificante fue elegido de entre los grupos habituales (éteres, ésteres de ácidos carboxílicos y ésteres del ácido fosfórico).

En concreto, se ensayaron TBP, DOS, y NPOE. Para ello, se prepararon tiras reactivas que contenían 25,00 mg de PVC, 63,00 mg del plastificante correspondiente, 1,33 mg de la sal lipofílica tetrakis(7-clorofenil)borato potásico (TCFB), 0,78 mg de azul Nilo lipofilizado y 0,95 mg del ionóforo DDA, todo ello disuelto en 1,0 ml de THF. Con 20 μ l de cada cóctel se prepararon tantas membranas como plastificantes se probaron, según se indica en la Introducción. A continuación, se introdujo cada membrana en un tubo de plástico conteniendo 10 ml de disolución 0,01 M a pH 8,8 ajustado con tampón Tris 0,2 M de Mg(II)

Se observó que la sensibilidad hacia magnesio de las diferentes tiras reactivas preparadas usando cada uno de los mencionados plastificantes se incrementa según la secuencia: fosfatos > éteres > ésteres carboxílicos, es decir TBP>DOS>NPOE.

Por otra parte, se registró la velocidad de reacción de cada una de estas membranas frente a magnesio. Para ello se situó, como se explica en el Capítulo 2, una tira reactiva preparada con cada uno de los plastificantes en estudio, en un lateral perpendicular al eje óptico de una cubeta de 10 mm de paso de luz de un espectrofotómetro, tras lo cual se inyectó una disolución de Mg(II) 0,1 M a pH 8,8, registrando la cinética correspondiente a 659 nm. La Figura 6.2 muestra dicha cinética, observando que el comportamiento es muy diferente según el plastificante. La velocidad de reacción de intercambio sigue la secuencia TBP>DOS>NPOE. Secuencia que es igual a la anterior. Como en anteriores casos, tributilfosfato es quien origina mayor respuesta frente a magnesio y con mayor velocidad de reacción, por ello es este el plastificante elegido.

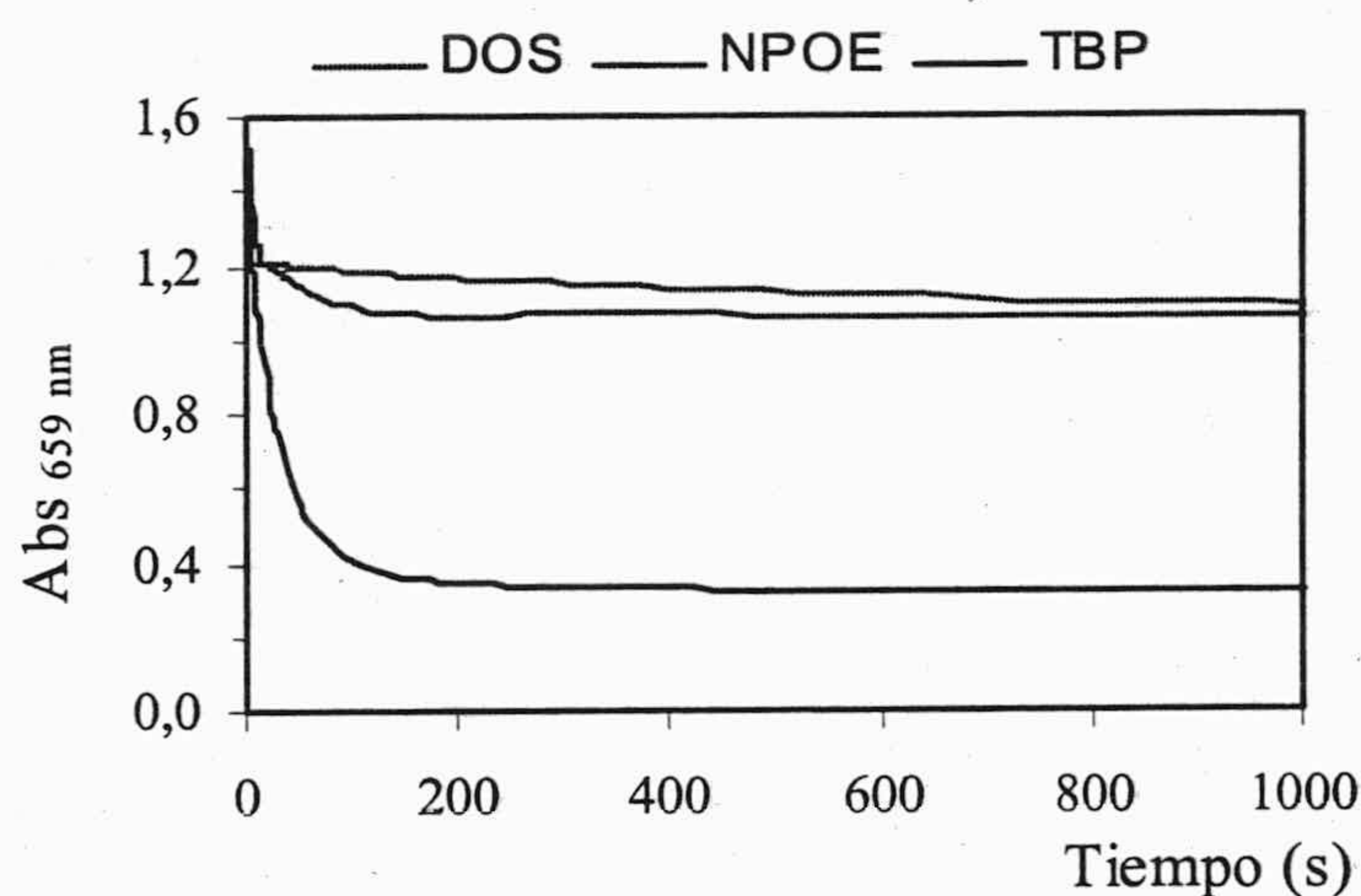


Figura 6.2. Influencia del tipo de plastificante sobre la velocidad de respuesta frente a magnesio.

2.1.2. Estudio de la proporción óptima anión lipofílico/ionóforo

Como se indicó en la Introducción, la proporción de sal lipofílica presente y, especialmente, su relación molar con el ionóforo, tiene una gran importancia para lograr una

adecuada selectividad frente a iones potencialmente interferentes. De esta forma, es posible controlar la concentración de los dos cationes intercambiables y el ionóforo libre asequible para complejación en la interfase membrana - disolución².

Como medida de la selectividad usamos el coeficiente de selectividad K_{ij}^{opt} , que se definió en la Introducción, para el caso de que junto con el ión primario (Mg^{2+}) coexista un ión interferente J^{z+} . Dicho coeficiente de selectividad se calcula mediante el método de las disoluciones separadas y, tal como allí quedó dicho, vendrá dado por el cociente entre las actividades de los iones principal e interferente para un valor de $1-\alpha_{ef} = 0,5$.

Para determinar el coeficiente de selectividad y la influencia de la relación sal lipofílica/ionóforo, se prepararon un conjunto de membranas de un solo uso en las que se varió dicho cociente. Se estudiaron cuatro relaciones distintas: 50%, 75%, 100%, 130%. De cada proporción estudiada se prepararon tres membranas distintas.

La cantidad del cromoionóforo se mantuvo constante y fue, como en anteriores ocasiones, la necesaria para minimizar el error fotométrico de las medidas de absorbancia, mientras que la proporción molar del anión lipofílico con respecto al ionóforo se varió, según queda dicho.

Se prepararon series de disoluciones de magnesio, calcio, sodio y potasio con cinco niveles de concentración diferentes cada una de ellas: $5 \cdot 10^{-4}$, $1 \cdot 10^{-3}$, $1 \cdot 10^{-2}$, $5 \cdot 10^{-2}$, $1 \cdot 10^{-1}$ M en concentración y con el valor de pH ajustado a 8,8 con una disolución reguladora de Tris 0,2 M. Se estudio la respuesta de cada membrana frente a las diferentes series, efectuando tres réplicas por serie. Cada membrana se introdujo durante 5 minutos para asegurar la consecución del equilibrio y, a continuación, se midió la absorbancia y se establecieron las funciones $1-\alpha_{ef}$ vs $\log a_{Mg^{2+}}$, lo que permitió calcular los coeficientes de selectividad.

² W. Zhang, L. Jenny y U. Spichiger, Anal. Sci., 16, 11, (2000)

Como hemos visto, el coeficiente selectividad está directamente relacionado con $1-\alpha$ y gráficamente se corresponde con la distancia que separa la función de calibrado del analito y la del interferente. Sin embargo, en esta Memoria de Doctorado se han determinado los coeficientes de selectividad matemáticamente, según la ecuación:

$$k_{Mg,J}^{opt} = \frac{v}{2} \frac{K_e^{JLq}}{K_e^{MgLp}} \left(\frac{a_{H^+} \alpha}{1-\alpha} \right)^{2-v} \frac{\left(C_L - \frac{q}{v} C_R - (1-\alpha) C_C \right)^q}{\left(C_L - \frac{p}{2} C_R - (1-\alpha) C_C \right)^p} \quad (6.3)$$

Para ello fue necesario estudiar por separado el comportamiento y respuesta para cada uno de los iones, para luego extraer de esos datos experimentales los parámetros de la ecuación 6.3 tales como índice estequiométrico p y q y, constantes K_e^{JLq} , K_e^{MgLp} , etc.

Estos experimentos se realizaron con dos plastificantes, TBP por una parte, ya que según experiencias anteriores es el que origina mayor respuesta y a tiempos menores, y, por otra parte, el NPOE ya que ha sido el utilizado en electrodos selectivos de iones, dando allí unos resultados de selectividad muy buenos según la bibliografía³.

En la Tabla 6.2 se recogen los valores de coeficiente encontrados para cada cociente de anión lipofílico a ionóforo ensayado, los cuales se representan en las Figuras 6.3 y 6.4.

³ M. V. Rouilly, M. Badertscher, E. Pretsch, G. Suter y W. Simon.. Anal Chem. 60, 2013 (1988).

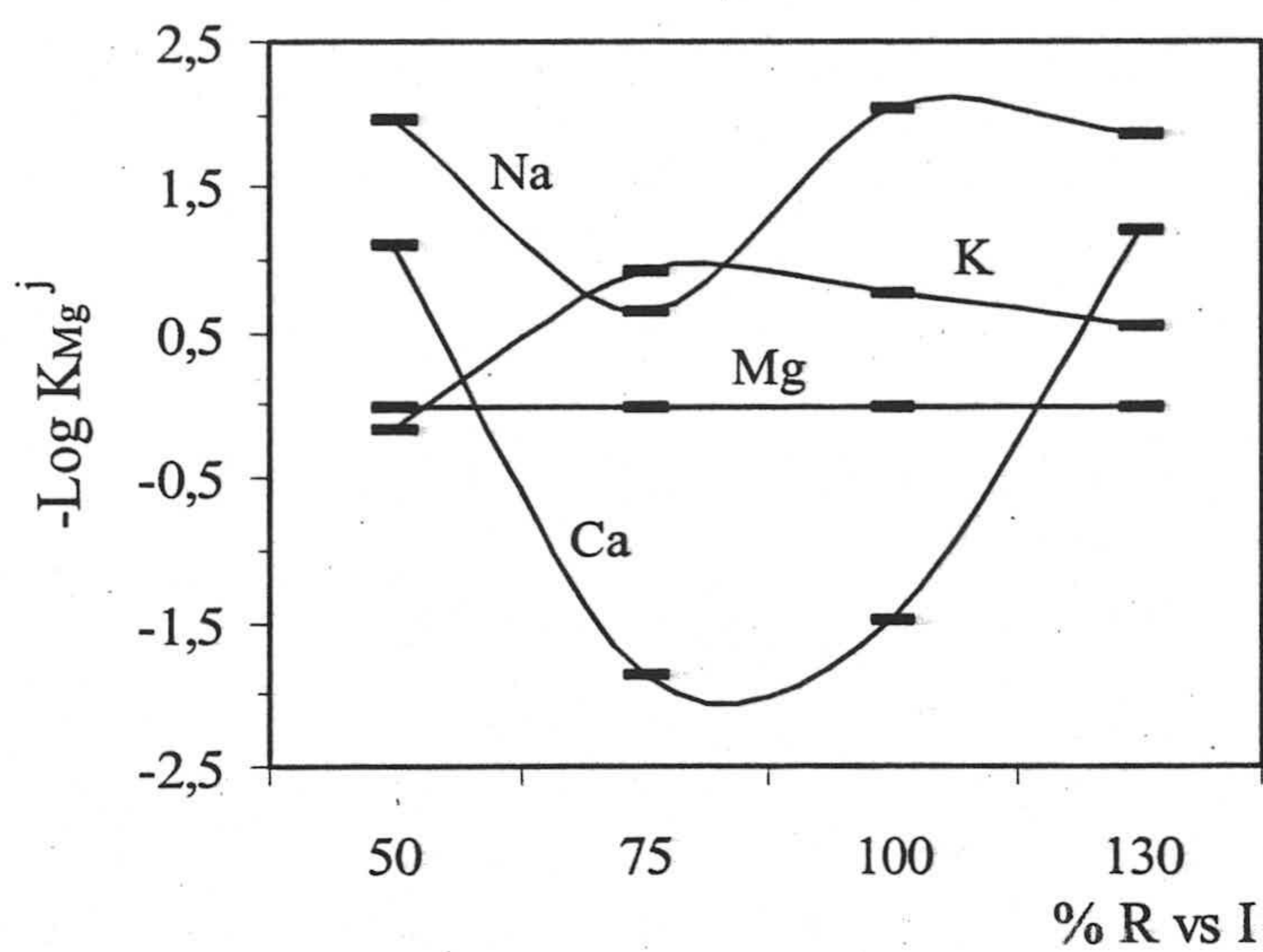


Figura 6.3. Valores de coeficientes de selectividad en función de la relación molar L-R usando NPOE como plastificante

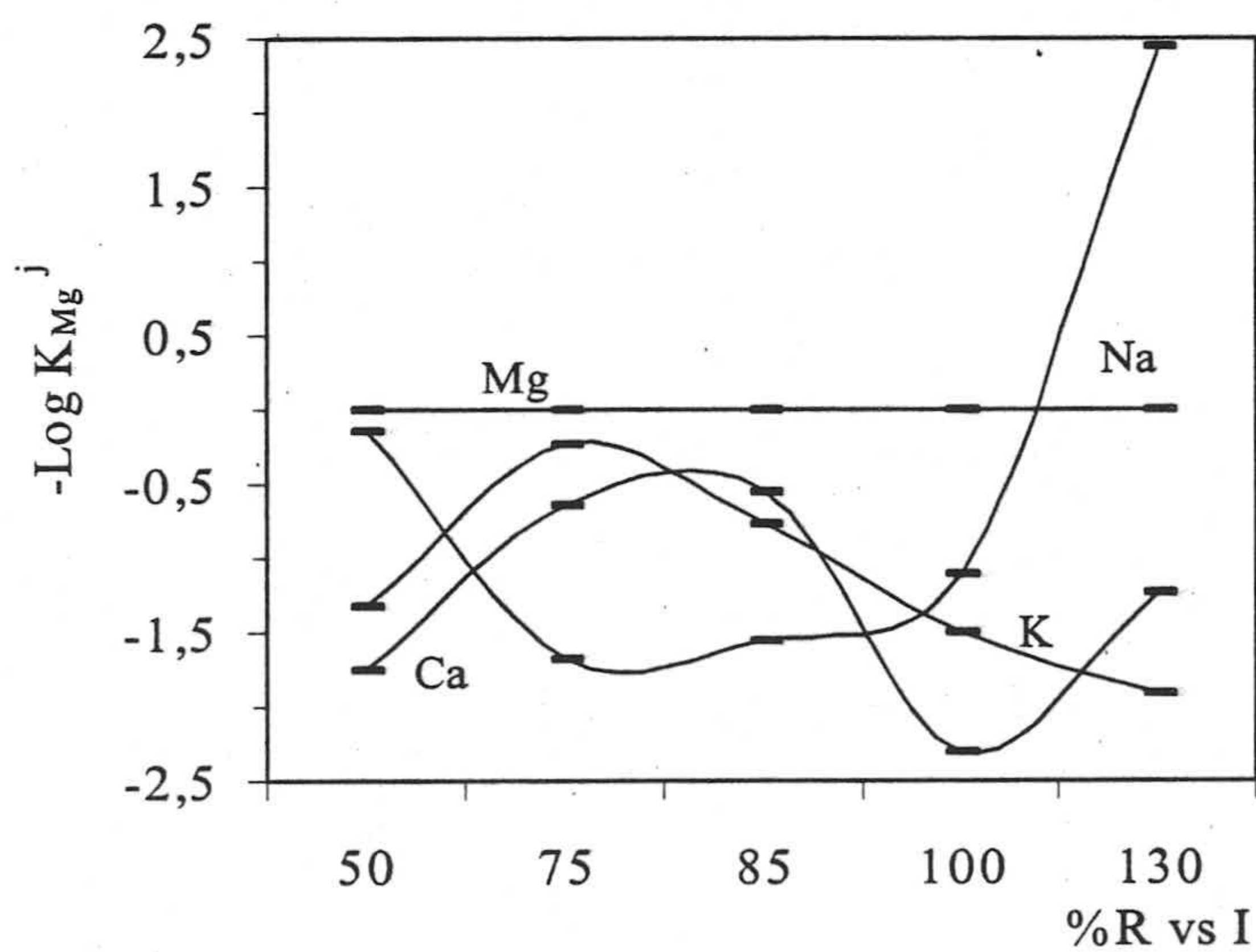


Figura 6.4. Valores de coeficientes de selectividad en función de la relación molar L-R usando TBP como plastificante

Como se puede observar, es utilizando el plastificante TBP como se consiguen mejores coeficientes de selectividad. Concretamente, se elige una proporción del 100%, es decir, un mol de anión lipofílico por mol de ionóforo, como la relación molar más apropiada, si bien es a una relación del 75 % a la que se consigue una mejor selectividad respecto a calcio, aunque no para alcalinos.

Tabla 6.2. Coeficientes de selectividad del sensor para magnesio en función de la relación anión lipofílico/ionóforo

R%	TBP			NPOE		
	$-\log K_{Mg,Ca}$	$-\log K_{Mg,Na}$	$-\log K_{Mg,K}$	$-\log K_{Mg,Ca}$	$-\log K_{Mg,Na}$	$-\log K_{Mg,K}$
50	-0,134	-1,751	-1,313	1,097	1,977	-0,175
75	-1,679	-0,634	-0,232	-1,865	0,647	0,928
85	-1,550	-1,679	-0,777	---	---	---
100	-1,101	-2,310	-1,498	-1,479	2,038	0,736
130	2,443	-1,241	-1,903	1,215	1,215	0,544

2.1.3. Influencia del porcentaje de plastificante

El estudio de la proporción óptima de plastificante tributilfosfato se llevó a cabo observando como se modifican tanto las propiedades físicas de la membrana, como la cinética de la reacción heterogénea de intercambio iónico, al objeto de seleccionar la mejor velocidad de respuesta, que es un aspecto fundamental en estos ensayos rápidos.

Por ello se prepararon cuatro cócteles con porcentajes de TBP que se variaban desde un 30 a un 80%, con respecto a los demás componentes de la membrana. Además, toda esas disoluciones contenían 25,00 mg de PVC, 1,33 mg de sal lipofílica TCFB, 0,78 mg de cromoionóforo azul Nilo y 0,95 mg de ionóforo DDA en 1,0 ml de THF.

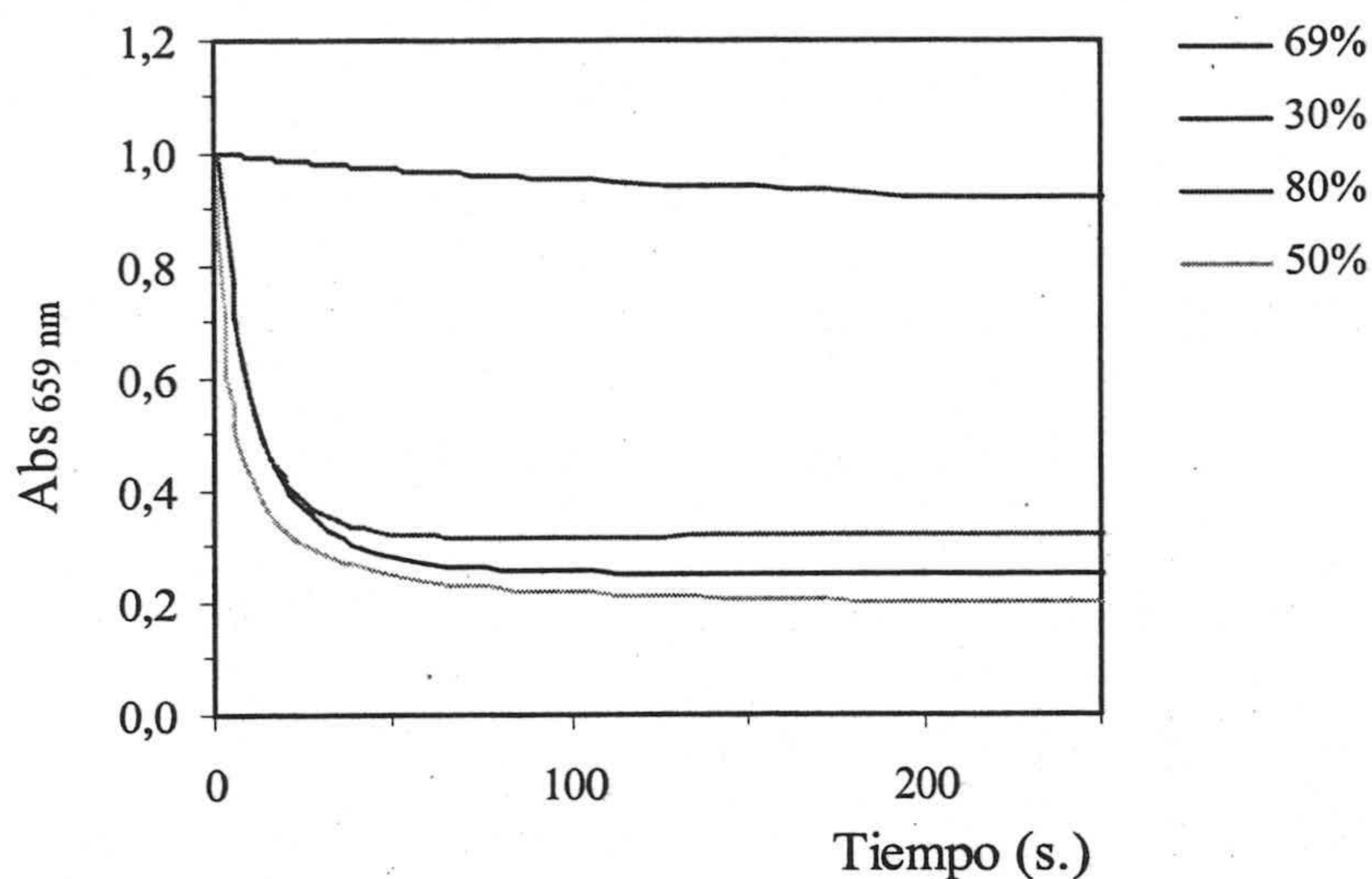


Figura 6.5. Influencia del porcentaje de plastificante TBP sobre el tiempo de respuesta

A continuación, se pusieron en contacto las membranas preparadas con una disolución 0,1 M de magnesio a pH 8,8 con tampón Tris 0,2 M. Se observa que en los sensores que contienen un porcentaje de TBP igual o inferior al 50%, la zona activa no se adhiere al soporte plástico o bien la señal es inestable o tiene mucho ruido. Para porcentajes iguales o superiores al 70%, empeoran las propiedades físicas de la membrana, pues son menos homogéneas, de poco espesor y aumenta el tiempo de secado durante la preparación.

En la Figura 6.5 se muestran los resultados obtenidos donde se observa que el tiempo de respuesta disminuye al aumentar el porcentaje de TBP y en la Tabla 6.3 se señalan los tiempos de respuesta medidos.

Si se utiliza un porcentaje de 30% de TBP, observamos que la membrana apenas funciona en un intervalo de tiempo de 1500 segundos. Sin embargo, el tiempo de respuesta para alcanzar el equilibrio fue de 150 segundos para un 50% y 100 segundos para un 69% y 80%. La velocidad se incrementa, por tanto, con la cantidad de TBP así como las propiedades físicas hasta un porcentaje del 70%. Con cantidades mayores que estas, si bien, la velocidad se mantiene, las características de la membrana empeoran debido a que la

membrana es menos homogénea y aumenta el tiempo de secado. Por todo ello, se seleccionó un 70% como porcentaje óptimo para los experimentos siguientes.

