

UNIVERSIDAD DE GRANADA

Facultad de Ciencias

Departamento de Química Analítica



TESIS DOCTORAL

**Desarrollo de nuevos materiales para
la determinación y/o eliminación de
analitos con interés ambiental**

Granada, mayo de 2015

Francisco José Orriach Fernández

Editorial: Universidad de Granada. Tesis Doctorales

Autor: Francisco José Orriach Fernández

ISBN: 978-84-9125-132-3

URI:<http://hdl.handle.net/10481/40441>

PROGRAMA OFICIAL DE POSGRADO EN QUÍMICA

Departamento de Química Analítica

UNIVERSIDAD DE GRANADA



TESIS DOCTORAL

Desarrollo de nuevos materiales para
la determinación y/o eliminación de
analitos con interés ambiental

Realizada por:

D. Francisco José Oriach Fernández

Dirigida por:

Dr. D. Alberto Fernández Gutiérrez

Dr. D. Jorge Fernando Fernández Sánchez

El doctorando D. Francisco José Orriach Fernández y los directores de la tesis Dr. D. Alberto Fernández Gutiérrez, Catedrático de Universidad en el Departamento de Química Analítica de la Universidad de Granada y Dr. D. Jorge Fernando Fernández Sánchez, Profesor Titular de Universidad en el Departamento de Química Analítica de la Universidad de Granada,

GARANTIZAMOS AL FIRMAR ESTA TESIS DOCTORAL

que el trabajo ha sido realizado por el doctorando bajo la dirección de los directores de la tesis y que hasta donde nuestro conocimiento alcanza, se han respetado los derechos de otros autores a ser citados cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

Granada, a 30 de abril de 2015

LOS DIRECTORES DE LA TESIS:

Prof. Dr. D. Alberto Fernández Gutiérrez

Catedrático del Departamento de Química Analítica de la Universidad de Granada

Prof. Dr. D. Jorge Fernando Fernández Sánchez

Profesor Titular del Departamento de Química Analítica de la Universidad de Granada

EL DOCTORANDO:

D. Francisco José Orriach Fernández

Licenciado en Química



UNIVERSIDAD DE GRANADA

Departamento de Química Analítica "Profesor Fermín Capitán García"

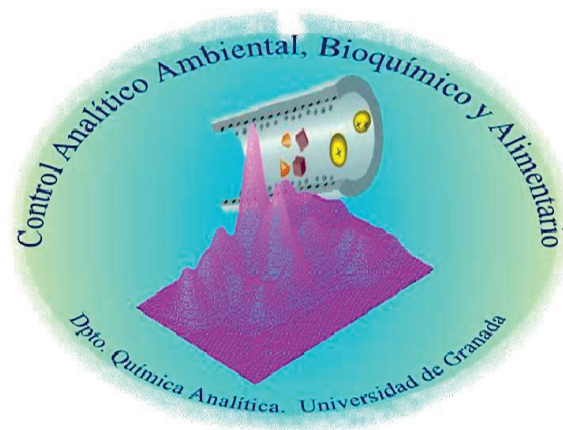
Campus Universitario Fuentenueva 18071 Granada, España

El Prof. Dr. D. Alberto Fernández Gutiérrez, Catedrático del Departamento de Química Analítica "Profesor Fermín Capitán" de la Facultad de Ciencias, y Director del Grupo de Investigación FQM-297 "Control Analítico, Bioquímico y Alimentario" de la Universidad de Granada,

CERTIFICA QUE:

El trabajo que se presenta en esta Tesis Doctoral con el título "*Desarrollo de nuevos materiales para la determinación y/o eliminación de analitos con interés ambiental*", que ha sido realizado bajo mi dirección y la del Profesor Dr. D. Jorge Fernando Fernández Sánchez, reúne todos los requisitos legales, académicos y científicos para hacer que el doctorando *D. Francisco José Orriach Fernández* pueda optar al grado de Doctor Internacional en Química. Esta Tesis ha sido realizada en los laboratorios que el grupo FQM-297 tiene en el Departamento de Química Analítica y también, parcialmente, en el Institute of Analytical Chemistry and Food Chemistry, de Graz University of Technology (Austria).