Tabla 6.3. Tiempos de equilibrio

% TBP	Tiempo, min.
30%	> 60
50%	2,5
70%	< 2
80%	< 2

Por otra parte, los tiempos de respuesta obtenidos coinciden razonablemente con los esperados teóricamente para la difusión de calcio dentro de una membrana de PVC plastificada de 7 μm de espesor^{4,5,6}

El polímero de membrana y plastificante, que son los constituyentes mayoritarios de la membrana, están relacionados entre sí. Por ello, tras fijar el plastificante y los componentes minoritarios, queda fijado el porcentaje de PVC en un 27,8 % en peso.

2.1.4. Influencia del volumen de cóctel.

Se reitera el estudio del volumen de cóctel más adecuado para preparar la zona sensora de la tira reactiva, pues en cada caso la composición del cóctel es diferente y también sus características, como es la viscosidad, lo que puede conducir a conclusiones diferentes. Como en ocasiones anteriores, se prepararon diversas membranas usando volúmenes

⁴ Bakker, E., Bühlmann, P. y Pretsch, E., Chem. Rev., 97, 3083 (1997).

⁵ Seiler, K., Morf, W.E., Rusterholz, B. y Simon, W., Anal. Sci., 5, 557 (1989).

⁶ Lerchi, M., Orsini, F., Cimerman, Z., Pretsch, E., Chowdhuey, D. y Kamata, F., Anal. Chem., 68, 3210 (1996).

comprendidos entre 10 y 25 μl , Se selecciona un volumen de 20 μl , pues es el que conduce a un menor consumo de cóctel y a una buena respuesta.

2.1.5. Influencia de la velocidad de rotación.

Al igual que el volumen utilizado, la velocidad de rotación del sistema centrífugo afecta al diámetro de la zona activa, pero afecta de modo diferente al espesor ya que para un mismo volumen de cóctel, un aumento en las revoluciones conlleva un aumento en la fuerza centrífuga, lo que hace aumentar el diámetro de la zona activa y disminuir el espesor de la misma⁷. Esta variable no afecta solo a la señal analítica sino que afecta también a la homogeneidad de la zona activa propiedad de vital importancia para obtener una reproducibilidad aceptable. Por ello, tras el estudio oportuno, se fijó la velocidad de giro en 170 r.p.m.

2.1.6. Sistema usado para la evaporación del disolvente.

Como se ha señalado en capítulos anteriores, la forma en que se lleva a cabo la evaporación del disolvente tiene una gran influencia en la homogeneidad de la zona activa. Se ha comprobado que una evaporación lenta en una atmósfera saturada en vapores del disolvente es la que origina membranas con mayor reproducibilidad. En concreto, se observó que los mejores resultados se obtuvieron dejando evaporar el disolvente durante 30 segundos mientras que el plato giratorio se encontraba rotando. Transcurrido ese tiempo se colocó la membrana en una atmósfera saturada de THF a temperatura ambiente para conseguir una adecuada velocidad de evaporación.

2.1.7. Preparación de la membrana.

Como consecuencia del estudio anterior se propone la siguiente receta operatoria para la preparación de tiras reactivas para magnesio. El cóctel se obtiene pesando 25,00 mg (27,5

⁷ Seiler, K. y Simon, W., Anal. Chim. Acta, 266, 73 (1992).

% p/p) de PVC, 63,00 mg (69,2 % p/p) de tributilfosfato, 0,95 mg (1,0 % p/p) de N,N' diheptil-N,N'-dimetil-aspartamida, 0,78 mg (0,9 % p/p) de azul Nilo lipofilizado y 1,33 mg (1,5 % p/p) de tetrakis(7-clorofenil)borato potásico en un vial de vidrio y disolviendo todo en 1,0 ml de tetrahidrofurano. Se depositan 20 μl de ese cóctel sobre una lámina de poliéster de 14 mm \times 40 mm \times 0,25 mm de espesor con ayuda de un sistema centrífugo. Tras dejar la membrana a vacío y a temperatura ambiente, durante 3 minutos, para permitir una lenta evaporación del disolvente, se obtiene una película circular sólida, homogénea, adherida al soporte sólido, transparente y de color rojo. Las dimensiones de la zona sensora son de 6 mm de diámetro y el espesor calculado es de 7 μm . Las concentraciones de ionóforo, cromoionóforo y anión lipofílico en el sensor una vez preparado son de 29,34, 14,67, y 29,43 mmol kg⁻¹, respectivamente.

Las características físicas y dimensiones finales del sensor utilizando los componentes seleccionados se reflejan en la Figura 6.6.

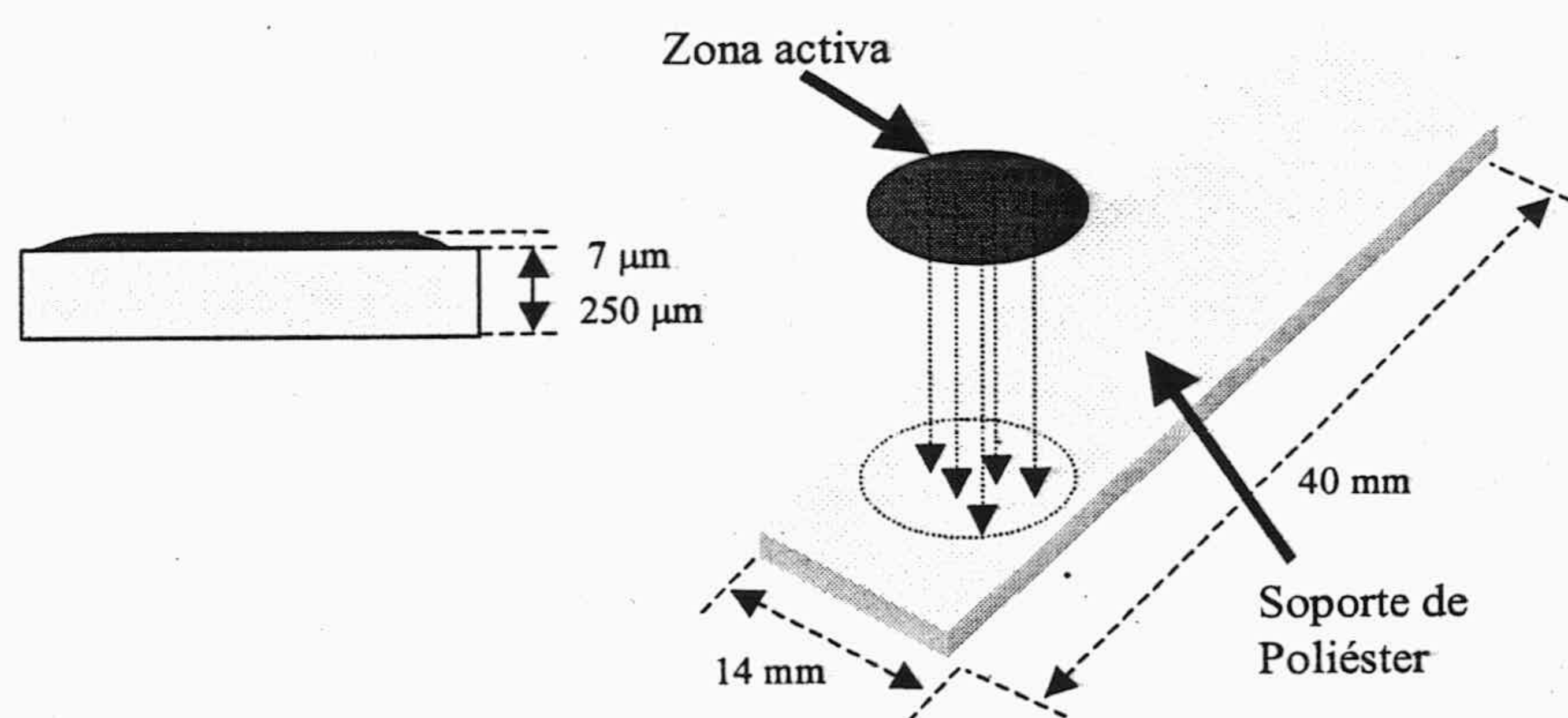


Figura 6.6. Dimensiones y características de la membrana.

2.2. Parámetros relacionados con el proceso de equilibración

Los parámetros relacionados con el proceso de equilibración entre la muestra conteniendo analito y la tira reactiva que se han estudiado son pH, tiempo de contacto y actividad en magnesio.

2.2.1. Influencia del pH.

Como ya se ha señalado, el valor del parámetro analítico que estamos usando $1-\alpha_{ef}$, depende del cociente de actividades entre magnesio y protones y tiene influencia sobre diversos aspectos relacionados con estos sensores, como son la forma de la curva respuesta y la sensibilidad.

Para seleccionar el pH de trabajo se ha realizado un estudio de la forma de la curva respuesta para diferentes iones, así como de la selectividad que muestra la membrana reactiva preparada según queda dicho más arriba, para diferentes valores de pH.

Para ello, se fabricaron diferentes membranas a partir de un cóctel con la misma composición: 25,00 mg de PVC, 63,00 mg de TBP, 0,95 mg de DDA, 0,78 mg de azul Nilo lipofilizado y 1,33 mg TCFB disuelto todo en 1,0 ml de THF. Se prepararon en matraces de 50 ml un conjunto de series de los iones Mg(II), Ca(II), Na(I) y K(I) a cinco niveles de concentración diferentes ($5 \cdot 10^{-4}$, $1 \cdot 10^{-3}$, $1 \cdot 10^{-2}$, $5 \cdot 10^{-2}$ y $1 \cdot 10^{-1}$ M). A continuación, se adicionó a cada matraz 5,0 ml del tampón Tris 0,2 M del pH adecuado para cada caso.

Tabla 6.4. Valores de coeficientes de selectividad.

pH	$-\log K_{Mg,Ca}$	$-\log K_{Mg,Na}$	$-\log K_{Mg,K}$
7,5	-0,668	-0,194	-0,392
8,0	-0,763	-0,716	-0,825
8,5	-1,104	-1,283	-1,512
9,0	-0,904	-0,725	-0,957

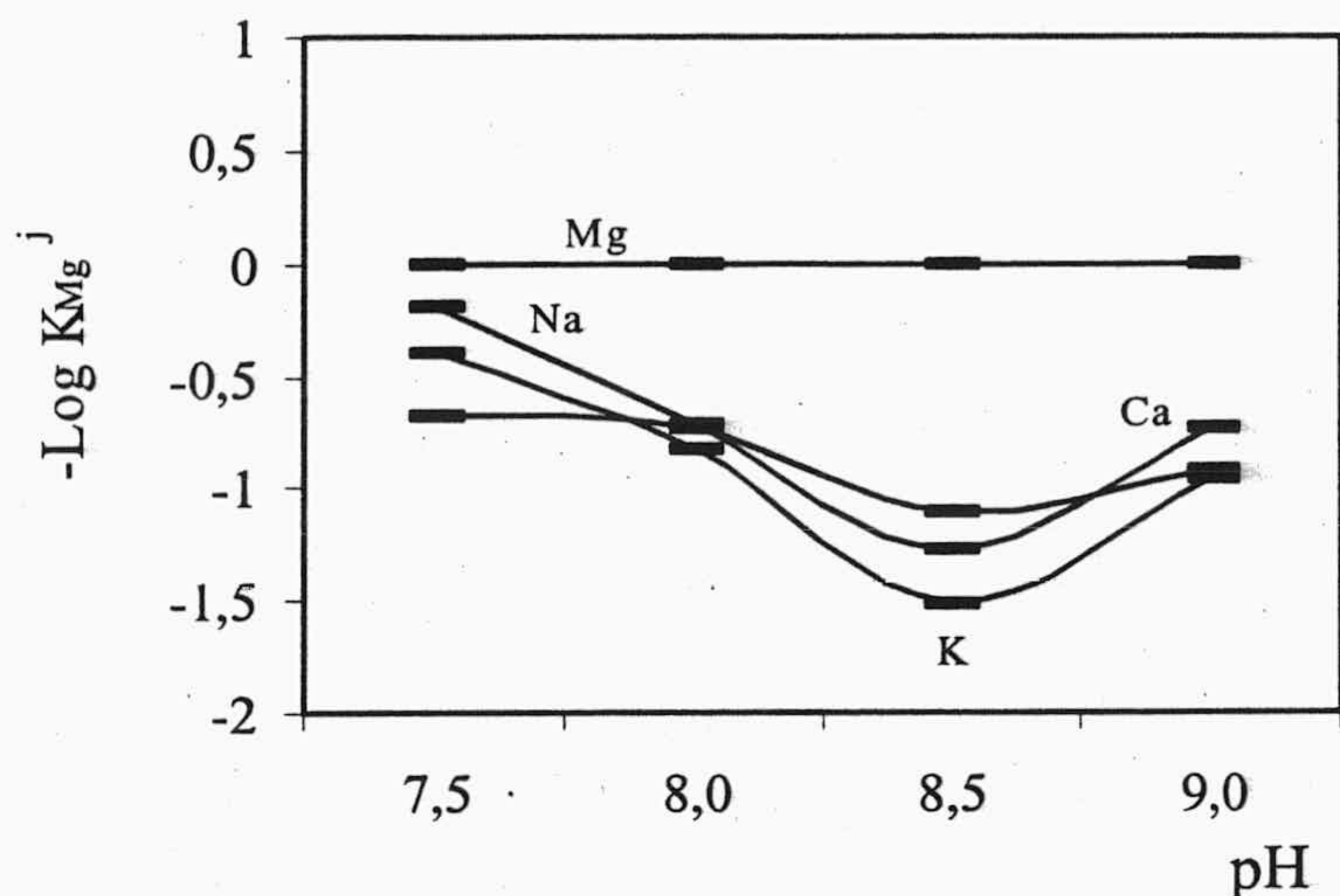


Figura 6.7. Influencia del pH sobre la selectividad

A la vista de los resultados reflejados por la Tabla 6.4 y representados en la Figura 6.7 se concluye que el pH óptimo de trabajo es 8,5 tanto en el caso de alcalinos como de alcalinotérreos.

2.2.1.1. Selección de la disolución amortiguadora.

Para elegir la disolución reguladora de pH 8,5 más adecuada para la determinación de magnesio se probaron tres tampones diferentes, en concreto ácido bórico/borato sódico 0,2 M, dietanolamónio/dietanolamina 0,2 M y Tris 0,2 M. Este último es el que origina mejor respuesta y presenta buena estabilidad, por ello este es seleccionado y se emplea a una concentración 0,2 M.

2.2.2. Influencia de la actividad de magnesio. Verificación del modelo.

Para la estudiar la influencia de la actividad en magnesio sobre la respuesta de la tira reactiva se preparan membranas que presentan la composición antes señalada como óptima. Dichas membranas se ponen en contacto con disoluciones a pH 8,5 ajustado con tampón Tris

0,2 M, cuyas actividades van desde $1,36 \cdot 10^{-1}$ M a $7,91 \cdot 10^{-8}$ M (1 M y 10^{-7} M en concentraciones). En la tabla 6.5 se muestran los valores experimentales de $1-\alpha_{ef}$ obtenidos y en la Figura 6.8 se representan.

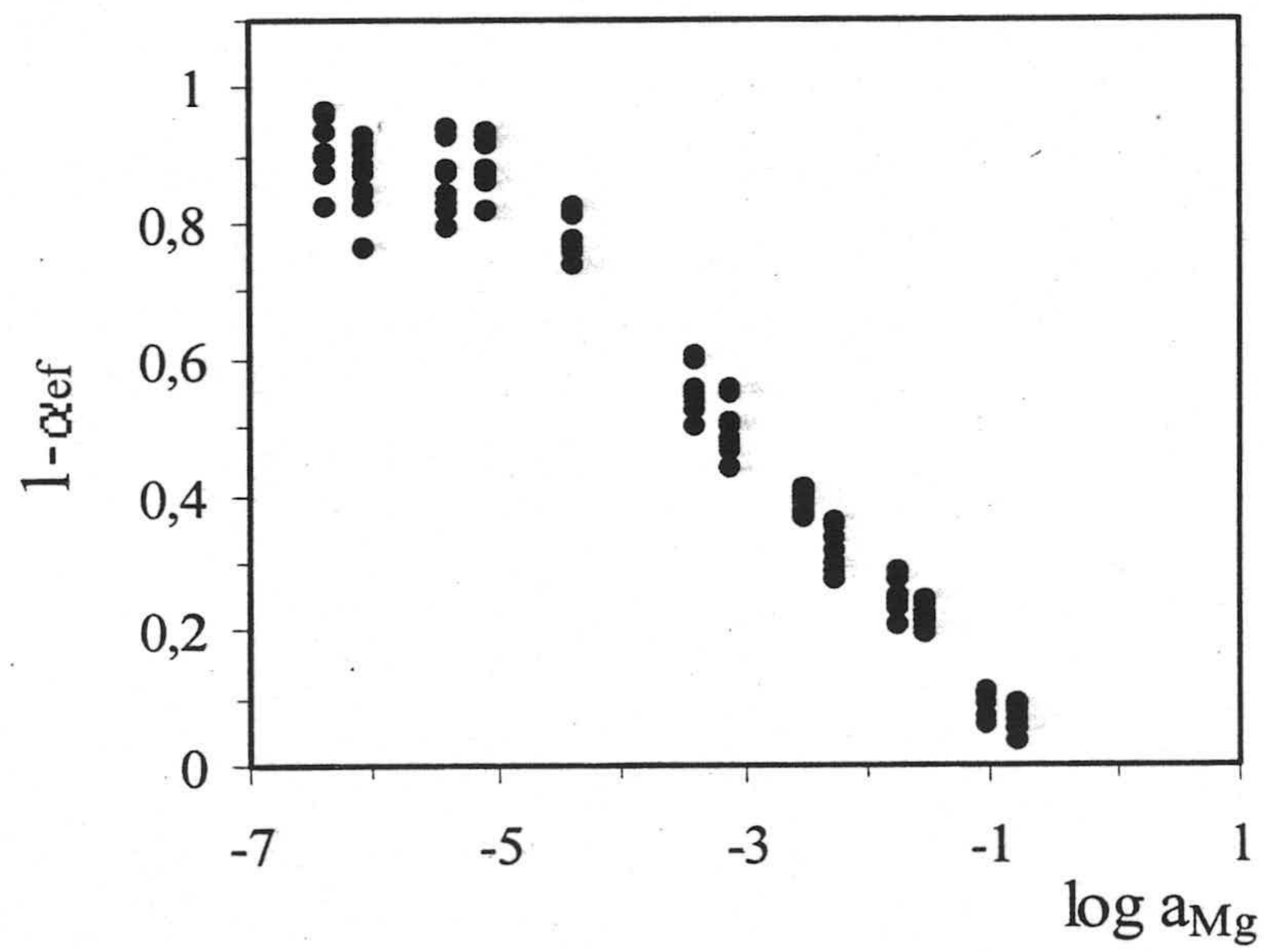


Figura 6.8. Influencia de la actividad en magnesio sobre $1-\alpha_{ef}$.

Tabla 6.5 Influencia de la actividad en magnesio. Valores experimentales.

Nº	Log a _{Mg}	1-α _r	nº	Log a _{Mg}	1-α _r	nº	Log a _{Mg}	1-α _r	nº	Log a _{Mg}	1-α _r
1	-7,1006	0,9644	4	-5,4018	0,9311	8	-3,1363	0,5042	11	-1,7573	0,2517
1	-7,1006	0,8274	4	-5,4018	0,8424	8	-3,1363	0,5012	11	-1,7573	0,2104
1	-7,1006	0,8265	4	-5,4018	0,8793	8	-3,1363	0,4661	11	-1,7573	0,2048
1	-7,1006	0,9069	4	-5,4018	0,8764	8	-3,1363	0,5568	12	-1,5474	0,1968
1	-7,1006	0,9724	5	-5,1010	0,8164	8	-3,1363	0,5526	12	-1,5474	0,2249
1	-7,1006	0,9646	5	-5,1010	0,9188	8	-3,1363	0,4430	12	-1,5474	0,2245
1	-7,1006	0,8813	5	-5,1010	0,9168	8	-3,1363	0,4823	12	-1,5474	0,2136
1	-7,1006	0,9219	5	-5,1010	0,8801	8	-3,1363	0,4772	12	-1,5474	0,2439
1	-7,1006	0,9162	5	-5,1010	0,9361	9	-2,5169	0,3891	12	-1,5474	0,2380
2	-6,4016	0,8227	5	-5,1010	0,9307	9	-2,5169	0,3835	12	-1,5474	0,2037
2	-6,4016	0,9657	5	-5,1010	0,8644	9	-2,5169	0,3975	12	-1,5474	0,2274
2	-6,4016	0,9682	5	-5,1010	0,8762	9	-2,5169	0,3766	12	-1,5474	0,2188
2	-6,4016	0,8973	5	-5,1010	0,8686	9	-2,5169	0,3684	13	-1,0397	0,0724
2	-6,4016	0,9657	6	-4,4038	0,7566	9	-2,5169	0,3886	13	-1,0397	0,0750
2	-6,4016	0,9567	6	-4,4038	0,8156	9	-2,5169	0,3749	13	-1,0397	0,0745
2	-6,4016	0,8710	6	-4,4038	0,8136	9	-2,5169	0,4089	13	-1,0397	0,0893
2	-6,4016	0,9056	6	-4,4038	0,7638	9	-2,5169	0,4061	13	-1,0397	0,1085
2	-6,4016	0,9370	6	-4,4038	0,8267	10	-2,2732	0,2742	13	-1,0397	0,1061
3	-6,1006	0,7616	6	-4,4038	0,8191	10	-2,2732	0,2893	13	-1,0397	0,0639
3	-6,1006	0,8266	6	-4,4038	0,7388	10	-2,2732	0,3010	13	-1,0397	0,1058
3	-6,1006	0,8520	6	-4,4038	0,7770	10	-2,2732	0,3373	13	-1,0397	0,1016
3	-6,1006	0,8710	6	-4,4038	0,7675	10	-2,2732	0,3547	14	-0,7953	0,0569
3	-6,1006	0,9311	7	-3,4213	0,5006	10	-2,2732	0,3609	14	-0,7953	0,0936
3	-6,1006	0,9190	7	-3,4213	0,5537	10	-2,2732	0,3169	14	-0,7953	0,0839
3	-6,1006	0,8432	7	-3,4213	0,5446	10	-2,2732	0,2767	14	-0,7953	0,0694
3	-6,1006	0,8885	7	-3,4213	0,5404	10	-2,2732	0,2772	14	-0,7953	0,0845
3	-6,1006	0,9059	7	-3,4213	0,6043	11	-1,7573	0,2741	14	-0,7953	0,0799
4	-5,4018	0,7926	7	-3,4213	0,6005	11	-1,7573	0,2380	14	-0,7953	0,0365
4	-5,4018	0,8319	7	-3,4213	0,5256	11	-1,7573	0,2351	14	-0,7953	0,0864
4	-5,4018	0,8190	7	-3,4213	0,5497	11	-1,7573	0,2435	14	-0,7953	0,0689
4	-5,4018	0,8826	7	-3,4213	0,5460	11	-1,7573	0,2893			
4	-5,4018	0,9417	8	-3,1363	0,4696	11	-1,7573	0,2744			

Se observa que los puntos experimentales se ajustan a la curva respuesta predicha según el modelo antes comentado y presentado en la ecuación 6.1.

Como se ha indicado con anterioridad, la estequiometría de la especie formada influye sobre la forma de la curva respuesta. Para sugerir una posible estequiometría para el complejo ionóforo:magnesio se han representado en la Figura 6.9 la curva teórica que resultaría de suponer que el índice estequiométrico p fuera 0,5, 1 ó 2. De la observación de esa figura se descarta la estequiometría 2. Sin embargo, no es posible discernir entre los índices estequiométricos 0,5 y 1 por simple inspección de la figura anterior. A pesar de que para iones de carga superior a 1 la diferencia en las curvas teóricas en función del valor dado a la estequiometría (p) es sensiblemente menor que en iones monovalentes, se trata de establecer el valor de p , ajustando los valores experimentales a la función teórica⁸, según la función 6.4:

$$\Sigma[(1-\alpha)_{\text{teorico}}-(1-\alpha)_{\text{experimental}}]^2 \quad (6.4)$$

Los resultados obtenidos son: 0,0215 ($p=0,33$); 0,0324 ($p=1$); 0,1094 ($p=2$) y sugieren una estequiometría 2:1 para el complejo magnesio-ionóforo.