Y para que así conste, expido y firmo el presente certificado en Granada a 30 de abril de 2015:



La realización de esta Tesis Doctoral ha sido posible gracias a un contrato adscrito al Proyecto de Excelencia P07-FQM-02625, y a la financiación con cargo a fondos del grupo FQM-297 "Control Analítico, Ambiental, Bioquímico y Alimentario" del Plan Andaluz de Investigación de la Junta de Andalucía, procedentes de diferentes contratos, proyectos y subvenciones de la Administración central y autonómica y plan propio de investigación de la UGR.

With a little help from my friends

Recuerdo con entusiasmo e ilusión aquel mes de marzo de 2010, cuando los Doctores D. Alberto Fernández Gutiérrez y D. Jorge Fernando Fernández Sánchez me ofrecieron la oportunidad de entrar a formar parte de su "tripulación" en el "galeón" FQM-297, para desarrollar mi Tesis Doctoral en Química dentro del departamento de Química Analítica de la Universidad de Granada.

Aquella decisión, como cada elección que se toma, cambió mi vida, obligándome a renunciar a ciertas cosas, pero brindándome muchas otras; trazando un camino que me ha traído hasta aquí y ahora. El agradecimiento es la memoria del corazón, y como tal, llegados al momento en que me hallo, debo detenerme un instante para recordar y valorar las vivencias y personas que me han acompañado en este viaje que está a punto de concluir. Experiencias y figuras que han contribuido a mi aprendizaje en la labor investigadora, así como a mi crecimiento tanto personal como profesional.

Por tanto, quiero agradecer a mis directores de Tesis la oportunidad brindada y la confianza que depositaron en este "grumete". En primer lugar, a Don Alberto Fernández Gutiérrez, capitán del galeón que es el grupo, siempre preocupado por llevarlo a buen puerto, con toda su tripulación a salvo. Mediando en la concordia y luchando por lograr una buena travesía, manteniendo un rumbo firme y sin deriva. A Don Jorge Fernando Fernández Sánchez, primer oficial, por robarte horas al sueño, por encarnar la eficacia, por apostar por mí para aquel contrato de excelencia. Siempre estoico. Gracias Jordi por tu ayuda y por todo lo que he aprendido de ti. Gracias a ambos por la dedicación constante y la sabia dirección de esta Tesis, que por fin concluye.

Y al resto de la tripulación!

A Alegría, la chica de la eterna sonrisa, no conozco a nadie que encarne mejor su nombre. Has sido un gran apoyo personal. No sólo para mí, me consta que eres uno de los mástiles principales del grupo.

A mis mentores en el laboratorio: Ángel y Antonio Luis, los nuevos empresarios. Gracias por vuestros sabios consejos y por vuestra ayuda sin la cual, gran parte de esta tesis no habría sido posible. Mis padrinos durante un año y buenos amigos desde entonces. Cuando os fuisteis, me quitasteis las ruedas de apoyo y tuve que pedalear solo. Os deseo todo el éxito en NanoMyP, y que pronto lancéis una OPA sobre Bayer o similar. Y hablando de NanoMyP, me gustaría mencionar a Mayca y M^a Carmen, y agradecerles sus ánimos y apoyo constantes. Gracias chicas.

A mis compañeros de becaría, con los que he compartido el día a día, Elena, Marta, Tere, Lucía, Adil, Santi, y los que ya no están: Rocío, María, Paco y Paulina. Gracias por esos buenos ratos. Por el apoyo recibido y los ánimos. Por las "conspiraciones" para sorprender en los cumpleaños. Por los polvorones y los chupitos en navidad. Mucha suerte y ánimo, sobre todo para los pre-doc. Mención especial a Martita y Santi, por la paz que me daba charlar con vosotros, por sentirlos cerca y por demostrarme que se puede contar con vosotros siempre.

A los compañeros del CIDAF, con los que tuve la ocasión de coincidir un breve período de tiempo, en los inicios del camino, y a los que deseo igualmente todo el éxito.

A David, compañero y amigo. Gracias por esos ratos agradables tanto dentro como fuera de la Universidad, donde incluyo al grupo "Pa Kear": Yoli, Alba, Cuca, Mónica, Nico, Adela, etc. Me acogisteis y me hicisteis sentir como uno más de la familia. Gracias por todo!

No querría olvidarme de agradecer a los Doctores Antonio Rodríguez, Paco Carrasco y Francisco José Maldonado la disposición, atención y ayuda que me han brindado, principalmente en la última y más temida etapa de toda Tesis Doctoral: la burocrática. Gracias por facilitarme las cosas cuando me veía desbordado y perdido.

Pepe, aunque lamentablemente no pueda decírtelo en persona, te agradezco de corazón los consejos que me diste en su día. Gracias por tus charlas, tus ánimos y tus consejos. Se te echa de menos.

A tres personas que despertaron en mí el interés, primero por la Química, como fue Miguel Caravaca, y después por la investigación, Nati y Manuel Melguizo. Gracias por implicaros y mostrar verdadero interés por vuestros alumnos, cuyas vidas pueden verse enormemente influenciadas por una actitud motivadora como la vuestra. Esta Tesis también es, en parte, gracias a vosotros.

Al instituto tecnológico de Graz y a todo su equipo, que me acogió como uno más, y me hizo sentir como en mi propia casa. Aunque no es seguro que lleguen a leer estas líneas, sí que es seguro que siempre estarán presentes tanto en mi corazón como en mi memoria, y por si algún día tienen la oportunidad de leerlo, aquí va mi agradecimiento:

I will never forget my family from Graz. I would like to thank to the "Chemo- and Biosensors" Group of the University of Graz (Austria), for their huge generosity and hospitality during my whole stay in Graz. Daniel (The Boss), Sergey, Ingo, Torsten, Babsy, Klaus, Tobi, Gamsi, Luki, Lisi, Christoph, Philip, Gerda, Susanne, Spela and all the people that I may have forgotten, thank you all for being so kind and for help me with everything I needed. I would like to give special thanks to Michi and Birgit for your patience with my English and because the good memories I have from Graz are because of you. *Here comes the sun.*

Por supuesto, no pueden faltar los amigos, aquellos con los que uno se enfada de vez en cuando y a pesar de ello siempre están ahí, esos extraños seres que nos preguntan cómo estamos y se esperan a escuchar con atención la contestación. Por ello merecen una mención especial, personal e individual.

En primer lugar a mis tres hermanos jienenses, grandes amigos y mejores personas. Dr. Calahorra, como sabes esta Tesis ha sido posible gracias a ti. Gracias por estar siempre ahí, desde el principio, por aguantarme y ser mi confidente en tantas ocasiones, por preocuparte por mí, y porque gracias a ti, de nuevo, conocí a la familia que ahora tengo en Jaén. Dr. Peñas, M.P. Gracias por tus ánimos, por tu apoyo y por tu dinamismo. Eres todo un ejemplo de organización, de seriedad y de elocuencia, salvo en algunas ocasiones. Dr. Domínguez, (Juanka's), representas el paradigma de la honestidad y la genialidad, amigo de tus amigos. Realmente eres un modelo a seguir.

A mis niñas Jienenses, Isa y Laura. Gracias por vuestros ánimos, y por la paciencia que gastáis con vuestros respectivos. Tenéis el cielo ganado con creces, sobre todo por aguantarnos cuando nos juntamos todos. Gracias por esos buenos ratos en Denia, Torres, Nerja, Jaén, etc.

A Esteban, Lito, David, Ana y Laura Chapado, los "Exiliados" en Jaén, porque siempre nos quedará un buen recuerdo de Jaén que diluirá el amargo recuerdo de otro sitio, de cuyo nombre no quiero acordarme. Gracias por vuestro constante interés. Vuestra compañía fue un punto de inflexión en mi vida.

A mi abogado Óscar, a Marta y a mis terapeutas Yoli e Iván, gracias por vuestras sesiones, por esas casas rurales, por esas reuniones y esas sobremesas tan divertidas, pero sobre todo por vuestra amistad sincera y el cariño que desprendéis.

Gracias también a Soco y Paco, por haberme acogido con tanto cariño y abrirme las puertas de vuestra casa (que pronto os pediré), así como al resto de la familia Gutiérrez por dejarme formar parte de ella y por su constante interés, ánimo y apoyo.

A toda mi familia, tanto los presentes como los ausentes; el hecho de que no los olvidemos los hace inmortales. Gracias a todos por hacerme sentir orgulloso de la familia que tengo, por vuestra ayuda en los momentos duros y por contagiarme de júbilo en los buenos.

Gracias especialmente a mis padres, a mi hermana, a mi hermano Fran, y a mi sobrino Arturo. Vuestro apoyo ha sido el que me ha mantenido a flote en todo momento. Gracias por vuestras palabras de aliento, motivación y confianza. Por estar siempre ahí, por vuestro esfuerzo y paciencia, y sobre todo por vuestro sacrificio. Gracias a vosotros, he logrado llegar hasta aquí, y convertirme en la persona que soy.