⁸ K. Seiler, W.E. Morf, B. Rusterholz and W. Simon, Anal. Sci., 5, 557 (1989)

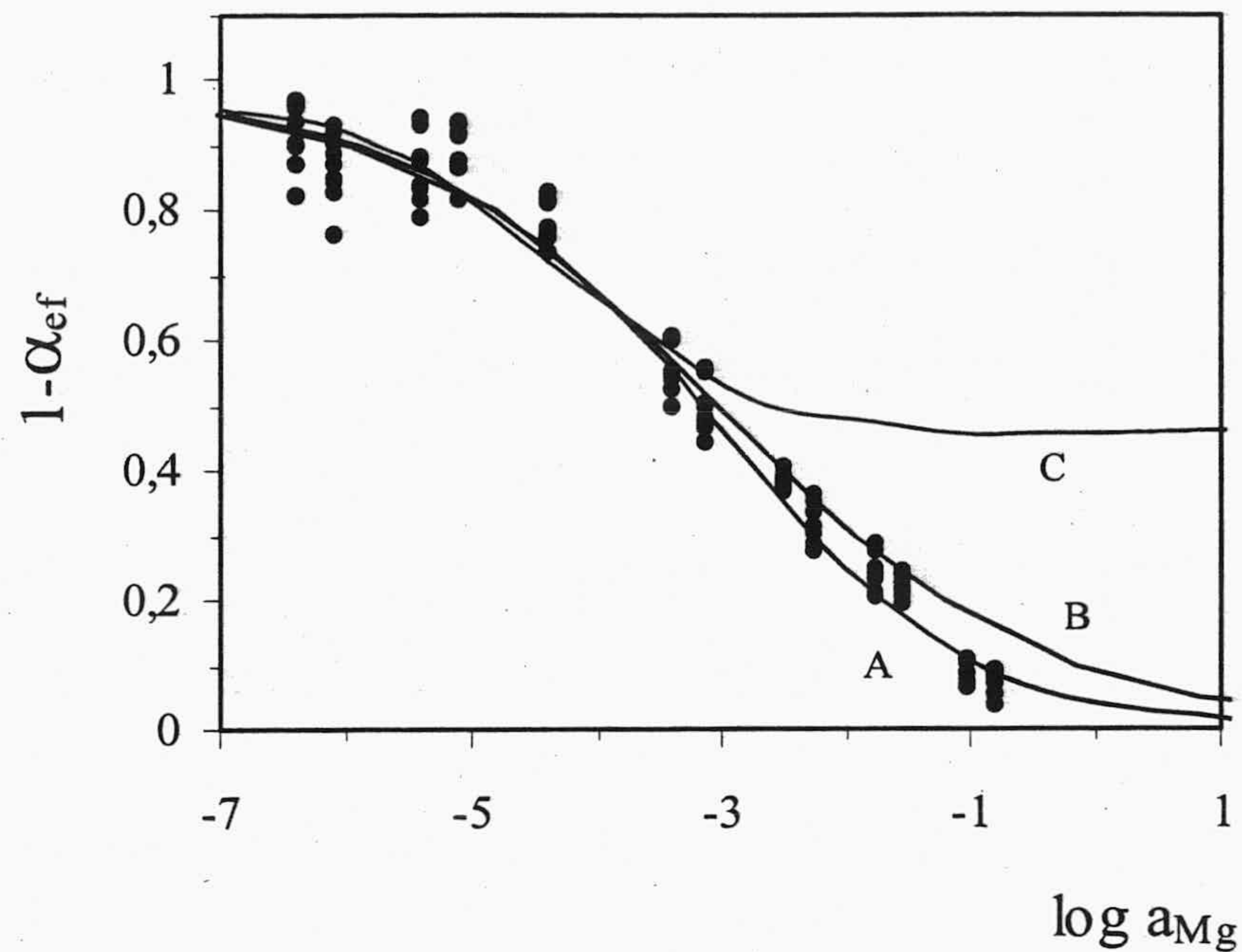


Figura 6.9. Estequiometría de la reacción de intercambio. Curvas teóricas: A : $p = 0,33$; B: $p = 1$; c : $p = 2$.

Mediante ajuste por mínimos cuadrados de los puntos experimentales en la zona lineal de máxima pendiente (8 niveles de concentraciones diferentes y 9 réplicas de cada una), es posible calcular para $\log K_e^{MgL_p^{2+}}$ el valor de 14,11.

2.2.3. Tiempo de contacto.

Para establecer el tiempo necesario que debe estar la tira reactiva desarrollada en contacto con la disolución problema, se prepararon tres sensores con la composición óptima antes establecida y se introdujeron en una disolución 0,1 M de Mg(II) a pH 8,5, realizando un estudio cinético como los antes comentados. Se observa que la señal se hace estable a los 200 segundos, no encontrando a partir de ahí ninguna variación superior al 5% de la señal a tiempo infinito o superior a la propia variabilidad del sistema. No obstante, se ha establecido como tiempo de respuesta 300 segundos, ampliando de este modo el margen de seguridad.

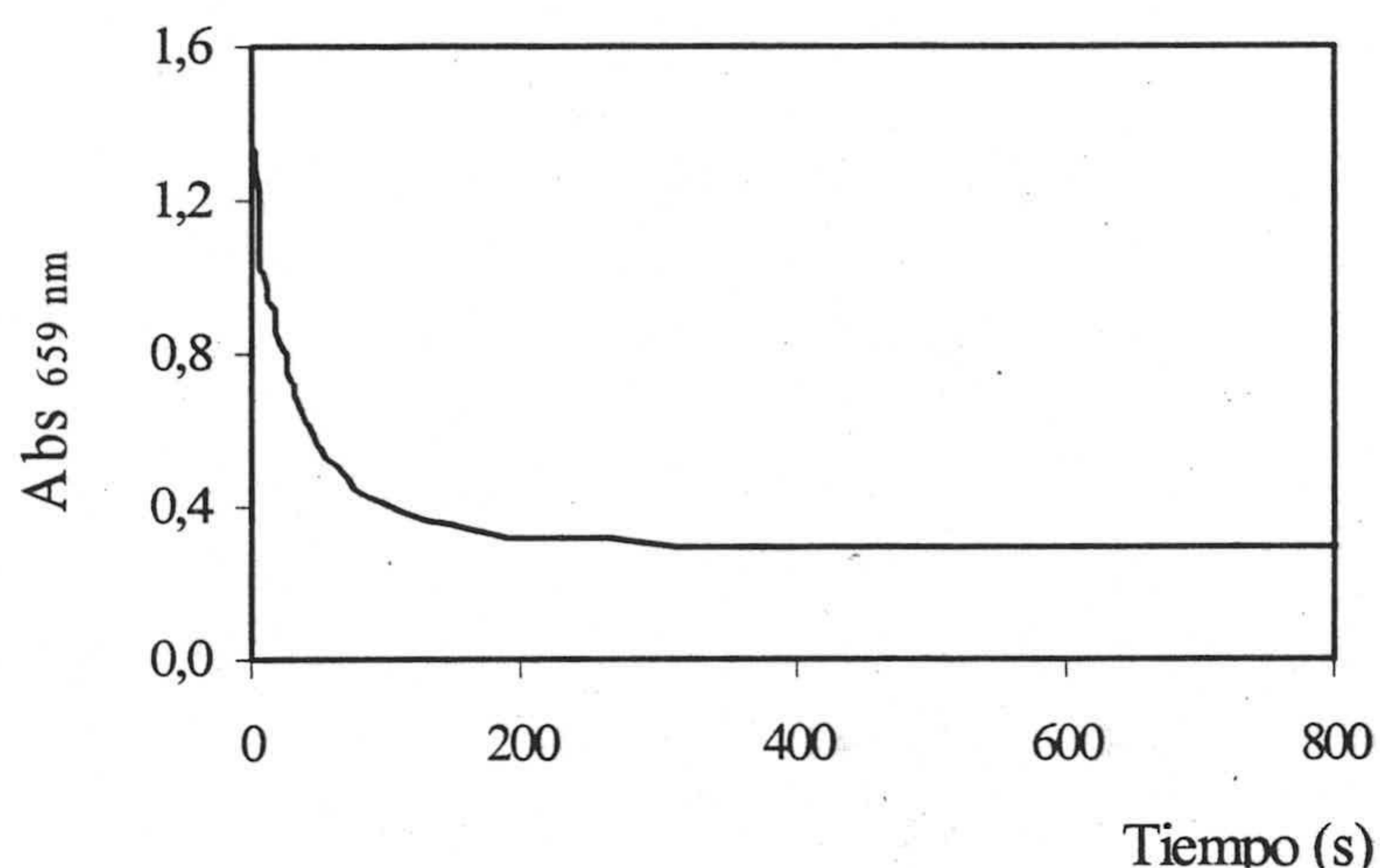


Figura 6.10. Variación de la señal respuesta para magnesio en función del tiempo.

3. Parámetros analíticos de la tira reactiva.

3.1. Límite superior e inferior y rango dinámico lineal

Para establecer el calibrado y sus límites superior e inferior, según se comentó en la Introducción y en anteriores capítulos, se prepararon dos series de patrones, una en la zona de máxima pendiente (5 niveles, 9 réplicas por nivel), entre $9,13 \cdot 10^{-2}$ y $3,79 \cdot 10^{-4}$ en actividades ($5 \cdot 10^{-1}$ y $5 \cdot 10^{-4}$ M en concentración) y otra en la zona independiente de la concentración y formada por 5 niveles y 9 réplicas por nivel, entre $7,92 \cdot 10^{-6}$ y $7,93 \cdot 10^{-8}$ en actividades (10^{-5} y 10^{-7} M in concentración). Los resultados experimentales obtenidos se indican en la Tabla 6.5.

La linealidad de las dos rectas fue comprobada aplicando el test de fallo de ajuste. Las ecuaciones de las rectas obtenidas son:

$$1-\alpha_{ef} = 0,784 - 0,018 \log a_{Mg^{2+}} \quad (6.5)$$

$$1-\alpha_{ef} = -0,115 - 0,197 \log a_{Mg^{2+}} \quad (6.6)$$

La intersección de ambas funciones nos proporciona un límite inferior del rango de medida de 0,009 mM. Por analogía, el límite superior está definido por la intersección de la función de calibrado con el eje de abscisas; así pues, el valor obtenido para el límite superior es 260 mM. Por tanto, se puede establecer que el rango de medida para la determinación de magnesio está comprendido entre 0,019 y 260 mM, expresado en actividades. Si bien en la práctica se prefiere usar el valor de 160 mM (1000 mM en concentración) como límite superior del rango de medida porque se trata del valor más alto ensayado.

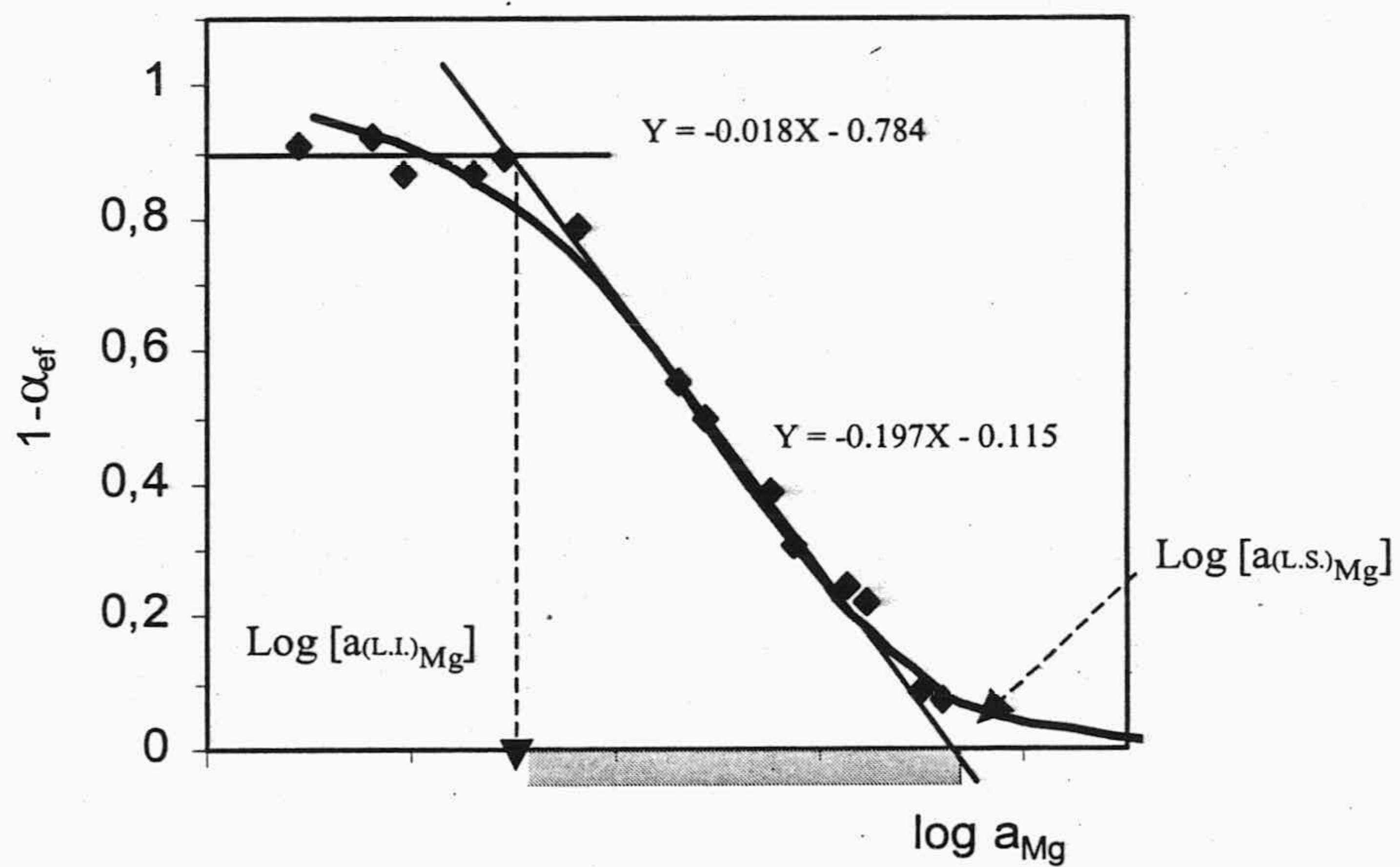


Figura 6.11. Límite superior (L.S.); límite inferior(L.I.) y rango de medida sombreado en verde.

3.2. Precisión

Para evaluar la precisión del procedimiento propuesto (expresada como la desviación estándar relativa) se realizó un estudio a tres niveles de concentración usando una disolución de Mg (II); en concreto: $7,31 \cdot 10^{-4}$, $5,33 \cdot 10^{-3}$ y $9,13 \cdot 10^{-2}$ M en actividades ($1 \cdot 10^{-3}$, $1 \cdot 10^{-2}$ y $5 \cdot 10^{-1}$ M en concentraciones) que se encuentran situados en la zona alta, media y baja de la función de calibrado.

Para cada una de estas concentraciones se realiza un estudio de precisión tanto usando una sola membrana, esto es, se calcula la precisión intramembrana, como usando distintas membranas, esto es, la precisión intermembrana.

a) Precisión intermembrana. En este caso se utilizan diez sensores diferentes con la misma composición óptima y se ponen en contacto con cada disolución de los diferentes niveles de concentración de magnesio. En la Tabla 6.6 se muestran los resultados obtenidos.

Tabla 6.6. Reproducibilidad intermembrana del sensor de magnesio

Actividad	log a_{Mg}										D.E.R.(%)
BAJA	-10,079	-8,041	-9,951	-8,732	-9,645	-8,453	-8,320	-8,732	-9,543	-9,502	-8,0
MEDIA	-6,055	-5,861	-7,323	-7,586	-8,412	-7,480	-5,405	-5,913	-6,731	-6,753	-14,1
ALTA	-1,261	-1,421	-2,248	-1,368	-2,095	-2,291	-0,783	-0,790	-0,919	-1,294	-39,8

La repetibilidad del método usando diferentes sensores y realizando diez réplicas de cada uno de ellos fue de 8,0, 14,1 y 39,8 % en términos de $\log a_{Mg^{2+}}$. Es de destacar que conforme mayor es la actividad, menor es la señal y, en consecuencia, mayor la desviación estándar relativa encontrada.

b) Precisión intramembrana. Se utiliza una sola membrana con la composición óptima establecida y se introduce por diez veces en cada disolución de los diferentes niveles de magnesio estudiados. Tras cada equilibrado con la disolución se trata con HCl 0,1 M para

regenerarla y dejarla preparada para una nueva medida. Los resultados se recogen en la tabla 6.7.

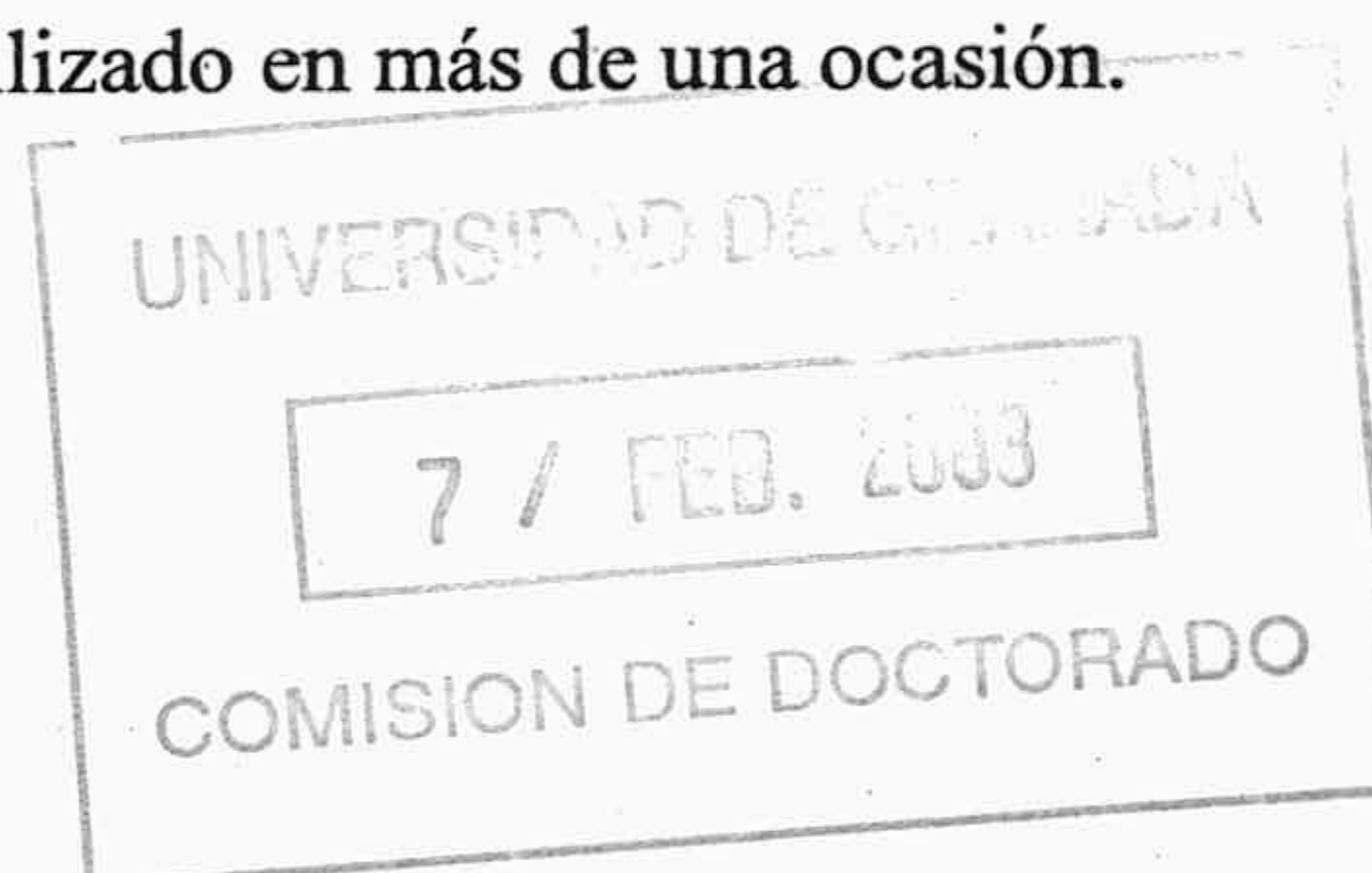
Tabla 6.7. Reproducibilidad intramembrana del sensor de magnesio

Actividad	log a_{Mg}									D.E.R.(%)
BAJA	-6,448	-6,315	-7,019	-6,891	-6,108	-5,995	-6,802	-6,701	-6,660	-5,4
MEDIA	-4,200	-4,002	-4,471	-4,240	-4,160	-3,954	-4,177	-4,168	-4,165	-3,5
ALTA	-1,418	-1,306	-1,688	-1,565	-1,890	-1,737	-1,660	-1,515	-1,469	-11,3

La precisión usando la misma tira reactiva y expresada como desviación estándar relativa de diez réplicas realizadas a tres niveles diferentes de concentración de fue 5,4; 3,5 y 11,3 % en términos de $\log a_{Mg^{2+}}$. La precisión es, en este caso, mejor que usando diferentes membranas, pues a sí evitamos incluir la variabilidad de la preparación de las mismas. Destaca, por otra parte, que la tira reactiva desarrollada para magnesio muestra un comportamiento reversible y puede ser utilizado en más de una ocasión.

3.3. Tiempo de vida.

El tiempo de vida de la tira sensora desarrollada se ha establecido ensayando de forma periódica su capacidad de respuesta. Para ello se prepararon un conjunto de tiras reactivas que se guardaron, cada una de ellas en un tubo de plástico cerrado, alejado de la humedad y de la luz para evitar la fotodescomposición de los componentes de la membrana. Cada semana se comprobó el estado de la misma realizando un espectro previo y, a continuación, estableciendo su respuesta frente a una disolución de magnesio 0,1 M. Posteriormente, se trató con HCl 0,1 M, se lavó con agua y secó, siendo conservada de la misma forma. Tras el estudio se pudo concluir que las tiras sensoras desarrolladas tienen una duración mínima de un mes y medio.



3.4. Costo

El costo de cada sensor ha sido estimado empleando el coste de cada uno de los componentes del sensor cuyos precios han sido obtenidos de los respectivos catálogos actualizados. Así pues, el costo es un estimado para el prototipo desarrollado que en ningún caso coincidiría con el costo estándar de una fabricación en serie. En la tabla 6.8 se detalla el costo de este sensor para magnesio, concluyéndose que el coste de materiales es aproximadamente de un céntimo de euro.

Tabla 6.8. Evaluación del costo de la tira reactiva para magnesio

Componente	Precio (€/mg ó ml)	Cantidad/sensor	Precio (€)
DDA	0.00242	0.0156 mg	$3.7 \cdot 10^{-5}$
Azul Nilo liofilizado	0.06	0.0156 mg	0.0009
TCFB	0.1	0.0266 mg	0.0027
PVC	0.0001	0.5 mg	0.0001
TBP	0.1	0.0126 mg	0.0013
THF	0.03	0.02 ml	0.0006
Mvlar	0.00048	4 cm ²	0.0019
Total			0,0075 €

En la Tabla 6.9 se recogen los parámetros analíticos establecidos para el procedimiento propuesto para magnesio.

Tabla 6.9. Resumen de los parámetros analíticos

Parámetros		Valor; S
Ordenada en el origen		-0,1153; 0,0098
Pendiente		-0,1967; 0,0033
Nivel de probabilidad % (lack-of-fit test)		15,3
Limite inferior (mM)		0,009
Rango lineal (mM)		0,009 – 160
DER (%) ^a	0,073 mM ^b	5,9
Intrasensor	5,3 mM ^b	4,1
	90,1 mM ^b	18,0
DER (%) ^a	0,073 mM ^b	8,0
Intersensor	5,3 mM ^b	14,1
	90,1 mM ^b	39,8
Precio unitario		0,0075 €

a: DER en términos de $\log a_{\text{Mg}^{2+}}$; b: Actividades

4. Procedimiento propuesto.

Se toma una alícuota de una disolución patrón conteniendo magnesio en actividades comprendidas entre 0,009 y 160 mM (0,02 y 1000 mM en concentración). Se coloca en un matraz de 50 ml y se le añaden 5,0 ml de una disolución reguladora de tris(hidroximetil)aminometano 0,2 M de pH 8,5, enrasando con agua. Se toman 10,0 ml de la anterior disolución que se introducen en un tubo de polietileno de 10x1,5 cm junto con el

sensor desechable para magnesio durante cinco minutos y sin agitación. A continuación, la membrana se saca de la disolución y se sacude para eliminar las gotas de disolución que la puedan mojar; tras lo cual se mide la absorbancia a 659 nm en la forma anteriormente descrita. Además, se mide la absorbancia de cada membrana tras haberla equilibrado con NaOH 0,01 M y posteriormente tras haberla equilibrado con la disolución reguladora de pH 8,5. Con estos datos se calcula $1-\alpha_{ef}$. La estimación de la actividad en dureza se realiza mediante calibrado de $1-\alpha_{ef}$ frente a $\log a_{Mg^{2+}}$. Todas las medidas se realizan a temperatura ambiente. No es necesario acondicionar las membranas antes de su uso.