Finalmente, a mi Doctora Lourdes, la estrella que ha iluminado con intensidad mi camino, siempre a mi lado, apoyándome y dándome ánimos y cariño. Gracias por tu paciencia cuando el día me pillaba distraído. Ahora comenzamos una nueva etapa juntos. Contigo siempre. Contigo todo.

Espero no haberme olvidado de nombrar a nadie, y si así ha sido, mis más sinceras disculpas. Puede fallarme la memoria, pero no el corazón.

A todos los que de alguna forma me habéis acompañado en este viaje, Gracias.

A mi familia

Lo más cerca que puedo estar de concebir el infinito
es a través del cariño que les profeso.

“Un científico en su laboratorio no es sólo un técnico, es también un niño colocado ante fenómenos naturales que le impresionan como un cuento de hadas.”

Marie Curie

Índice

Índice

Justificación de la Tesis	3
Objetivos	4
Resumen	9
Summary	13
Introducción	17
1. Descripción y clasificación general de las reacciones de polimerización	19
1.1 Monómeros y polímeros, conceptos básicos	19
1.2 Copolímeros	21
1.3 Clasificación histórica de reacciones de polimerización	22
1.4 Clasificación actual y descripción general de reacciones de polimerización	22
1.4.1 Polimerización por etapas	22
1.4.2 Polimerización en cadena	23
1.4.2.1 Polimerización iónica	24
1.4.2.1.1 Polimerización aniónica	24
1.4.2.1.2 Polimerización catiónica	24
1.4.2.2 Polimerización radical	25
1.5 Formas de llevar a cabo la polimerización	26
1.5.1 Polimerización en masa	26
1.5.2 Polimerización en disolución	26
1.5.3 Polimerización por precipitación	28
1.5.4 Polimerización por dispersión	29
1.5.5 Polimerización en suspensión	29
1.5.6 Polimerización en emulsión	30
1.5.7 Polimerización en miniemulsión	32
1.5.8 Polimerización en microemulsión	32

1.6	Descripción general de la polimerización radical.....	33
1.6.1	Esquema cinético de la polimerización radical.....	33
1.6.1.1	Iniciación	33
1.6.1.2	Propagación	34
1.6.1.3	Terminación natural	34
1.6.1.4	Terminación por transferencia de cadena.....	35
1.6.2	Copolimerización radical	35
1.7	Polimerización radical controlada (CRP).....	36
1.7.1	Generalidades	36
1.7.2	Mecanismos en la polimerización radical por transferencia de átomo (ATRP).....	38
1.7.3	Metodologías en la ATRP	39
1.7.3.1	ATRP normal.....	39
1.7.3.2	ATRP reversa.....	40
1.7.3.3	ATRP reversa simultanea e iniciación normal (SR&NI)	40
1.7.3.4	ATRP por transferencia de electrón generada por un activador (AGET)	41
1.7.4	Condiciones experimentales en ATRP	41
2.	Sensores Químicos	42
2.1	Qué es un sensor	42
2.2	Características de un sensor químico	43
2.2.1	Definiciones	44
2.2.2	El sensor químico ideal	46
2.3	Elementos de los sensores químicos	48
2.4	Importancia y actualidad de los sensores.....	49
2.4.1	Campos de aplicación.....	49
2.4.1.1	En el campo de la seguridad alimentaria	49
2.4.1.2	En el campo de las ciencias de la salud.....	50
2.4.1.3	En el campo del control medioambiental.....	50
2.4.1.4	En el campo industrial.....	50
2.5	Nanotecnología y sensores químicos.....	51
2.6	Clasificación de sensores químicos	52
3.	Sensores Ópticos	56
3.1	Generalidades de los sensores ópticos.....	56
3.2	Clasificación de los sensores ópticos	58
3.3	Tipos de fases sensoras	60