En el caso de muestras de agua, se introducen 9 ml de agua en un tubo de polietileno junto con 1 ml de tampón Tris 0,2 de pH 8,5, operando igual que antes.

5. Aplicaciones y validación

Para estudiar la aplicabilidad de la tira reactiva desarrollada para la determinación de magnesio, se han seleccionado varios tipos de aguas (naturales, minerales y de abastecimiento urbano). Para la validación de resultados, se han comparado resultados con los obtenidos utilizando un procedimiento de espectrofotometría de absorción atómica.

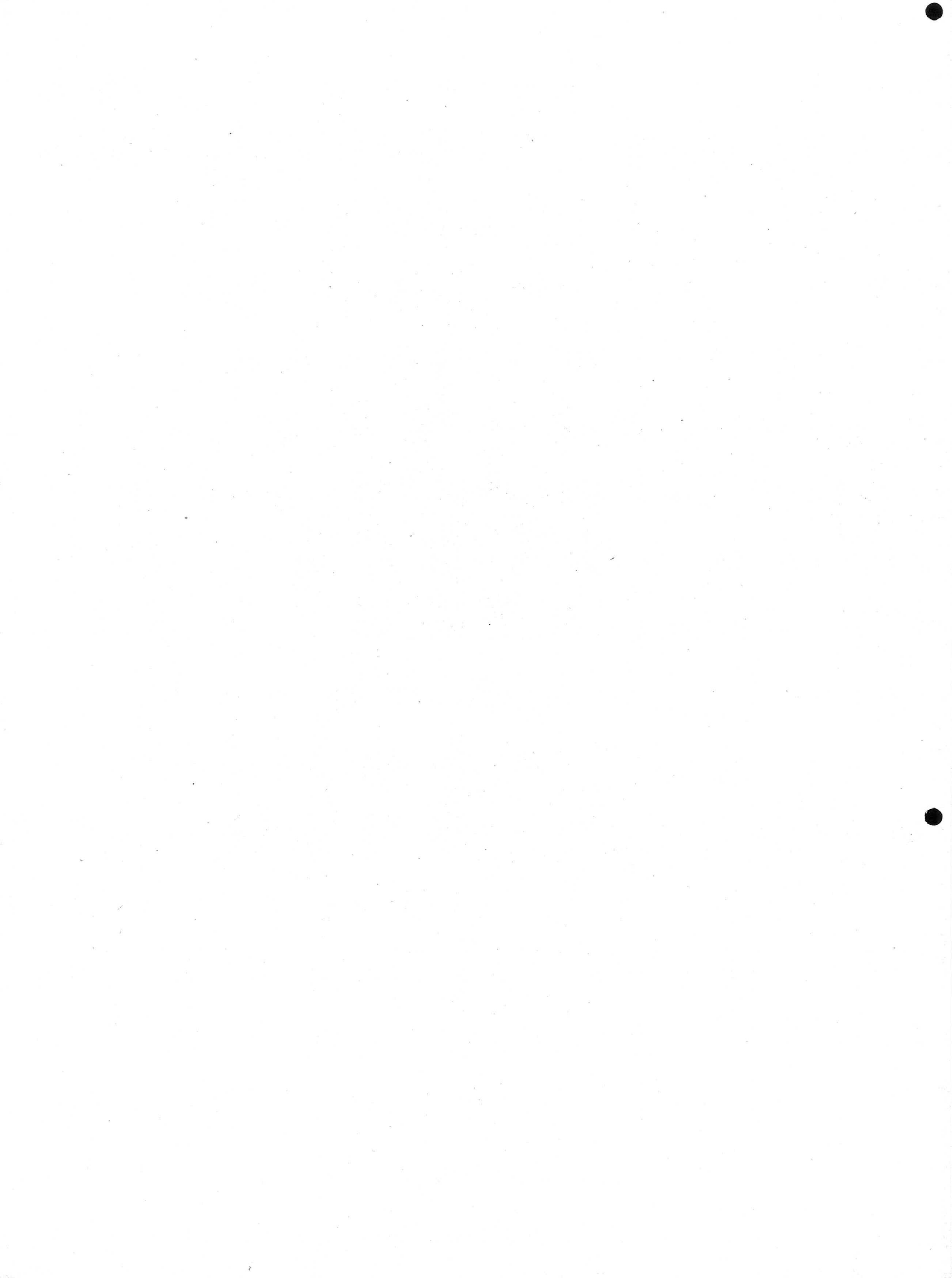
La Tabla 6.10 nos muestra los resultados obtenidos con el sensor óptico desarrollado y los resultados obtenidos con el método de referencia utilizado. En la tabla 6.10 se ofrecen los valores medios de tres determinaciones para cada muestra con cada uno de los métodos, la desviación estándar de estas medidas y el valor P del test de comparación de medias utilizado. Como puede observarse no existe diferencia significativa entre las medias obtenida utilizando la tira reactiva y el método de referencia.

Tabla 6.10. Determinación de magnesio en diferentes tipos de aguas usando EEA como método referencia

Muestra	Tira reactiva (mM Mg)	S	Metodo referencia (mM Mg)	S	P _{val} (%)
Agua urbana (<i>Granada</i>)	0,477	0,085	0,445	0,011	28,3
Agua mineral (<i>Fonte Forte</i>)	0,43	0,11	0,386	0,003	27,3
Agua mineral (<i>San Vicente</i>)	0,367	0,055	0,352	0,001	33,6
Agua mineral (<i>Lanjarón</i>)	0,54	0,11	0,425	0,003	10,1
Agua mineral (<i>Fuente primavera</i>)	1,31	0,11	1,131	0,005	5,7
Agua mineral (<i>Fuente Liviana</i>)	0,86	0,17	0,851	0,005	44,9
Agua mineral (<i>Zambra</i>)	1,28	0,23	1,177	0,005	36,1
Agua mineral (<i>Solan de Cabras</i>)	1,33	0,12	1,250	0,013	19,6
Agua de pozo (<i>Colomera, Granada</i>)	0,88	0,18	0,876	0,082	47,0
Agua urbana (<i>Otura, Granada</i>)	1,74	0,13	1,640	0,026	12,6

CAPITULO 6 DETERMINACIÓN DE MAGNESIO EN AGUAS MEDIANTE UNA TIRA REACTIVA	255
1. Introducción.....	255
2. Optimización de la respuesta de la tira reactiva.....	258
2.1. Composición y preparación de la membrana.....	258
2.1.1. Selección de los reactivos.....	258
2.1.2. Estudio de la proporción óptima anión lipofílico/ionóforo.....	261
2.1.3. Influencia del porcentaje de plastificante	265
2.1.4. Influencia del volumen de cóctel.....	267
2.1.5. Influencia de la velocidad de rotación.....	268
2.1.6. Sistema usado para la evaporación del disolvente.....	268
2.1.7. Preparación de la membrana.	268
2.2. Parámetros relacionados con el proceso de equilibración	270
2.2.1. Influencia del pH.....	270
2.2.1.1. Selección de la disolución amortiguadora.	271
2.2.2. Influencia de la actividad de magnesio. Verificación del modelo.....	271
2.2.3. Tiempo de contacto.	275
3. Parámetros analíticos de la tira reactiva.....	276
3.1. Límite superior e inferior y rango dinámico lineal	276
3.2. Precisión	278
3.3. Tiempo de vida.....	279
3.4. Costo.....	280
4. Procedimiento propuesto.....	281
5. Aplicaciones y validación.....	282

CAPÍTULO 7
CARACTERIZACIÓN DE UNA
TIRA REACTIVA PARA LA
DETERMINACIÓN DE
DUREZA EN AGUA



CAPÍTULO 7

CARACTERIZACIÓN DE UNA TIRA REACTIVA PARA LA DETERMINACIÓN DE DUREZA EN AGUA

1. Introducción.

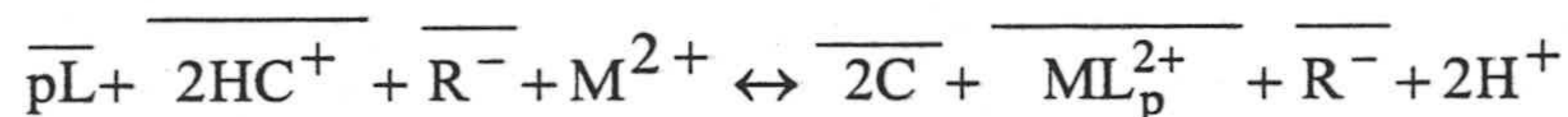
En este Capítulo 7 se propone una tira reactiva para la determinación de dureza en aguas de diverso tipo. Esta tira reactiva es un sensor óptico de un solo uso que mide la absorción de radiación por transmisión. Emplea una tira de poliéster como soporte inerte, la cual presenta una microzona que contiene todos los reactivos necesarios, excepto la disolución amortiguadora, para responder selectiva y cuantitativamente a dureza, esto es, a la suma de calcio más magnesio, modificando el color de esa zona sensora. La tira reactiva

propuesta se basa en el empleo de un ionóforo y un cromoionóforo, y funciona según un mecanismo de intercambio iónico¹.

Este sensor óptico de un solo uso reversible, presenta una zona sensora compuesta por un ionóforo neutro selectivo para calcio y magnesio, bajo las condiciones establecidas a lo largo del estudio, el 4,13-[bis(N-adamantilcarbamoil)acetil]-1,7,10,16-tetraoxa-4,13,-diazaciclooctadecano, conocido como K22B5², el cromoionóforo azul Nilo lipofilizado, y la sal lipofílica tetrakis (7-clorofenil)borato potásico; todos ellos retenidos en una membrana circular de PVC plastificado. La tira reactiva desarrollada es transparente, de color rojo y responde selectivamente y de forma rápida a la suma de las actividades de ambos alcalinotérreos.

En este caso, el objetivo perseguido es el opuesto al de casos anteriores, pues allí intentábamos lograr una alta selectividad para el ión objetivo. Aquí buscamos que la tira reactiva tenga la misma selectividad para calcio que para magnesio, a la vez que presente una alta discriminación hacia iones alcalinos. De esta manera la tira responderá a dureza total. Mediante el ajuste de la composición de la zona sensora, especialmente la relación sal lipofílica a ionóforo y de las condiciones de reacción, especialmente pH, se ha desarrollado una tira reactiva con buenas características analíticas para la determinación rápida de la dureza total en aguas.

Cuando esta tira reactiva se pone en contacto con una disolución acuosa conteniendo iones calcio y/o magnesio tiene lugar una reacción heterogénea entre la zona sensora y la disolución:



¹ Tan, S., Hauser, P., Hauser, K., Wang, K., Fluri, K., Seiler, K., Rusterholz, B., Suter, G., Krüttli, M., Spichiger-Keller, U. y Simon, W., *Anal. Chim. Acta.*, 278, 211 (1993).

² K. Suzuki, K. Watanabe, Matsumoto, M. Kobayashi, S. Sato, S. Siswanta y H. Hisamoto. *Anal Chem.* 67, 324, (1995).

Como consecuencia, pasará calcio y/o magnesio desde la disolución a la membrana, en proporción a la razón de concentraciones de ambos alcalinotérreos y protones presentes en disolución. Como hemos visto en la Introducción, la medida de la absorbancia de la forma protonada del cromoionóforo permitirá el cálculo del parámetro analítico, que es el grado de protonación $1-\alpha$. Como en anteriores ocasiones usaremos el grado de protonación en nuestras condiciones de trabajo; esto es, el grado de protonación efectivo $1-\alpha_{ef}$. La actividad en calcio y magnesio en fase acuosa se relaciona con la constante de equilibrio del proceso $K_e^{ML^{2+}_p}$, α_{ef} y la actividad en protones, a_{H^+} según la ecuación siguiente en la que C_L es la concentración analítica de ionóforo, C_C de cromoionóforo y C_R de sal lipofílica:

$$a_{M^{2+}} = \frac{1}{K_e^{ML_p}} \left(\frac{a_{H^+} \alpha_{ef}}{1 - \alpha_{ef}} \right)^2 \frac{C_R - (1 - \alpha_{ef})C_C}{2 \left(C_L - \frac{p}{2} (C_R - (1 - \alpha_{ef})C_C) \right)^p} \quad (7.1)$$

Si la actividad protónica fuese constante, mediante el empleo de una disolución reguladora de pH, se podría estimar la actividad en calcio y magnesio, esto es, en dureza total.

El cálculo del parámetro analítico utilizado, que es el grado de protonación efectivo $1-\alpha_{ef}$, se hace usando la absorbancia del cromoionóforo presente en la tira reactiva tras haber estado en contacto con el problema. Como en casos anteriores el cromoionóforo que usamos es el azul Nilo lipofilizado, lo que significa que realizamos las medidas de absorbancia a la misma longitud de onda de 659 nm. Para calcular la absorbancia normalizada que empleamos como parámetro analítico medimos, además, la absorbancia A_C de la tira reactiva en contacto con una disolución de NaOH 0,01M y, por último, la absorbancia $A_{tampón}$ de la tira reactiva en contacto con la disolución reguladora usada. Con estos valores calculamos el parámetro analítico $1-\alpha_{ef}$ de acuerdo con:

$$1 - \alpha_{ef} = \frac{A - A_C}{A_{\text{tampón}} - A_C} \quad (7.2)$$

Estas medidas se realizan usando el soporte anteriormente descrito en el Capítulo 2 con lo que se mejora la reproducibilidad de las medidas, al medir en una zona con diámetro constante e inferior al de la zona activa del sensor.

2. Optimización de la respuesta de la tira reactiva

Los factores que influyen sobre la respuesta de las tiras reactivas que estamos desarrollando en esta Tesis Doctoral hemos visto que se pueden clasificar en dos grupos: A) Los parámetros relacionados con el diseño y composición cualitativa y cuantitativa de la membrana sensora. Entre ellos encontramos los componentes del cóctel usado para la preparación de la membrana y sus proporciones, el volumen de cóctel usado para hacer la membrana y demás condiciones. B) Los parámetros relacionados con el proceso de equilibración de la muestra conteniendo el analito con la tira reactiva; así pH, tiempo de contacto y actividad en calcio y magnesio.

A continuación, resumiremos los experimentos realizados para establecer las influencia de los citados factores y los valores de los mismos que originan la mejor respuesta.

2.1. Composición y preparación de la membrana

Para el establecimiento de la composición más adecuada de la membrana sensora se han seguido dos estrategias diferentes aunque complementarias. En primer lugar, ajustar las proporciones óptimas de ionóforo, anión lipofílico y cromoionóforo que originen mejor respuesta e idéntica selectividad de la membrana para calcio y magnesio y, a la vez, la mayor selectividad frente a iones interferentes, que en este caso son los iones alcalinos. A

continuación, y una vez fijadas las proporciones de esos componentes, se estudiará la cantidad de polímero formador de membrana, el PVC, y el tipo y cantidad de plastificante, mediante un estudio de la cinética del proceso de intercambio iónico entre disolución y membrana.

2.1.1. Selección de los reactivos

Para el desarrollo de esta tira reactiva de tipo óptico para la determinación de dureza basada en dos componentes, es necesario seleccionar un conjunto de reactivos que permitan que se dé la reacción de intercambio iónico entre el calcio y magnesio presente en la disolución y los protones situados en la membrana.

Estos reactivos necesarios, tal como quedó dicho en la Introducción de esta Memoria, son: 1) ionóforo selectivo para calcio y magnesio; 2) ionóforo selectivo para protones o cromoionóforo; 3) sal de anión lipofílico que permita mantener cargas en la membrana lipofílica y posibilitar el intercambio iónico; 4) polímero formador de membrana y 5) plastificante o disolvente de membrana.

Con todos estos reactivos es necesario preparar una membrana que se fijará sobre un soporte inerte y ópticamente transparente, sobre el cual se realizará la medida de absorción de radiación por transmisión. Como soporte para la preparación de la membrana sensora se ha usado una lámina de 0,25 mm de politereftalato de etileno (Mylar) que es transparente, inerte y estable en las condiciones de trabajo usadas. Para la formar la membrana sensora se ha optado por preparar una disolución de todos los componentes en un disolvente adecuado, como es el tetrahidrofurano, y depositar un volumen de ese cóctel sobre el soporte mediante el sistema centrífugo comentado en el Capítulo 2, permitiendo que una evaporación lenta del disolvente origine la membrana sensora.

Como ionóforo se ha seleccionado, tras diversas pruebas, un éter azacorona bipodal, en concreto el 4,13-[bis(N-adamantilcarbamoil)acetil]-1,7,10,16-tetraoxa-4,13,-diazacicloocta decano. Se trata de un derivado diazacorona con un anillo de 18 miembros y con dos brazos laterales simétricos de tipo malonamida sustituidos ambos con grupos

adamantilo finales. Este diazacorona bipodal, conocido bajo las siglas K22B5, fue diseñado por K. Suzuki y colaboradores en 1995 como un ionóforo muy efectivo para magnesio en electrodos selectivos de iones³.

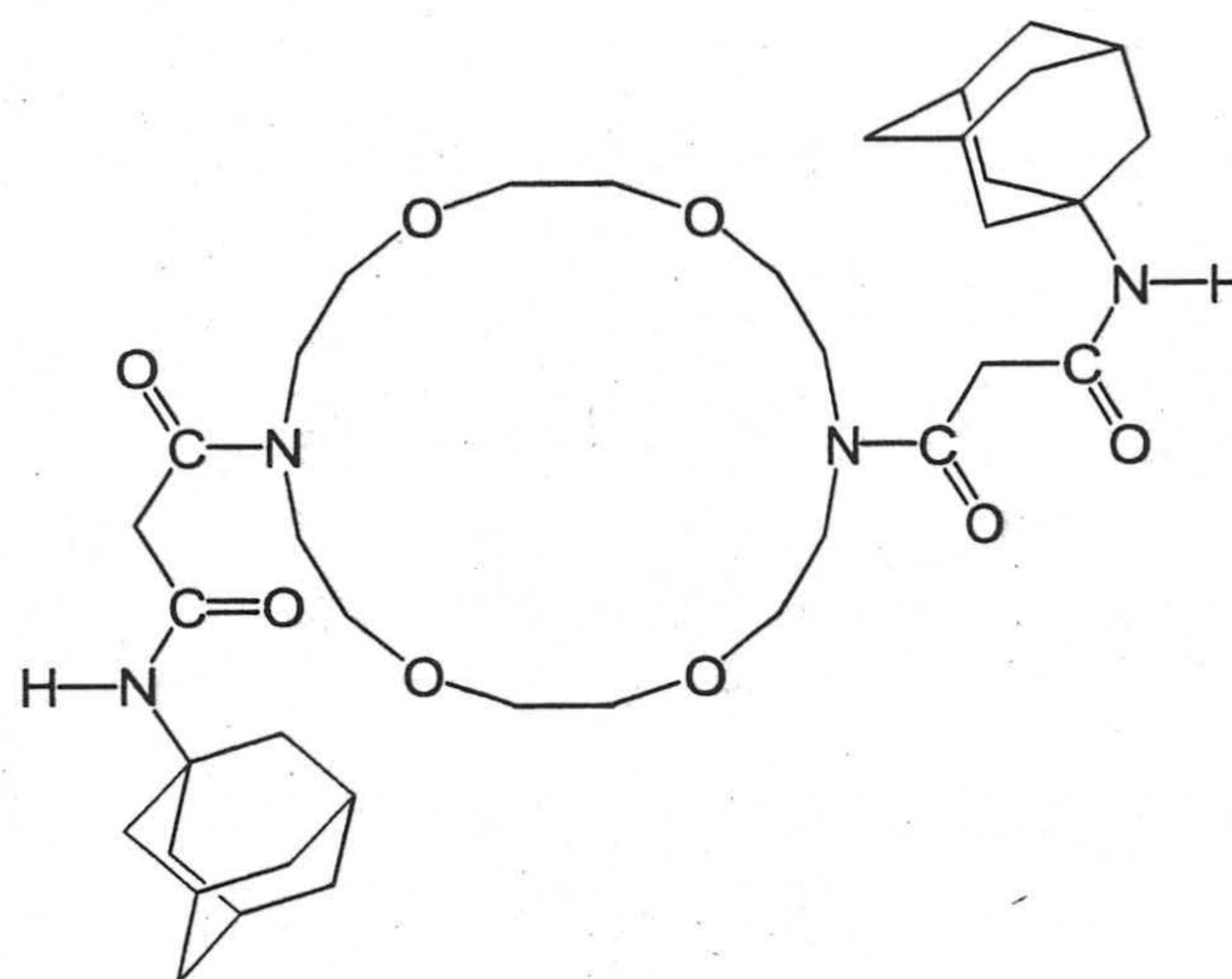


Figura 7.1. Estructura del ionóforo K22B5

Se ha descrito en bibliografía que la presencia de los voluminosos grupos adamantilo en los brazos laterales de derivados del diazacorona, incrementa de forma muy considerable la selectividad de tales ionóforos para calcio y magnesio. Así se ha observado para el K23E1 (4,16-di-N-octadecilcarbamoil-3-oxabutilil-1,7,10,13,1-9-pentaoxa-4,16-diazacicloenicosano) para Ca(II) y con el K22B5 para magnesio². El éter azacorona bipodal K22B5 utilizado en electrodos de membrana de PVC muestra una alta selectividad para magnesio frente a calcio y cationes monovalentes –de hecho, es el ionóforo descrito como más selectivo para magnesio– cuando se emplea un adecuado plastificante (NPOE) y la necesaria concentración de posiciones aniónicas en membrana, dadas por un borato orgánico alcalino^{2,4}.

³ Suzuki, K., Watanabe, K., Matsumoto, Y., Kobayashi, M., Sato, S., Siswanta, D. y Hisamoto, H., *Anal. Chem.*, 67, 324 (1995).

⁴ Zhang, W., Jenny, L. y Spichiger-Keller, U., *Anal. Sci.*, 16, 11 (2000).

En esta ocasión, lo que pretendemos es lo contrario de lo habitual, pues no se trata de conseguir una respuesta selectiva para un ión dado, sino que la respuesta sea idéntica para dos y muy selectiva frente al resto. De esta manera, obtendremos respuesta a un parámetro no específico, sino genérico como es la dureza de un agua. Por otra parte, debe señalarse que los datos de selectividad provenientes de estudios con electrodos selectivos de iones, esto es, de sensores eléctricos, no son directamente extrapolables a sensores ópticos y menos aún, cuando dichos sensores ópticos utilizan un segundo componente, pues se fundamentan en el concurso de dos reacciones, complejación con ionóforo y desplazamiento de un indicador ácido-base que ocurren en una membrana plastificada, mientras que los electrodos selectivos de membrana solo usan la reacción de complejación con el ionóforo. La extensión de la reacción como conjunto es distinta en ambos casos debido al diferente balance de energía libre.

Como cromoionóforo se ha elegido el azul Nilo lipofilizado pues en pruebas preliminares se ha mostrado como adecuado para este caso. Dio buen resultado el empleo de tetrakis(7-clorofenil)borato potásico (TCFB), mientras que otros tetrafenilboratos alcalinos ensayados como sal lipofílica, así el tetrakis(3,5-bis(trifluorometil)fenil)borato sódico no originó prácticamente respuesta. El polímero formador de membrana utilizado es el cloruro de polivinilo y el plastificante se seleccionó de entre los grupos habituales (éteres, ésteres de ácidos carboxílicos y ésteres del ácido fosfórico).

En concreto, se probaron TBP, TEHP, DOS, DOP y NPOE. Para ello, se prepararon tiras reactivas que contenían 25,00 mg de PVC, 63,00 mg del plastificante correspondiente, 0,71 mg de la sal lipofílica tetrakis(7-clorofenil)borato potásico (TCFB), 0,85 mg de azul Nilo lipofilizado y 0,50 mg del ionóforo K22B5, todo ello disuelto en 1,0 ml de THF. Con 20 μ l de cada cóctel se prepararon tantas membranas como plastificantes se ensayaron, según se indica en la Introducción. A continuación, se introdujo cada membrana en un tubo de plástico conteniendo 10 ml de disolución 0,01 M equimolar de Ca(II) y Mg(II), a pH 9,0 ajustado con tampón Tris 0,2 M.

Se observó que la sensibilidad hacia los iones alcalinotérreos de las diferentes tiras reactivas preparadas usando cada uno de los mencionados plastificantes se incrementa según

la secuencia: fosfatos > éteres > esteres carboxílicos, es decir TBP>>TEHP>>NPOE>DOS>DOP.

Por otra parte, se registró la velocidad de reacción de cada una de estas membranas frente a calcio y magnesio. Para ello se sitúa, como se explica en el Capítulo 2, una tira reactiva preparada con cada uno de los plastificantes en estudio, en un lateral perpendicular al eje óptico de una cubeta de 10 mm de paso de luz de un espectrofotómetro, tras lo cual se inyecta una disolución de Ca(II) 0,1M, en un caso y de Mg(II) 0,1 M, en otro, ambas a pH 9,0 registrando la cinética correspondiente a 659 nm. La Figura 7.2 muestra dicha cinética para el caso de la reacción con calcio, observando que el comportamiento es muy diferente según el plastificante. El magnesio se comporta de manera similar. La velocidad de la reacción de intercambio sigue la secuencia TBP>>TEHP>NPOE>DOS≈DOP. Secuencia que es parecida a la anteriormente comentada. Como en cualquier caso tributilfosfato es quien origina menor respuesta frente a alcalinos y mayor velocidad de reacción, es este el plastificante elegido.

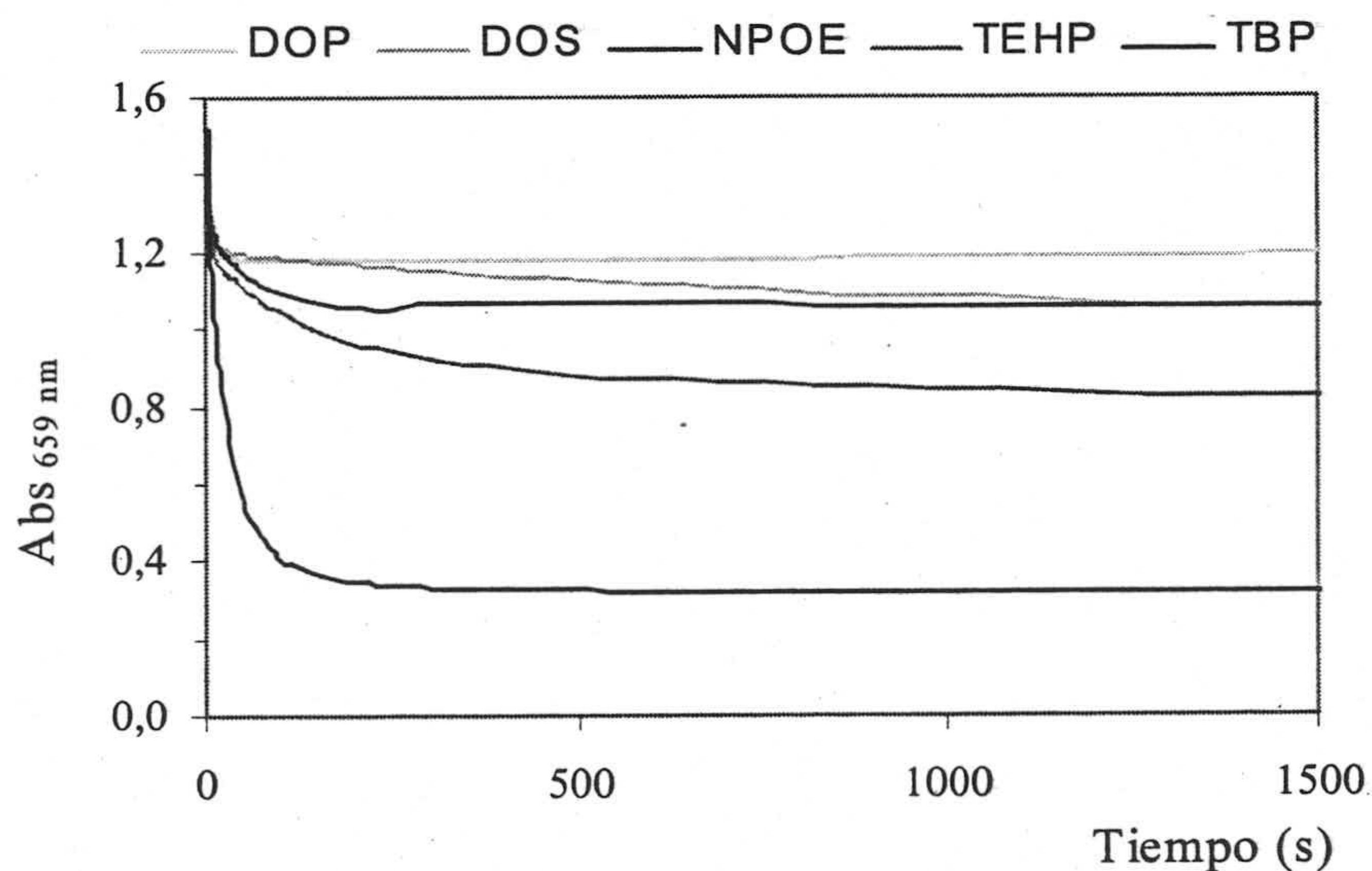


Figura 7.2. Influencia del tipo de plastificante sobre la velocidad de respuesta frente a calcio.

2.1.2. Estudio de la proporción óptima anión lipofílico/ionóforo

Como se indicó en la Introducción, la proporción de sal lipofílica presente y, especialmente, su relación con el ionóforo usado, tiene una gran importancia para lograr una adecuada selectividad frente a iones potencialmente interferentes. Sin embargo, en nuestro caso no solo pretendemos conseguir una buena selectividad frente a iones con los que potencialmente puede reaccionar el ionóforo, los alcalinos litio, sodio y potasio; sino también conseguir una igual selectividad para calcio y magnesio. De esta forma, es posible controlar la concentración de los dos cationes intercambiables y el ionóforo libre asequibles para complejación en la interfase membrana- disolución⁵.

Como medida de la selectividad usaremos el coeficiente de selectividad K_{ij}^{opt} para el caso de que junto con los iones primarios Ca^{2+} o Mg^{2+} coexista un ión interferente J^{z+} . Coeficiente que se calcula mediante el método de la disoluciones separadas, tal como allí quedó dicho. Vendrá dado por el cociente entre las actividades de los iones principal e interferente para un valor de $1-\alpha_{ef} = 0,5$ y se calculará como se indica a continuación.

Para determinar el coeficiente de selectividad y la influencia de la relación sal lipofílica/ionóforo, se prepararon un conjunto de membranas de un solo uso, en las que se varió dicho cociente. Se estudiaron siete relaciones distintas: 50%, 100%, 150%, 200%, 230%, 260% y 300%. De cada proporción se prepararon tres membranas distintas.

La cantidad del cromoióforo se mantuvo constante mientras que se varió la proporción molar del anión lipofílico con respecto al ionóforo. La cantidad de cromoióforo utilizada fue, como en anteriores ocasiones, la necesaria para minimizar el error fotométrico de las medidas de absorbancia.

Se prepararon series de disoluciones de calcio, magnesio, sodio y potasio con seis niveles de concentración diferentes cada serie: $5 \cdot 10^{-4}$, $1 \cdot 10^{-3}$, $1 \cdot 10^{-3}$, $1 \cdot 10^{-2}$, $5 \cdot 10^{-2}$, $1 \cdot 10^{-1}$ M y

⁵ Zhang, W., Jenny, L. y Spichiger-Keller, Anal. Sci., 16, 11 (2000).

con el valor de pH ajustado a 9,0 con una disolución reguladora de Tris 0,2 M. Se analizó cada serie con una membrana y se efectuaron tres réplicas por serie. Cada membrana se introdujo durante cinco minutos para asegurar la consecución del equilibrio y, a continuación, se midió la absorbancia y se establecieron las funciones $1-\alpha_{ef}$ vs $\log a_{M^+}$, de las que se muestra un ejemplo en la Figura 7.3, lo que permitió calcular los coeficientes de selectividad para cada caso.

El coeficiente selectividad está directamente relacionado con $1-\alpha$ y gráficamente se corresponde a la distancia que separa la función de calibrado del analito y la del interferente, sin embargo aquí se han determinado los coeficientes de selectividad usando la ecuación 7.3.

Para ello fue necesario estudiar por separado el comportamiento y respuesta para cada uno de los iones para luego extraer de esos datos experimentales los parámetros de la ecuación 7.3 tales como estequiometrias p y q , K_e , etc.

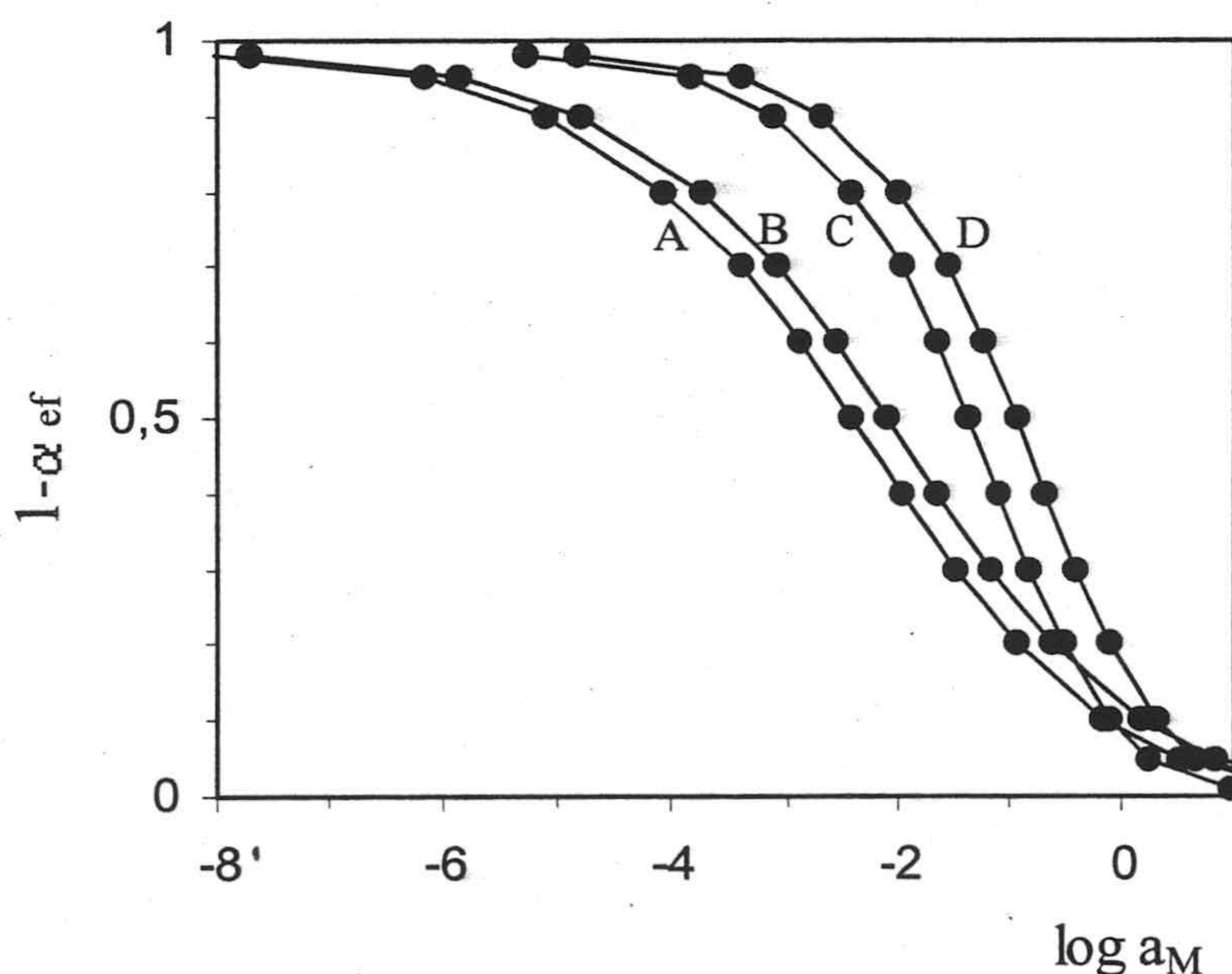


Figura 7.3. Funciones respuesta para la relación 200 % de anión lipofílico a ionóforo. A: Mg(II); B: Ca(II); C: Na y D: K.

$$k_{IJ}^{\text{opt}} = \frac{v K_e^{JLq}}{z K_e^{ILp}} \left(\frac{a_{H^+} \alpha}{1 - \alpha} \right)^{z-v} \frac{\left(C_L - \frac{q}{v} C_R - (1 - \alpha) C_C \right)^q}{\left(C_L - \frac{p}{z} C_R - (1 - \alpha) C_C \right)^p} \quad (7.3)$$

En la Tabla 7.1 se recogen los valores de coeficiente calculados para cada relación anión lipofílico a ionóforo ensayada, los cuales se representan en la Figura 7.4.

Tabla 7.1. Valores de los coeficientes de selectividad en función de la relación molar anión lipofílico/ionóforo

R%	$-\log K_{Mg,Ca}$	$-\log K_{Mg,Na}$	$-\log K_{Mg,K}$
100	-0,018	-0,465	-0,675
150	0,226	-0,076	-1,104
200	0,065	0,646	1,190
230	0,946	-0,396	0,787
260	1,144	-0,422	-0,694
300	0,714	-0,793	-1,160

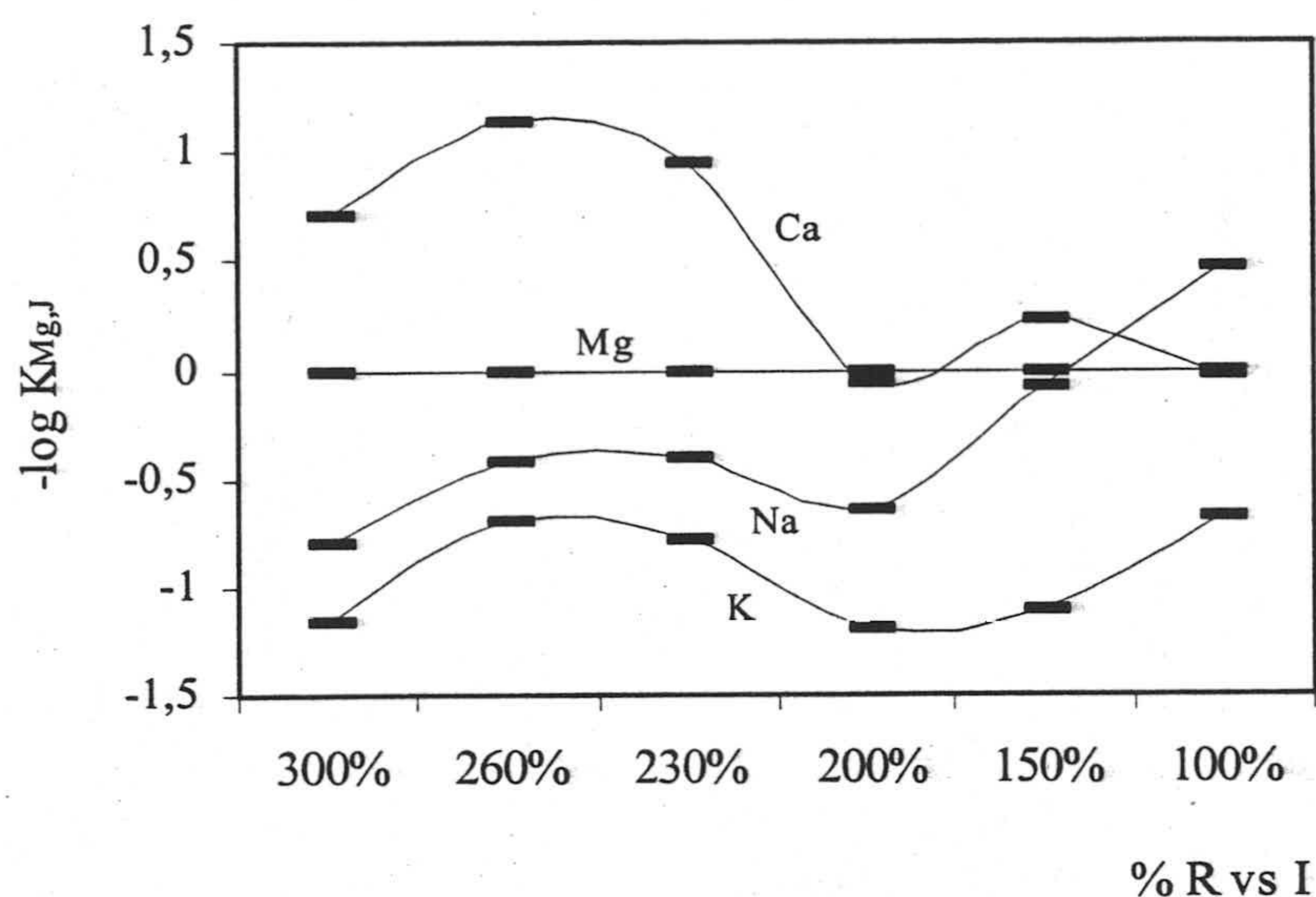


Figura 7.4. Influencia de la relación anión lipofílico / ionóforo sobre la selectividad.

Si observamos la Figura anterior, se consiguen valores de $K_{Mg,J}$ muy similares para iones alcalinotérreos y una alta discriminación para alcalinos para un contenido de un 200% de TCFB frente a ionóforo. Estos resultados difieren de los previamente publicados para electrodos selectivos de iones potenciométricos utilizando el mismo ionóforo y NPOE como plastificante. Estos autores encuentran que la respuesta más similar, aunque no igual, esto es un coeficiente de selectividad más parecido, se observa para un cociente anión lipofílico/ionóforo menor, en concreto de un 85% para Suzuki y col.⁶ y de un 60% para Zhang y col.⁷, respectivamente

La mejor selectividad para iones alcalinotérreos se observó cuando el contenido de aditivo aniónico en la membrana era de un 200% frente al de ionóforo. Se estudiaron

⁶ K. Suzuki, K. Watanabe, Y. Matsumoto, M. Kobayashi, S. Sato, D. Siswanta, y H. Hisamoto, *Anal. Chem.*, 67, 324, (1995).

⁷ W. Zhang, L. Jenny and U. Spichiger, *Anal. Sci.*, 16, 11, (2000).

relaciones a partir de un 25%, sin embargo, no fue posible utilizar relaciones inferiores al 100%, pues la membrana no cambia de color o bien el cambio es muy lento, incluso en presencia de ácidos o bases fuertes.

2.1.3. Influencia del porcentaje de plastificante

La experiencia de selección inicial nos indicó que el plastificante idóneo para el desarrollo de una tira reactiva para calcio y magnesio era el tributilfosfato. El estudio de la proporción óptima de este plastificante se llevó a cabo observando como se modifican tanto las propiedades físicas de la membrana, como la cinética de la reacción heterogénea de intercambio iónico, al objeto de elegir la proporción que origina la respuesta más rápida.

Se prepararon cuatro cócteles con porcentajes de TBP que se modifican desde un 50% a un 80%, con respecto a los demás componentes. Estos cócteles se prepararon con 25,00 mg de PVC, 0,71 mg de sal lipofílica TCFB, 0,85 mg de cromoionóforo azul Nilo lipofilizado, 0,50 mg de ionóforo K22B5 y la cantidad adecuada de TBP en 1,0 ml de THF. Una vez preparadas las membranas de la manera habitual, se pusieron en contacto con una disolución conteniendo $0,1 \text{ mol l}^{-1}$ de calcio y $0,1 \text{ mol l}^{-1}$ magnesio a pH 9,0 con tampón Tris 0,2 M (Figura 7.5). Se observa que en los sensores que contienen un porcentaje de TBP inferior o igual al 50%, la zona activa no se adhiere al soporte plástico o bien la señal es inestable o muestra mucho ruido. Para porcentajes iguales o superiores al 70%, las propiedades físicas de la membrana empeoran, pues estas son menos homogéneas, de poco espesor y aumenta el tiempo de secado durante la preparación.

En la Figura 7.5 se muestran los resultados obtenidos donde se observa que el tiempo de respuesta disminuye al aumentar el porcentaje de TBP y en la Tabla 7.2 se señalan los tiempos de respuesta medidos.

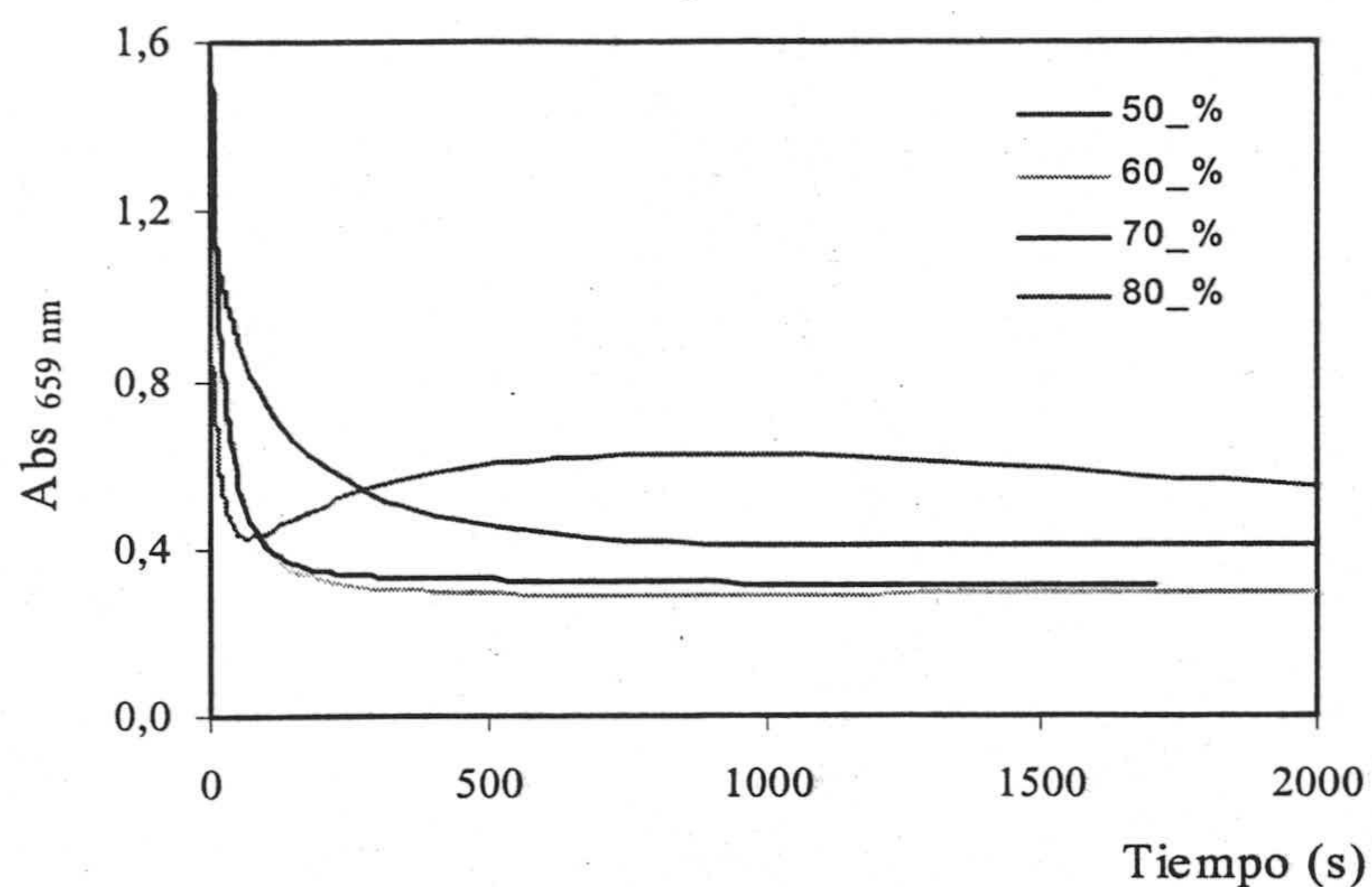


Figura 7.5. Influencia del porcentaje de plastificante TBP sobre la velocidad de respuesta. a: 50 %; b: 60 %; c: 70%; d: 80

Tabla 7.2. Tiempo de equilibrio en función del porcentaje de TBP en la membrana.

% TBP	Tiempo, min.
50	10
60	3,5
70	3,5
80	>10

El tiempo de respuesta para alcanzar el equilibrio fue de 10 minutos para un 50%, de 3,5 minutos para un 60% y 70% y más de 10 minutos para un 80%. La velocidad se incrementa con la cantidad de TBP así como las propiedades físicas hasta un porcentaje del 70%. Con cantidades mayores que estas, tanto la velocidad como las características de la membrana empeoran debido a que la membrana es menos homogénea y aumenta el tiempo de secado. Se seleccionó un 60% como porcentaje óptimo para los experimentos siguientes.

Es de resaltar el comportamiento de la membrana cuando existe un exceso de plastificante, ya que en un principio parece reaccionar a mayor velocidad, sin embargo transcurridos unos segundos la membrana invierte su tendencia y la absorbancia comienza a subir lentamente para estabilizarse de nuevo.

Por otra parte, los tiempos de respuesta obtenidos coinciden razonablemente con los esperados teóricamente para la difusión de calcio dentro de una membrana de PVC plastificada de 5,6 μm de espesor^{8,9,10}

Una vez establecidos la proporción de plastificante y los constituyentes minoritarios de la membrana, queda fijado el porcentaje de PVC en un 27,8 % en peso.

2.1.4. Influencia del volumen de tetrahidrofurano

Para establecerla se prepararon cuatro cócteles con cantidades fijas de todos los componentes de la membrana, aunque disueltos en cantidades diferentes de disolvente, desde 0,5 a 2,0 ml. Una vez preparadas se realiza un estudio cinético como el anteriormente comentado

En el caso de usar 0,5 ml de THF la señal analítica no es estable, mientras que con 2,0 ml las señales son bajas, por lo que se descartan ambas. Con 1,5 ml las señales son mayores, pero el tiempo de respuesta es alto, 3,2 minutos. Con 1,0 ml la señal es mayor que en el caso anterior y el tiempo de respuesta es de 2 minutos. Por lo tanto, se eligió como volumen óptimo 1,0 ml de THF.

⁸ E. Bakker, P. Bühlmann y E. Pretsch, *Chem. Rev.*, 97, 3083, (1997).

⁹ K. Seiler, W.E. Morf, B. Rusterholz and W. Simon, *Anal. Sci.*, 5, 557, (1989).

¹⁰ M. Lerchi, F. Orsini, Z. Cimerman, E. Pretsch, D.A. Chowdhuey y F. Kamata, *Anal. Chem.*, 68, 3210, (1996).

2.1.5. Influencia del volumen de cóctel.

Se realizó un estudio de la influencia de la cantidad de cóctel que se utiliza para preparar la zona sensora de la tira reactiva. Al igual que se realizó en capítulos anteriores se prepararon diversas membranas usando volúmenes que varían entre 10 y 25 μl . Los volúmenes entre 10 y 25 μl son los que conducen a valores de absorbancia mayores y similares, aunque cuanto mayor es el volumen, mayor es el tamaño de gota y estas presentan mayor homogeneidad. Se selecciona un volumen de 20 μl pues necesita menos cóctel y da buena respuesta. Volúmenes superiores a 25 μl desbordan el ancho del soporte plástico e inferiores a 10 μl originan una zona sensora de diámetro inferior al haz de radiación del espectrofotómetro.

2.1.6. Influencia de la velocidad de rotación.

Al igual que el volumen utilizado, la velocidad de rotación afecta al diámetro de la zona activa pero afecta de modo diferente al espesor, ya que para un mismo volumen de cóctel, un aumento en las revoluciones conlleva un aumento en la fuerza centrífuga que hace aumentar el diámetro de la zona activa y disminuir el espesor de la misma.¹¹ Esta variable afecta a la señal analítica y a la homogeneidad de la zona activa, la cual es básica para obtener una reproducibilidad aceptable. Se demostró que era adecuada una velocidad de giro de 170 r.p.m.

2.1.7. Sistema usado para la evaporación del disolvente.

Como se ha señalado en capítulos anteriores, la forma en que se lleva a cabo la evaporación del disolvente tiene una gran influencia en la homogeneidad de la zona activa. Se ha comprobado que la evaporación lenta en una atmósfera saturada en vapores del disolvente es la que origina membrana con mayor reproducibilidad. En concreto, se observó que los mejores resultados se obtuvieron dejando evaporar el disolvente durante 30 segundos

¹¹ Seiler, K. y Simon W., Anal. Chim. Acta, 266, 73 (1992).

mientras que el plato giratorio se encontraba rotando, transcurrido este tiempo se colocó la membrana en una atmósfera saturada de THF a temperatura ambiente para conseguir una adecuada velocidad de evaporación.

2.1.8. Preparación de la membrana.

Como consecuencia del estudio anterior se propone la siguiente receta operatoria para la preparación de tiras reactivas para dureza. El cóctel se obtiene pesando 25,00 mg (27,8 % p/p) de PVC, 63,00 mg (70,0 % p/p) de tributilfosfato, 0,50 mg (0,56 % p/p) de 4,13-[bis(N-adamantilcarbamoil)acetil]-1,7,10,16-tetraoxa-4,13,-diazaciclooctadecano, 0,85 mg (0,94 % p/p) de azul de Nilo lipofilizado y 0,71 mg (0,79 % p/p) de tetrakis(7-clorofenil)borato potásico en un vial de vidrio y disolviéndolos en 1,0 ml de tetrahidrofurano. Se depositan 20 μ l de ese cóctel sobre una lámina de poliéster de 14 mm \times 40 mm \times 0,25 mm de espesor con ayuda de un sistema centrífugo. Tras dejar la membrana a vacío, a temperatura ambiente, durante 3 minutos, para permitir una lenta evaporación del disolvente, se obtiene una película circular sólida, homogénea, adherida al soporte sólido, transparente y de color rojo.

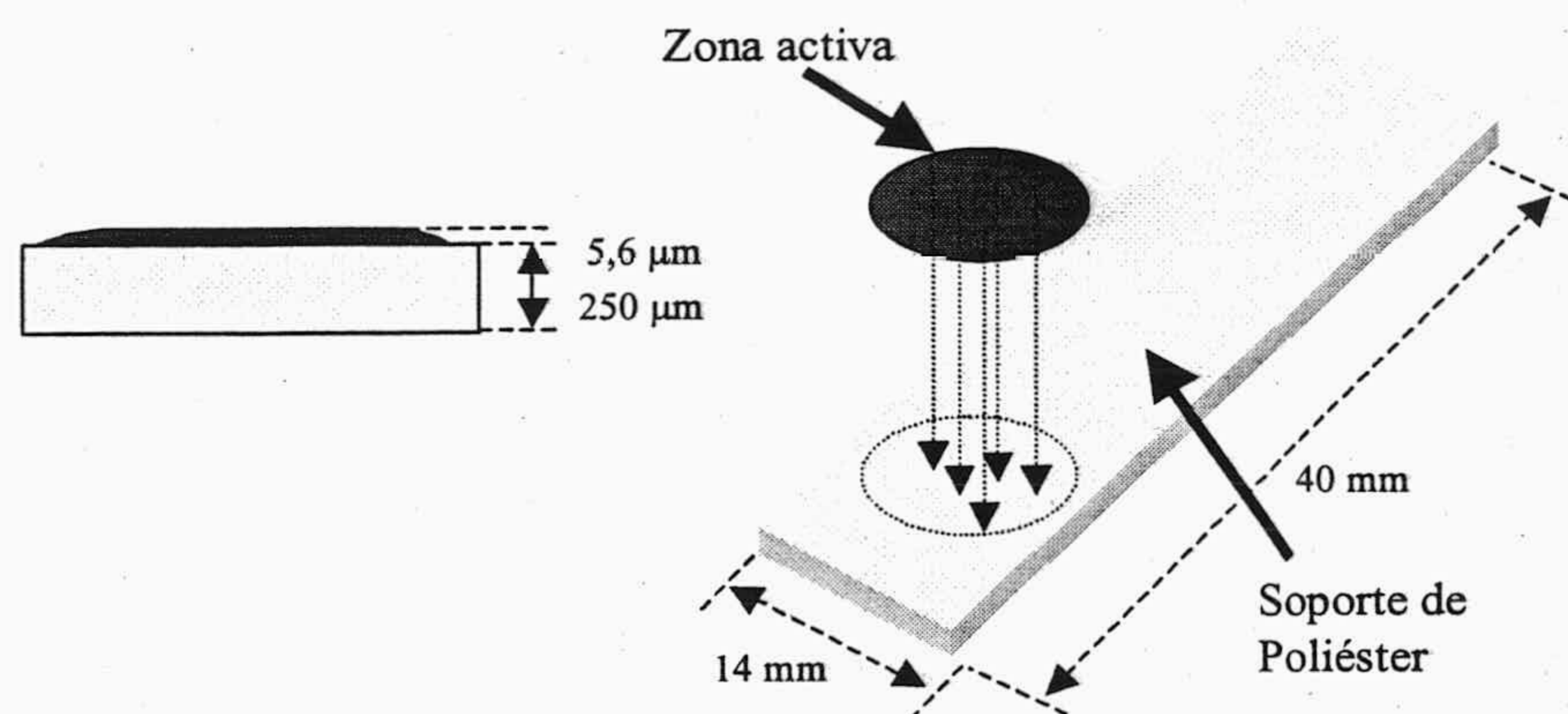


Figura 7.6. Dimensiones y características de la membrana.

Las dimensiones de la zona sensora son de 6 mm de diámetro y 5,6 μ m de espesor. La concentración de ionóforo, cromoionóforo y anión lipofílico en el sensor una vez preparada

son 7,93, 16,16, y 15,89 mmol kg⁻¹, respectivamente. Las características físicas y dimensiones finales del sensor utilizando los componentes seleccionados son las indicadas en la Figura 7.6.

2.2. Parámetros relacionados con el proceso de equilibración

Los parámetros relacionados con el proceso de equilibración entre la muestra conteniendo los analitos y la tira reactiva que se han estudiado son pH, tiempo de contacto y actividad en calcio y magnesio.

2.2.1. Influencia del pH.

Como ya se ha señalado, el valor del parámetro analítico que estamos usando $1-\alpha_{ef}$, depende del cociente de actividades entre calcio y/o magnesio y protones y tiene influencia sobre diversos aspectos relacionados con estos sensores, entre ellos, con la forma de la curva respuesta y con la sensibilidad.

Por ello, para seleccionar el pH de trabajo se ha realizado un estudio de la forma de la curva respuesta que origina la membrana reactiva preparada según queda dicho más arriba, para diferentes valores de pH.

Se prepararon diferentes membranas en la forma usual a partir de un cóctel que contiene 25,00 mg de PVC, 63,00 mg de TBP, 0,50 mg de K22B5, 0,85 mg de azul de Nilo lipofilizado y 0,71 mg TCFB en 1,0 ml de THF, una vez preparadas las membranas se dispusieron en matraces de 50 ml series de $5 \cdot 10^{-4}$, $1 \cdot 10^{-3}$, $1 \cdot 10^{-2}$, $5 \cdot 10^{-2}$ y $1 \cdot 10^{-1}$ M en concentración, una serie por cada catión medido, a saber Ca(II), Mg(II), Na y K, a continuación el pH fue ajustado utilizando 5 ml de una disolución del tampón adecuado. Los valores de pH estudiados se encontraban entre 5,8 y 9,5 utilizándose para ello tampón dihidrógenofosfato/monohidrógenofosfato 0,2 M para pH de 5,8 a 6,8, Tris 0,2 M para pH comprendidos entre 7 y 9 y también dietanolamónio/dietanolamina 0,2 M para pH entre 7,8 y 8,9.

En la Figura 7.7 se muestran los resultados obtenidos, una vez ajustada la función teórica que mejor se ajusta a los puntos experimentales. Es de destacar que la membrana sensora comienza a responder a partir de valores de pH próximos a 7,0. Si aumentamos el pH de la disolución, se va obteniendo mayor respuesta tanto al analito como a posibles interferentes, como se observa en la figura, pues las curvas que presentan mayor respuesta están ligeramente desplazadas hacia la izquierda. Cuanto más a la izquierda se encuentre la curva mayor será el coeficiente de selectividad y mayor la respuesta al analito, esto es mayor sensibilidad, como en el caso de las curvas obtenidas para pH entre 9,0 y 9,5.

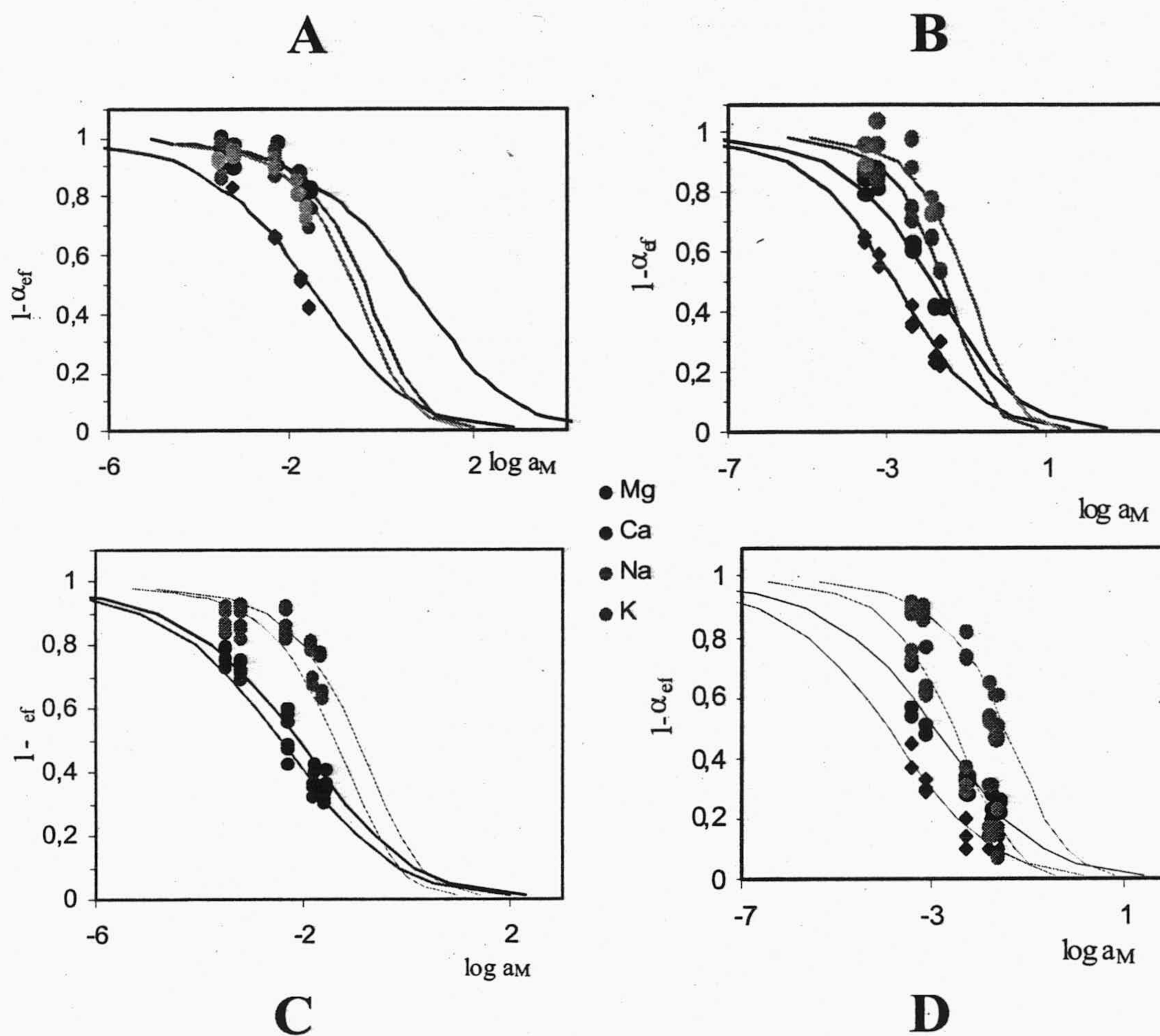


Figura 7.7 Influencia del pH sobre la forma de la curva respuesta. A: pH 8,0; B: pH 8,5; C: pH 9,0; D: pH 9,5

Por otra parte, se estudió como influye el pH sobre la selectividad de la reacción, atendiendo especialmente a que la respuesta tanto de calcio como de magnesio fuera igual. Se hizo la experiencia registrando la respuesta por separado para cada ión, tanto analitos como interferentes, para cada uno de los pH de trabajo seleccionados, a continuación se calcularon todos los parámetros necesarios para mediante la ecuación 7.3 calcular los distintos coeficientes de selectividad. En la Tabla 7.3 se recogen los valores de constante de selectividad calculados.

Tabla 7.3. Valores de coeficientes de selectividad para diferentes pH.

pH	$-\log K_{Mg,Ca}$	$-\log K_{Mg,Na}$	$-\log K_{Mg,K}$
8,0	2,186	0,997	1,230
8,5	0,927	-0,293	-0,854
9,0	-0,077	-1,117	-1,545
9,5	1,001	-0,372	-1,447

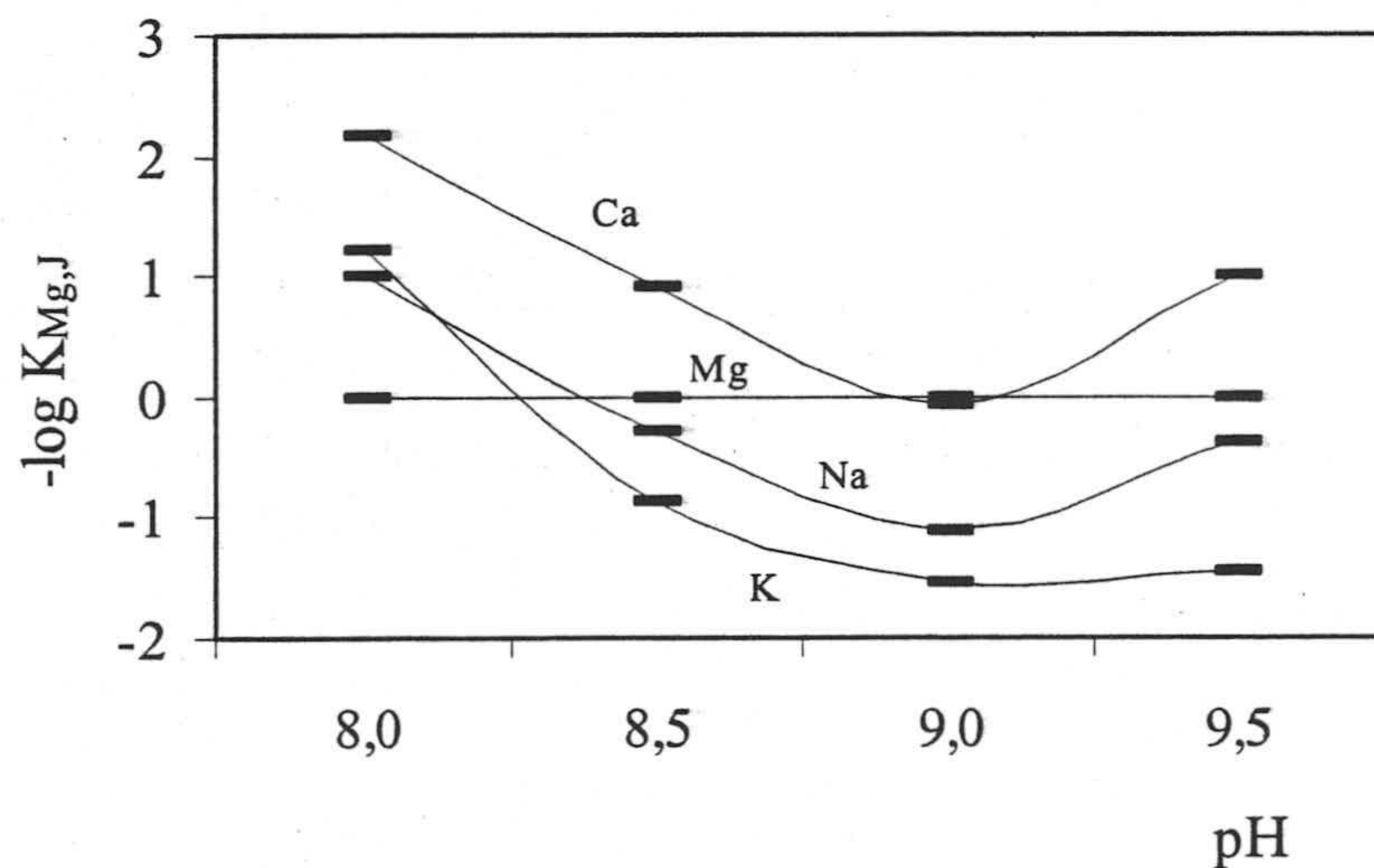


Figura 7.8. Influencia del pH sobre selectividad

Como vemos la selectividad hacia iones divalentes mejora con un incremento del valor del pH y el nivel de respuesta para Ca(II) y Mg (II) se hacen similares a pH 9, es por ello por lo que se selecciona ese pH.

2.2.2. Selección de la disolución amortiguadora.

Para elegir una disolución reguladora de pH 9,0 más adecuada para la determinación de calcio y/o magnesio se ensayaron tres tampones diferentes. Estos fueron: 1) ácido bórico/borato 0,2 M; 2) dietanolamónio/dietanolamina 0,2 M y 3) Tris 0,2 M. Con los tres tampones se obtiene una buena respuesta a pH 9 pero se diferencian en una serie de características. En el caso del ácido bórico se produce interferencia en la señal debido al ión Na^+ presente, pues el borato presente está como borato sódico. El tampón dietanolamónio/dietanolamina presenta poca estabilidad y, por último, el tampón Tris no origina interferencia y es estable. Por lo tanto, se elige como adecuado para llevar a cabo esta determinación. Para optimizar la concentración del tampón elegido, se ensayan concentraciones 0,1, 0,2 y 0,3 M. La concentración 0,1 M no muestra suficiente capacidad amortiguadora para todas las concentraciones ensayadas y para 0,3 M se observan interferencias en la señal; es decir, se observa un aumento del ruido en las medidas de absorbancia. Sin embargo, para una concentración 0,2 M hay buena capacidad amortiguadora y no hay interferencias, siendo, por tanto, seleccionada.

2.2.3. Influencia de la actividad de Ca(II) y Mg(II). Verificación del modelo.

Para establecer la influencia de la actividad de calcio y magnesio sobre la respuesta de la tira reactiva se preparan membranas que presentan la composición antes señalada. Dichas membranas se ponen en contacto con disoluciones de pH 9,0 ajustado con tampón Tris 0,2 M, de actividades que van desde $1,60 \cdot 10^{-1}$ M y $8,25 \cdot 10^{-8}$ M (1 M y 10^{-7} M en concentraciones) para Mg (II) y $1,36 \cdot 10^{-1}$ M y $8,23 \cdot 10^{-8}$ M (1 M y 10^{-7} M en concentraciones)

para Ca (II). En la Tabla 7.4 se muestran los valores de $1-\alpha_{ef}$ obtenidos y en la Figura 7.9 se representan dichos resultados.

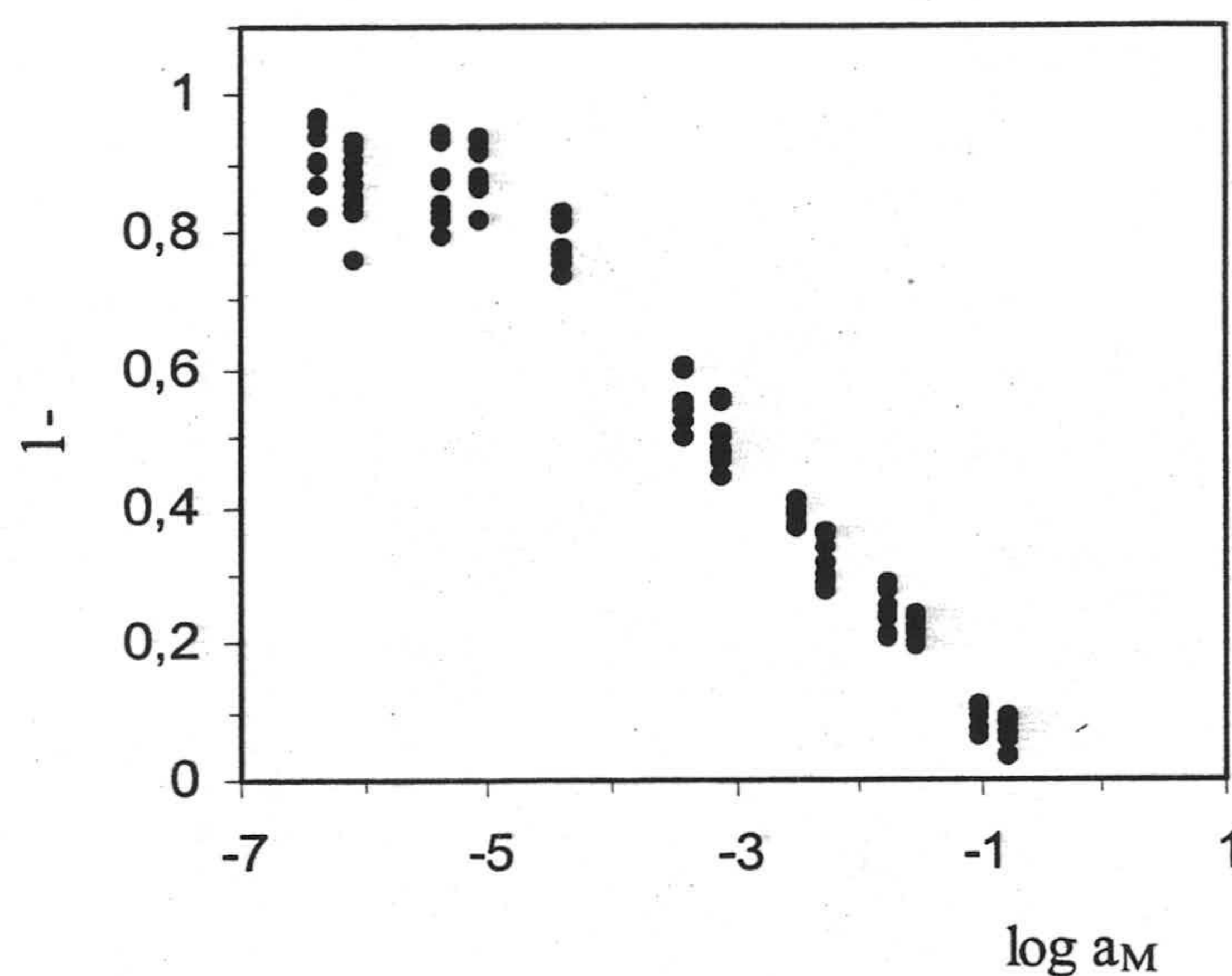


Figura 7.9. Comportamiento de la tira reactiva en función de la actividad de una disolución equimolar de Ca(II) y Mg(II).

Cada punto en esa figura es el valor medio de los puntos experimentales obtenidos como media de nueve réplicas (tres sensores por tres réplicas por sensor). Se observa en la Figura 7.10 que los puntos experimentales se ajustan a la curva respuesta predicha según el modelo antes comentado y discutido en la Introducción.

Tabla 7.4. Influencia de la actividad en calcio y magnesio. Valores experimentales.

n°	Log a _M	1-α _r	n°	Log a _M	1-α _r	n°	Log a _M	1-α _r	n°	Log a _M	1-α _r
1	-7,0836	0,9944	4	-5,3849	0,9811	8	-3,4084	0,6037	11	-2,2700	0,3669
1	-7,0836	0,8774	4	-5,3849	0,8924	8	-3,4084	0,5946	11	-2,2700	0,3267
1	-7,0836	0,8765	4	-5,3849	0,9293	8	-3,4084	0,5904	11	-2,2700	0,3272
1	-7,0836	0,9569	4	-5,3849	0,9264	8	-3,4084	0,6543	12	-1,7565	0,3241
1	-7,0836	1,0224	5	-5,0842	0,8664	8	-3,4084	0,6505	12	-1,7565	0,2880
1	-7,0836	1,0146	5	-5,0842	0,9688	8	-3,4084	0,5756	12	-1,7565	0,2851
1	-7,0836	0,9313	5	-5,0842	0,9668	8	-3,4084	0,5997	12	-1,7565	0,2935
1	-7,0836	0,9719	5	-5,0842	0,9301	8	-3,4084	0,5960	12	-1,7565	0,3393
1	-7,0836	0,9662	5	-5,0842	0,9861	9	-3,1257	0,5196	12	-1,7565	0,3244
2	-6,3847	0,8727	5	-5,0842	0,9807	9	-3,1257	0,5542	12	-1,7565	0,3017
2	-6,3847	1,0157	5	-5,0842	0,9144	9	-3,1257	0,5512	12	-1,7565	0,2604
2	-6,3847	1,0182	5	-5,0842	0,9262	9	-3,1257	0,5161	12	-1,7565	0,2548
2	-6,3847	0,9473	5	-5,0842	0,9186	9	-3,1257	0,6068	13	-1,5469	0,2468
2	-6,3847	1,0157	6	-5,0842	0,8664	9	-3,1257	0,6026	13	-1,5469	0,2749
2	-6,3847	1,0067	6	-5,0842	0,9688	9	-3,1257	0,4930	13	-1,5469	0,2745
2	-6,3847	0,9210	6	-5,0842	0,9668	9	-3,1257	0,5323	13	-1,5469	0,2636
2	-6,3847	0,9556	6	-5,0842	0,9301	9	-3,1257	0,5272	13	-1,5469	0,2939
2	-6,3847	0,9870	6	-5,0842	0,9861	10	-2,5119	0,3595	13	-1,5469	0,2880
3	-6,0837	0,8116	6	-5,0842	0,9807	10	-2,5119	0,4733	13	-1,5469	0,2537
3	-6,0837	0,8766	6	-5,0842	0,9144	10	-2,5119	0,4773	13	-1,5469	0,2774
3	-6,0837	0,9020	6	-5,0842	0,9262	10	-2,5119	0,4266	13	-1,5469	0,2688
3	-6,0837	0,9210	6	-5,0842	0,9186	10	-2,5119	0,4865	14	-1,0396	0,1224
3	-6,0837	0,9811	7	-4,3874	0,8066	10	-2,5119	0,4904	14	-1,0396	0,2020
3	-6,0837	0,9690	7	-4,3874	0,8656	10	-2,5119	0,3829	14	-1,0396	0,1970
3	-6,0837	0,8932	7	-4,3874	0,8636	10	-2,5119	0,4589	14	-1,0396	0,1393
3	-6,0837	0,9385	7	-4,3874	0,8138	10	-2,5119	0,4561	14	-1,0396	0,1585
3	-6,0837	0,9559	7	-4,3874	0,8767	11	-2,2700	0,3242	14	-1,0396	0,1561
4	-5,3849	0,8426	7	-4,3874	0,8691	11	-2,2700	0,3393	14	-1,0396	0,1139
4	-5,3849	0,8819	7	-4,3874	0,7888	11	-2,2700	0,3510	14	-1,0396	0,1558
4	-5,3849	0,8690	7	-4,3874	0,8270	11	-2,2700	0,3873	14	-1,0396	0,1516
4	-5,3849	0,9326	7	-4,3874	0,8175	11	-2,2700	0,4047			
4	-5,3849	0,9917	8	-3,4084	0,5506	11	-2,2700	0,4109			

Si superponemos sobre la media de las nueve réplicas las distintas curvas teóricas que resultan de tomar como coeficiente estequiométrico p : 1, 2 ó 0,5 obtendremos la Figura 7.10

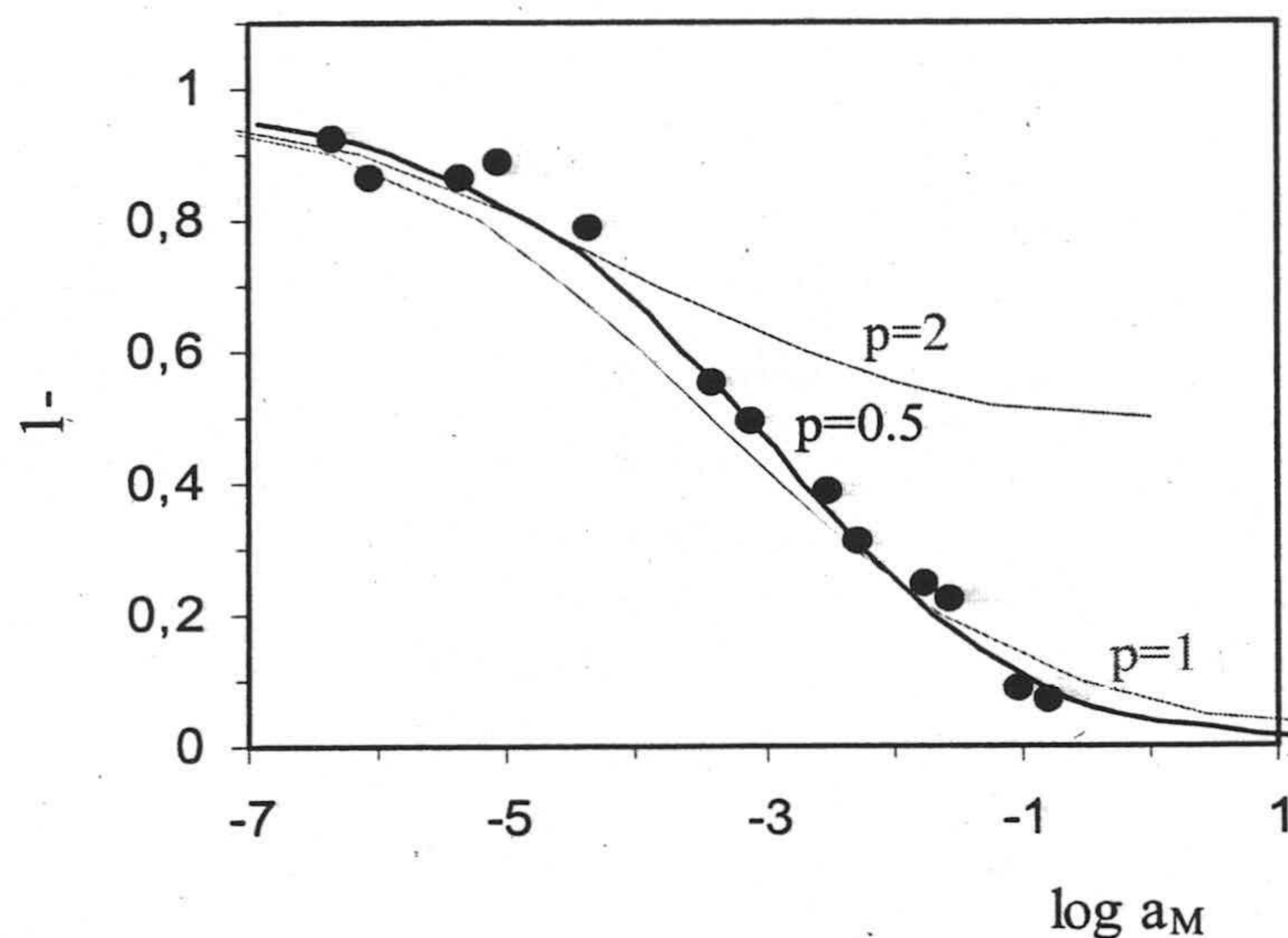


Figura 7.10. Estequiometría de la reacción de intercambio. Curvas teóricas de diferentes estequiometrías superpuestas sobre la media de los datos experimentales ($n=9$)

Como se comentó en la Introducción, la forma de la curva depende de diversos factores, uno de los cuales es la estequiometría de la reacción de intercambio. Para establecer una posible estequiometría se han representado en la Figura 7.10 la curva teórica que resultaría de suponer que el índice estequiométrico p ionóforo:calcio fuera 0,5, 1 y 2. De la observación de la Figura 7.10 se descarta la estequiometría 2. Sin embargo, no es posible discernir entre los índices estequiométricos 0,5 y 1 por simple inspección de la figura anterior.

Para iones de carga superior a 1 esta diferencia en las curvas teóricas en función del valor dado a la estequiometría (p) es sensiblemente menor que en iones monovalentes, pero no obstante se puede apreciar y elegir el valor adecuado¹²

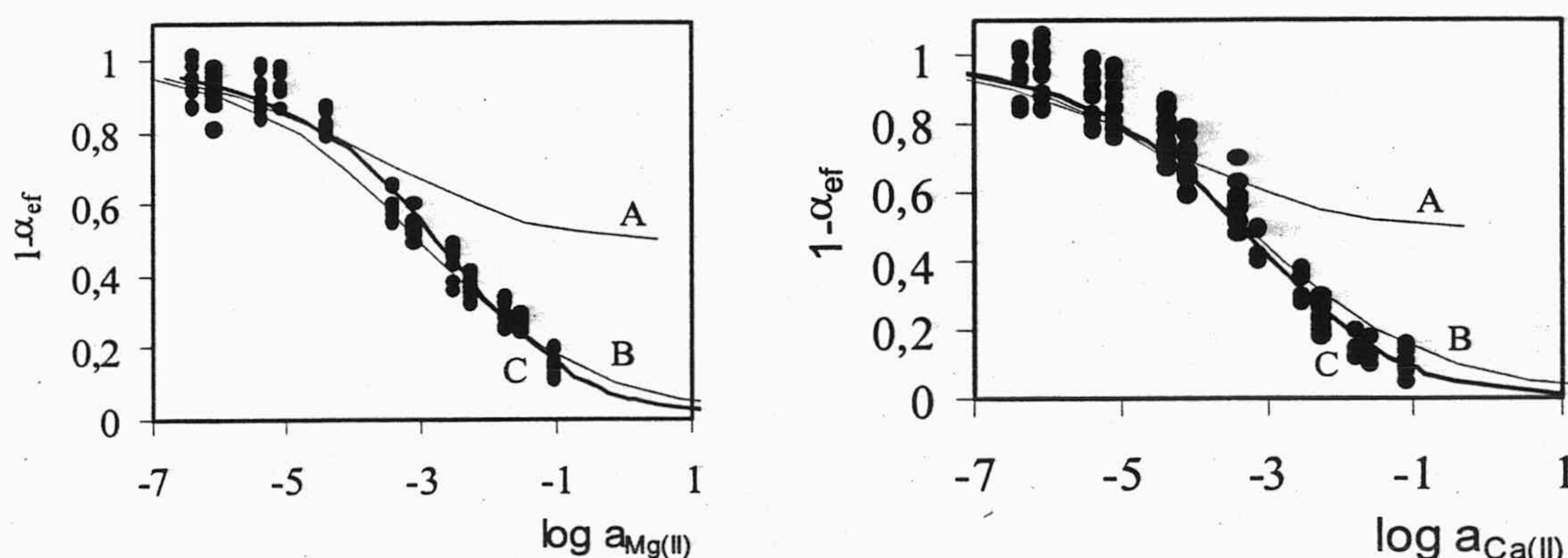


Figura 7.11. Influencia de la actividad de Mg(II) y Ca(II). A) curva teórica para $P=0,5$. B) curva teórica para $P=1$. C) curva teórica para $P=2$.

Para diazacoronas con anillo de 18 miembros similares al aquí estudiado, en concreto el K22E que presenta cadenas laterales tipo diamida glicólica¹³, se ha descrito una estequiometría 1:1 para el complejo de calcio mediante medidas de Resonancia Magnética Nuclear¹³ de ^1H . Por otra parte, la estequiometría aparente derivada del óptima relación molar anion lipofílico/ionóforo) en electrodos selectivos de iones que usan K22B5 como ionóforo y NPOE como plastificante, fue de 2:1 (I:M) tanto para calcio como para magnesio¹⁴.

Mediante ajuste por mínimos cuadrados de los puntos experimentales en la zona lineal de máxima pendiente (8 concentraciones diferentes y 9 réplicas de cada una) de las

¹² K. Seiler, W.E. Morf, B. Rusterholz and W. Simon, *Anal. Sci.*, 5, 557, (1989).

¹³ K. Suzuki, K. Watanabe, Y. Matsumoto, M. Kobayashi, S. Sato, D. Siswanta, y H. Hisamoto, *Anal. Chem.*, 67, 324, (1995).

¹⁴ W. Zhang, L. Jenny and U. Spichiger, *Anal. Sci.*, 16, 11, (2000).

curvas respuesta de ambos alcalinotérreos al modelo teórico indicado por la ecuación 6.1, es posible calcular para $\log K_e^{CaLp}$ el valor de 14,68 y para $\log K_e^{MgLp}$ el valor de 14,44.

2.2.4. Tiempo de contacto.

Para establecer el tiempo necesario que debe estar la tira reactiva desarrollada en contacto con la disolución problema, se prepararon tres sensores con la composición óptima antes indicada y se pusieron en contacto con una disolución 0,1 M en Ca(II) y 0,1 M en Mg(II) a pH 9,0, realizando un estudio cinético como los antes comentados. Se observa que la señal se hace estable a los 200 segundos, no encontrando a partir de ahí ninguna variación superior al 5% de la señal a tiempo infinito o superior a la propia variabilidad del sistema. No obstante, se ha establecido como tiempo de respuesta 300 segundos, ampliando de este modo el margen de seguridad

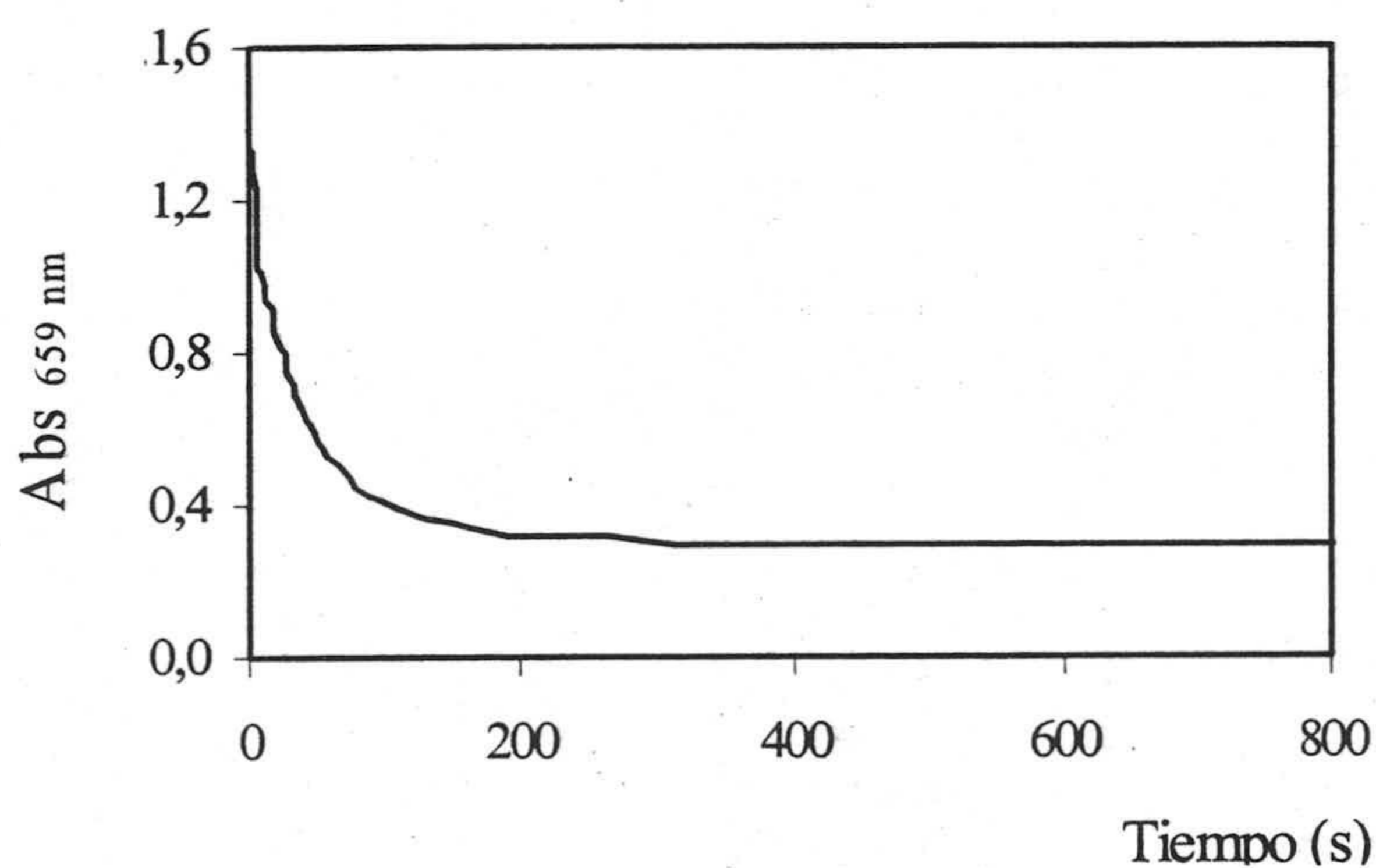


Figura7.12. Variación de la señal respuesta en función del tiempo, para una disolución equimolar de Ca(II) y Mg(II) 0,1M

3. Parámetros analíticos de la tira reactiva.

3.1. Rango dinámico lineal

En esta Memoria de Doctorado, como ya se ha comentado en la metodología y en el Capítulo anterior, se utiliza un rango dinámico de tipo lineal para la función respuesta que es sigmoideal y que se define mediante un test de fallo de ajuste.

Para comprobar que la función de calibrado para dureza no depende del ión alcalinotérreo que utilizamos para calibrar, y en consecuencia confirmar que el sensor responde de igual forma a Ca (II) y Mg (II), se establecieron tres calibrados, utilizando en todos los casos tres réplicas de cada medida.

- a) Desde $1,35 \cdot 10^{-1}$ a $4,10 \cdot 10^{-5}$ M (actividades) en Ca(II).
- b) Desde $9,10 \cdot 10^{-2}$ a $4,10 \cdot 10^{-5}$ M (actividades) en Mg (II).
- c) Desde $8,12 \cdot 10^{-2}$ a $4,68 \cdot 10^{-5}$ M (actividades) de una disolución equimolar de Ca (II) y Mg (II).

Cada réplica se mide con la misma tira reactiva. Los resultados experimentales obtenidos se muestran en las tablas 7.5, 7.6 y 7.7.

Si se compara la zona lineal definida por el test de fallo de ajuste al modelo lineal¹⁵ de los tres calibrados, se comprueba, en todos los casos, que no existe diferencia significativa entre las diferentes curvas de calibrado ($t_{cal} < t_{tab}$). En consecuencia, se concluye que es posible calibrar este sensor, con una mezcla equimolar de una disolución de calcio y magnesio.

¹⁵ Analytical Methods Committee, Analyst, 119, 2363, (1994).

Tabla 7.5 Datos experimentales de la función respuesta para una disolución equimolar de Ca(II) y Mg(II)

[M], M	$\log a_M$	$A_{659 \text{ nm}}$	$1-\alpha_{ef}$
$1 \cdot 10^{-7}$	-7.0840	1.0047	0.9091
$5 \cdot 10^{-7}$	-6.3851	1.0572	0.9211
$1 \cdot 10^{-6}$	-6.0841	0.9511	0.8665
$5 \cdot 10^{-6}$	-5.3854	0.9522	0.8663
$1 \cdot 10^{-5}$	-5.0846	1.0222	0.8897
$5 \cdot 10^{-5}$	-4.3878	0.9329	0.7865
$5 \cdot 10^{-4}$	-3.4090	0.6691	0.5517
$1 \cdot 10^{-3}$	-3.1265	0.6277	0.4947
$5 \cdot 10^{-3}$	-2.5140	0.5253	0.3881
$1 \cdot 10^{-2}$	-2.2734	0.4229	0.3098
$5 \cdot 10^{-2}$	-1.7661	0.3836	0.2468
$1 \cdot 10^{-1}$	-1.5611	0.3497	0.2212
$5 \cdot 10^{-1}$	-1.0679	0.2075	0.0885
1	-0.8306	0.2117	0.0733

Tabla 7.6. Datos experimentales de la función respuesta para Mg(II)

[Mg], M	$\log a_{Mg}$	$A_{659 \text{ nm}}$	$1-\alpha_{ef}$
$1 \cdot 10^{-7}$	-7.0836	1.0047	0.9568
$5 \cdot 10^{-7}$	-6.3847	1.0573	0.9711
$1 \cdot 10^{-6}$	-6.0837	0.9512	0.9165
$5 \cdot 10^{-6}$	-5.3849	0.9523	0.9163
$1 \cdot 10^{-5}$	-5.0842	1.0222	0.9398
$5 \cdot 10^{-5}$	-5.0842	0.9330	0.9398
$5 \cdot 10^{-4}$	-4.3874	0.6894	0.8365
$1 \cdot 10^{-3}$	-3.4084	0.6277	0.6017
$5 \cdot 10^{-3}$	-3.1257	0.5221	0.5448
$1 \cdot 10^{-2}$	-2.5120	0.4230	0.4457
$5 \cdot 10^{-2}$	-2.2700	0.3836	0.3598
$1 \cdot 10^{-1}$	-1.7565	0.3498	0.2968
$5 \cdot 10^{-1}$	-1.5469	0.2577	0.2713

Tabla 7.7. Datos experimentales de la función respuesta para Ca(II)

[Ca], M	log a_{Ca}	$A_{659\text{ nm}}$	$1-\alpha_{ef}$
$1 \cdot 10^{-7}$	-7.0845	0.6046	0.9954
$5 \cdot 10^{-7}$	-6.3855	0.5820	0.9553
$1 \cdot 10^{-6}$	-6.0845	0.5977	0.9833
$5 \cdot 10^{-6}$	-5.3858	0.5548	0.9071
$1 \cdot 10^{-5}$	-5.0850	0.5446	0.8891
$5 \cdot 10^{-5}$	-5.0850	0.4914	0.8891
$1 \cdot 10^{-4}$	-4.3883	0.4485	0.7946
$5 \cdot 10^{-4}$	-4.0900	0.3808	0.7185
$1 \cdot 10^{-3}$	-3.4097	0.3042	0.5984
$5 \cdot 10^{-3}$	-3.1274	0.2347	0.4627
$1 \cdot 10^{-2}$	-2.5163	0.1867	0.3393
$5 \cdot 10^{-2}$	-2.2770	0.1418	0.2542
$1 \cdot 10^{-1}$	-1.7762	0.1314	0.1746
$5 \cdot 10^{-1}$	-1.5759	0.1163	0.1562
1	-1.0978	0.0980	0.1294

Si representamos a partir de los datos de las tablas anteriores la funciones de calibrado de forma independiente para Ca(II), Mg(II) y para la mezcla equimolar de Ca(II)/Mg(II) y ajustamos al modelo lineal en las zonas de máxima pendiente, obtenemos los datos recogidos en la Tabla 7.8.

Tabla 7.8 Pendientes de las zonas linealizadas para Ca(II), Mg(II) y mezcla equimolar de Ca(II) y Mg(II) ($y=a+bx$)

Analito	a	b	$P_{\text{lack of fit}}$
Ca(II)	-0,1277	-0,224	11,7%
Mg(II)	-0,1031	-0,213	5,8%
Mg(II)/Ca(II)	-0,186	-0,223	70,0%

Por medio de la aplicación del correspondiente test estadístico, podemos concluir, tras observar los valores de t_{cal} y t_{tab} que no existe diferencia significativa entre las pendientes de las tres rectas propuestas.

Tabla 7.9 comparación de las pendientes de tres calibrados realizados con Ca(II), Mg(II) y mezcla equimolar de Ca(II) y Mg(II)

Curva calibración	t_{cal}	t_{tab}
Ca vs. Ca-Mg	0,197	2,20
Ca vs. Mg	0,180	2,20
Mg vs. Ca-Mg	1,356	2,20

3.2. Límite superior e inferior

Tras comprobar que es posible calibrar con una mezcla equimolar de calcio y magnesio definimos el límite inferior, como la actividad que corresponde a la intersección de la función de calibrado y la función lineal ajustada en la zona de mínima pendiente.

Para determinarlo usamos dos series de patrones, una en la zona de máxima pendiente (10 niveles, 9 réplicas por nivel), entre $1,48 \cdot 10^{-1}$ y $4,09 \cdot 10^{-5}$ en actividades (1 M y $5 \cdot 10^{-5}$ en concentraciones), y otra en la zona de mínima pendiente de menor actividad (5 niveles, 9 réplicas por nivel), entre $8,23 \cdot 10^{-6}$ y $8,24 \cdot 10^{-8}$ en actividades (10^{-5} y 10^{-7} M en concentraciones). La linealidad de las dos rectas fue comprobada aplicando el test de fallo de ajuste. Las ecuaciones de las rectas obtenidas son:

$$1-\alpha_{ef} = 0,783 - 0,0178 \log a_{M^{2+}} \quad (7.2)$$

$$1-\alpha_{ef} = -0,186 - 0,223 \log a_{M^{2+}} \quad (7.3)$$

La intersección de ambas funciones nos da un límite inferior de rango de medida de 0,019 mM. Por su parte, el límite superior está definido por la intersección de la función de calibrado con el eje de abscisas; así pues el valor obtenido para el límite superior es de 148 mM. Como conclusión, se puede concluir que el rango de medida para la dureza del agua esta comprendido entre 0,019 y 148 mM, expresado en actividades. Si bien en la práctica, se prefiere usar el valor de 135 mM (1000 mM en concentración) como límite superior del rango de medida porque se trata del más alto valor ensayado.

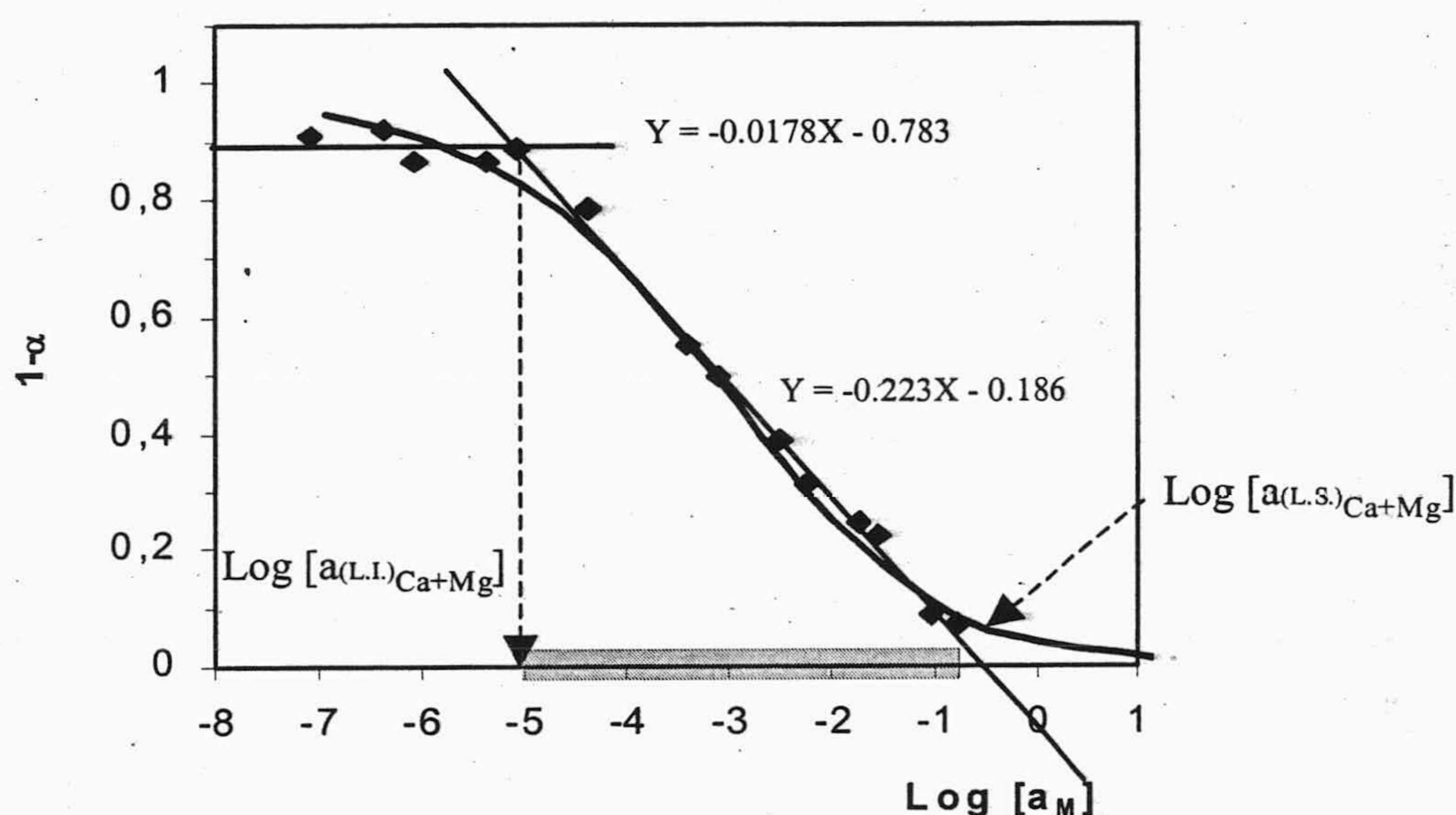


Figura 7.13. Límite superior (L.S.), límite inferior(L.I.) y rango de medida sombreado en verde.

3.3. Precisión

Para evaluar la precisión del procedimiento propuesto (expresada como la desviación estándar relativa) se realizó un estudio a tres niveles de concentración usando una disolución equimolar de Ca (II) y Mg (II); en concreto $4,09 \cdot 10^{-5}$, $7,46 \cdot 10^{-4}$ y $7,98 \cdot 10^{-2}$ M ($5 \cdot 10^{-5}$ M, $1 \cdot 10^{-3}$ y $5 \cdot 10^{-1}$ M en concentraciones) que se encuentran situados en la zona alta, media y baja de la curva de calibrado.

Para cada una de estas concentraciones se realiza un estudio de la precisión usando una misma membrana, esto es, se calcula la precisión intermembrana y usando distintas membranas, esto es, la precisión intramembrana.

b) Precisión intramembrana. En este caso se utilizan diez sensores diferentes con la misma composición óptima y se ponen en contacto con cada disolución de los diferentes niveles de concentración de litio. En la Tabla 7.10 se muestran los resultados obtenidos.

Tabla 7.10 .Reproducibilidad intramembrana del sensor de dureza

Actividad	log a _M									DER, %
BAJA	-5,323	-5,281	-5,566	-5,318	-5,183	-5,234	-5,162	-5,135	-5,121	-2,6
MEDIA	-3,504	-3,947	-4,084	-3,973	-3,683	-3,967	-3,861	-3,755	-3,637	-4,9
ALTA	-1,007	-1,022	-1,032	-0,967	-0,979	-0,986	-0,982	-0,968	-0,957	-2,6

La precisión usando la misma tira reactiva y expresada como desviación estándar relativa de diez réplicas realizadas a tres niveles diferentes de concentración fue 2,6, 4,9 y 2,6 % en términos de $\log a_{\text{Mg}^{2+} + \text{Ca}^{2+}}$. Es de destacar que para este caso, la precisión es mejor que para los anteriores sensores desarrollados.

a) Precisión intermembrana. Se utiliza una sola membrana con la composición óptima establecida y se introduce por diez veces en cada disolución de los diferentes niveles de litio estudiados. Tras cada equilibrado con la disolución se trata con HCl 0,1 M para dejarla preparada para una nueva medida. Los resultados se recogen en la Tabla 7.11.

Tabla 7.11. Reproducibilidad intermembrana del sensor de dureza

Actividad	log a _M									DER, %	
BAJA	-4,405	-4,943	-4,812	-5,392	-5,164	-5,309	-5,534	-4,977	-4,658	-5,280	-7,01
MEDIA	-2,992	-3,264	-3,088	-3,761	-3,373	-3,362	-3,129	-3,058			-7,64
ALTA	-0,906	-1,011	-0,944	-1,016	-1,06	-0,926	-0,924	-0,929	-1,003	-0,980	-5,36

La repetibilidad del método usando diferentes sensores se determinó de la misma forma que antes, usando los mismos niveles de actividad anteriores y realizando de nuevo diez réplicas de cada uno, obteniéndose unos valores de 7,0, 7,6 y 5,4 % en términos de $\log a_{\text{Mg}^{2+} + \text{Ca}^{2+}}$. Es de destacar que la precisión es razonablemente buena, considerando que se cambia la membrana en cada medida y que la tira reactiva desarrollada muestra un comportamiento reversible, pudiendo ser utilizado en más de una ocasión.

3.4. Tiempo de vida.

El tiempo de vida de la tira sensora desarrollada se ha establecido ensayando de forma periódica su capacidad de respuesta. Para ello se preparó un conjunto de tiras reactivas con las que se procedió de la forma siguiente: se conservó cada tira en un tubo de plástico cerrado, alejado de la luz para evitar la fotodescomposición de los componentes de la membrana y evitando posible humedad. Cada semana se comprobó el estado de la misma realizando un espectro previo y, a continuación, estableciendo su respuesta frente a una mezcla equimolar de Ca(II) y Mg(II) 0,01 M. Posteriormente se trata con HCl 0,1 M, se lava con agua y seca, siendo conservada de la misma forma. Tras el estudio se pudo concluir que las tiras sensoras desarrolladas tienen una duración máxima de un mes y medio.

3.5. Costo

El costo de cada sensor ha sido estimado mediante el coste de cada uno de los componentes del sensor cuyos precios han sido obtenidos de los respectivos catálogos actualizados, así pues, el costo es un estimado para el prototipo desarrollado que en ningún caso coincidiría con el costo estándar de una fabricación en serie. En la tabla 7.12 se detalla el coste de este sensor, destacando que el coste de materiales es aproximadamente de poco más de medio céntimo de euro.

Tabla 7.12. Coste desglosado del sensor.

Componente	Precio (€/mg ó ml)	Cantidad/sensor	Precio (€)
K22B5	0,0024	0,01 mg	0,000024
Azul Nilo lip.	0,06	0,017 mg	0,00102
TCFB	0,1	0,0142 mg	0,00142
PVC	0,0001	0,5 mg	0,00005
TBP	0,1	0,0126 mg	0,00126
THF	0,03	0,02 ml	0,0006
Mylar	0,00048	4 cm ²	0,00192
Total			0,0063 €

Tabla 7.13. Parámetros analíticos

Parámetro	Valor; S
Ordenada en origen	-0,186; 0,038
Pendiente	-0,223; 0,013
Nivel de probabilidad % (lack-of-fit test)	70,53
Rango Lineal (mg/l CaCO ₃)	1,9 – 14,800
Limite inferior (mg/l CaCO ₃)	1,9
DER (%) ^a	4 mg/l CaCO ₃ ^b
	17 mg/l CaCO ₃ ^b
Intrasensor	7980 mg/l CaCO ₃ ^b
DER (%) ^a	4 mg/l CaCO ₃ ^b
	17 mg/l CaCO ₃ ^b
Intersensor	7980 mg/l CaCO ₃ ^b
Tiempo de reacción	5 min.
Tiempo de vida	>30 días
Costo	0,0063 €

a: DSR en términos de $\log a_{Ca^{2+}Mg^{2+}}$; b: Actividades

En la Tabla 7.13 se recogen los parámetros analíticos establecidos para el procedimiento propuesto para dureza.

4. Procedimiento propuesto.

Se toma una alícuota de una disolución patrón conteniendo entre 0,019 y 148 mM en actividades (0,06 y 1000 mM en concentración) como CaCO_3 de una disolución de calcio y magnesio en una relación molar 1:1, se coloca en una matraz de 50 ml y se le añaden 5 ml de una disolución reguladora de tris(hidroximetil)aminometano 0,2 M de pH 9,0, enrasando con agua. Se toman 10,0 ml de la anterior disolución que se introducen en un tubo de polietileno de 10x1,5 cm junto con el sensor desechable para dureza durante cinco minutos y sin agitación. A continuación, la membrana se saca de la disolución y se sacude para eliminar las gotas de disolución que la puedan mojar; tras lo cual se mide la absorbancia a 659 nm en la forma anteriormente descrita. Además se mide la absorbancia de cada membrana tras haberla equilibrado con NaOH 0,01 M y posteriormente tras haberla equilibrado con la disolución reguladora de pH 9,0. Con estos datos se calcula $1-\alpha_{\text{ef}}$. La estimación de la actividad en dureza se realiza mediante calibrado de $1-\alpha_{\text{ef}}$ frente a $\log a_{\text{Na}^+}$. Todas las medidas se realizan a temperatura ambiente. No es necesario acondicionar las membranas antes de su uso.

En el caso de muestras de agua, se introducen 9 ml de agua en un tubo de polietileno junto con 1 ml de tampón Tris 0,2 de pH 9,0, operando igual que antes.

5. Aplicaciones y validación

Para estudiar la aplicabilidad de la tira reactiva desarrollada para la determinación de dureza, se ha aplicado a la determinación de dureza en aguas de diverso tipo (naturales,

minerales y de abastecimiento urbano). Para la validación de resultados se han comparado resultados con el habitual método complexométrico que utiliza EDTA como reactivo¹⁶.

La tabla 7.14 nos muestra los resultados obtenidos con el sensor óptico de un solo uso y los resultados obtenidos con el método volumétrico clásico, utilizado como método de referencia. En la tabla 7.13 se ofrecen los valores medios de tres determinaciones para cada muestra con cada método, la desviación estándar de estas medidas y el valor P del test de comparación utilizado. Como puede observarse no existe diferencia significativa entre las medias obtenida utilizando el método propuesto y el de referencia.

Tabla 7.14. Determinación de dureza en diferentes tipos de aguas usando complexometría como método referencia

Muestra	Sensor (mg/L CaCO ₃)	S	Referencia (mg/L CaCO ₃)	S	P _{val} (%)
Agua urbana (<i>Granada</i> ,)	86,4	0,142	84,7	0,046	42,7
Agua urbana (<i>Almuñecar, Granada</i> ,)	260,5	0,372	275,3	0,012	26,5
Agua urbana (<i>Otura, Granada</i> ,)	251,2	0,236	243,3	0,021	29,6
Agua urbana (<i>Berja, Almería</i>)	361,8	0,242	367,0	0,010	36,4
Agua de pozo (<i>Colomera, Granada</i>)	226,9	0,261	225,0	0,010	45,3
Agua de fuente (<i>Berja, Almería</i>)	279,7	0,213	295,00	0,043	14,5
Agua mineral (<i>Sierra de Cazorla</i>)	332,7	0,151	329,30	0,031	36,0
Agua mineral (<i>San Vicente</i>)	96,7	0,192	85,30	0,015	18,2
Agua mineral (<i>Lanjaron</i>)	97,8	0,112	93,30	0,006	26,6
Agua mineral (<i>Villadrau</i>)	95,1	0,223	88,70	0,006	32,1
Agua mineral (<i>Evian</i>)	306,2	0,173	302,00	0,046	36,1
Agua mineral (<i>Fontvella</i>)	132,7	0,171	137,0	0,122	36,9
Agua mineral (<i>Fuente Liviana</i>)	229,1	0,161	233,00	0,017	34,8
Agua mineral (<i>Zambra</i>)	334,7	0,296	341,70	0,055	35,4
Agua mineral (<i>Solan de Cabras</i>)	263,9	0,186	252,70	0,025	18,0

¹⁶ Fresenius W., Quentin K.E., Scheneider W. (eds.), Water Análisis, 67, 324 (1995).

CONCLUSIONES

Los resultados experimentales obtenidos en esta Tesis Doctoral, han conducido a la obtención de las siguientes conclusiones:

1. Se han establecidos diferentes estrategias para el desarrollo de tiras reactivas de tipo óptico para determinar tanto calcio como magnesio así como conseguir la determinación simultánea de ambos, basadas en la medida de absorción de radiación visible por transmisión y que presentan buena reproducibilidad, corto tiempo de respuesta, bajo costo y son una buena alternativa para obtener información analítica.
2. Se ha puesto a punto una tira reactiva irreversible que responde a la concentración de calcio, basada en la formación de un compuesto quelato con el reactivo Clorofosfonazo III que se encuentra inmovilizado como par iónico sobre una soporte inerte formando una zona sensora de PVC y empleando tributilfosfato como plastificante. El tiempo de respuesta de este sensor es de 15 min, el intervalo lineal se encuentra entre 0,8 y 3,1 mg/l y muestra una precisión del 6,4%.
3. Se ha desarrollado el modelo matemático que rige el mecanismo de respuesta de las tiras reactivas basadas en el empleo de un ionóforo y un cromoionóforo, el cual se ha verificado para las distintas tiras de este tipo que se han estudiado
4. Se ha preparado una tira reactiva reversible para la determinación de la actividad en calcio basada en un sistema ionóforo-cromoionóforo. El ionóforo empleado es el éter 18-corona-6, que se encuentra disponible comercialmente. El tiempo de respuesta del sensor es de 300 s, el intervalo lineal se encuentra entre 0,046 y 134 mM (en actividades), la desviación estándar relativa intersensor e intrasensor, para un nivel medio de concentración, es de 8,5 y 2,7 %, respectivamente.

5. Se ha caracterizado una tira reactiva reversible para la determinación de calcio basado en un nuevo ionóforo neutro sintetizado por nosotros: el 4,13-[bis(N-adamantilcarbamoil)propinoil]-1,7,10,16-tetraoxa-4,13-diazacoclooctadecano. El tiempo de respuesta del sensor es de 200 s, el intervalo lineal se encuentra entre 0,050 y 135 mM (en actividades), la desviación estándar relativa intersensor e intrasensor para un nivel medio de concentración es de 6,2 y 3,4 % respectivamente. Esta tira reactiva presenta la ventaja sobre la que utiliza el éter 18-corona-6 de ser más selectiva. Así es 58 veces más selectiva para calcio que para magnesio frente a 20 veces la anterior tira reactiva. Igualmente es 98 veces más para calcio que para sodio, frente a 38 veces la anterior tira. Solamente en el caso del potasio se empeora la selectividad, pues esta tira es 48 veces más selectiva para calcio, mientras que la anterior lo era 119 veces.
6. Usando un sistema ionóforo-cromoionóforo, se han desarrollado una tira reactiva reversible para la determinación de magnesio empleando el ionóforo N,N'-dimetil-aspartamida, sintetizado por nosotros. En este caso el tiempo de respuesta del sensor es de 200 s, el intervalo lineal se encuentra entre 0,009 y 160 mM (en actividades), la desviación estándar relativa intersensor e intrasensor para un nivel medio de concentración es de 14,1 y 4,1 %, respectivamente.
7. Se ha establecido una tira reactiva que responde de forma idéntica y simultánea a la actividad de calcio y magnesio, esto es de dureza, empleando el ionóforo 4,13-[bis(N-adamantilcarbamoil)acetil]-1,7,10,16-tetraoxa-4,13-diazaciclooctadecano y sintetizado por nosotros. El tiempo de respuesta del sensor es de 200 s, el intervalo lineal se encuentra entre 1,9 y 14.800 mg/l de CaCO₃ (en actividades), la desviación estándar relativa intersensor e intrasensor para un nivel medio de concentración es de 7,6 y 5,0 %, respectivamente.

8. Las tiras reactivas desarrolladas en la presente Memoria se han aplicado a la determinación de calcio en muestras de agua de grifo, pozo, mineral, fuente y de mar y muestras de leche tanto entera como desnatada. A la determinación de magnesio en muestras de agua de grifo, mineral y de pozo. A la determinación de dureza en muestras de agua de grifo, mar, pozo, fuente y mineral, sin necesidad de tratamiento previo de las muestras en ningún caso, salvo dilución y adición de disolución reguladora del pH .
9. En todos los casos, el coste de los sensores de un solo uso desarrollados se encuentra entre medio y un céntimo de euro, considerando solo materiales, y el tiempo de vida se encuentra alrededor de un mes y medio.
10. Todas las tiras desarrolladas en la presente Memoria, basadas en un sistema ionóforo-cromoionóforo, emplean el mismo cromoionóforo, el azul Nilo lipofilizado, por lo que en todos los casos se mide a la misma longitud de onda. Al usar la misma reacción de transducción, se posibilita el desarrollo posterior de instrumentación dedicada para la determinación de calcio, magnesio y dureza.
11. Todos los procedimientos propuestos para las diferentes muestras han sido validados mediante métodos de referencia, obteniéndose resultados satisfactorios en todos los casos.
12. Se concluye que es posible el desarrollo de tiras reactivas con buenas características analíticas para la determinación de los analitos estudiados en diversos tipos de muestras, dada su sensibilidad, simplicidad de uso, rapidez y bajo costo.



Biblioteca Universitaria de Granada



0106682