3.4	Mecanismos de reconocimiento	61
3.5	Soportes sólidos usados en el desarrollo de fases sensoras ópticas.....	62
3.5.1	Membranas poliméricas	62
3.5.2	Matrices inorgánicas: Sol-geles y óxidos metálicos.....	65
3.5.3	Polímeros de impronta molecular (MIPs)	67
3.5.3.1	Polimerización en bloque	69
3.5.3.2	Polimerización en disolución	69
3.5.3.3	Polimerización en suspensión.....	69
3.5.3.4	Polimerización en fase sólida	69
3.5.4	Materiales híbridos nanoestructurados.....	71
3.5.4.1	Nanopartículas magnéticas usando copolímeros lineales	71
3.5.4.1.1	Miniemulsión-evaporación	71
3.5.4.1.2	Precipitación-evaporación.....	72
3.5.5	Nanofibras preparadas por electrohilado de polímeros lineales	73
3.5.6	Técnicas de inmovilización del reactivo ópticamente activo.....	76
3.5.6.1	Métodos de inmovilización física	76
3.5.6.2	Métodos de inmovilización química.....	78
4.	Eliminación de haluros en medio acuoso	79
4.1	Haluros en medio acuoso y sus inconvenientes	79
4.2	Técnicas de eliminación de haluros	80
	Bibliografía de la Introducción	82
	Parte Experimental	95
	Primer Bloque	97
	Capítulo 1. New fluorescent pH sensors based on covalently linkable PET rhodamines.....	99
	Bibliografía del Capítulo 1	117
	Appendix A. Supplementary data	121
	Capítulo 2. Evaluation of novel, high performance optical sensing phases based on copper(I) complexes for oxygen determination using intensity and lifetime measurements	135
	Bibliografía del Capítulo 2	160
	Segundo Bloque	165
	Capítulo 3. Hg ²⁺ - selective sensing film based on the incorporation of a rhodamine 6G derivative into a novel hydrophilic water-insoluble copolymer	167
	Bibliografía del Capítulo 3	186

Capítulo 4. A sensing microfibre mat produced by electrospinning for the turn-on luminescence determination of Hg ²⁺ in water samples.....	191
<i>Bibliografía del Capítulo 4</i>	209
Tercer Bloque	213
Capítulo 5. The development of cellulose acetate-chitosan blend membranes loaded with silver for halides removing	215
<i>Bibliografía del Capítulo 5</i>	230
Conclusiones	235
Conclusions	241

Justificación y Objetivos

Justificación de la Tesis

El desarrollo socio-económico de los países desarrollados exige de las administraciones la puesta en acción de controles ambientales cada vez más estrictos, por lo que la creciente demanda de técnicas de detección y/o eliminación de analitos con interés ambiental, ha provocado un enorme interés en la búsqueda y desarrollo de nuevas tecnologías que den lugar a métodos de análisis e instrumentación sencilla para la monitorización directa de analitos, así como a nuevos materiales funcionales. La importancia actual de este objetivo explica el avance exponencial que ha experimentado el desarrollo de nuevos materiales inteligentes. Dentro de este marco, la combinación de las excelentes propiedades que ofrecen las fibras ópticas como vías de transmisión de la luz a través de grandes distancias, con la abundante información química que se puede obtener mediante técnicas analíticas espectroscópicas, ha llevado a un aumento espectacular de la utilización de estos nuevos materiales en el desarrollo de sensores con detección óptica para el análisis de numerosos parámetros de interés medioambiental, industrial, clínico y químico, tales como pH, oxígeno o contaminantes.

Por otro lado, la conjugación del uso de polímeros funcionales con la capacidad actual de procesarlos, transformándolos en materiales nanoestructurados, ha permitido innovar en la aplicación de estos nuevos materiales, desarrollando membranas capaces de eliminar (retener) contaminantes del medio hídrico, dando lugar a materiales con una gran aplicabilidad ambiental e industrial, solucionando problemas complejos presentes en la Química Analítica.

El objeto principal de esta memoria es el desarrollo de nuevos materiales y su aplicación tanto en fases sensoras ópticas, para la determinación de pH, oxígeno y Hg(II), como en la retención y eliminación de haluros en medio acuoso.

Objetivos

Se pretenden conseguir fases sensoras ópticas que controlen parámetros generales de gran interés en la determinación de la calidad de las aguas (pH y pO_2). Para ello, el **primer objetivo** consiste en desarrollar nuevos materiales sensores de pH que tengan una vida útil mucho más efectiva que los actuales. Se ha demostrado que su inmovilización covalente en soportes sólidos aumenta su estabilidad, ya que elimina los procesos de agregación y migración; haciendo que las características de la fase sensora sean más adecuadas para producir sensores a escala industrial. Por tanto, se van a sintetizar nuevos compuestos ópticamente sensibles a pH, basados en rodaminas funcionalizadas, cuyo principio de sensibilidad a los cambios de pH se debe a una transferencia de electrones fotoinducida (PET) intramolecular, entre los grupos amino no protonados y el cromóforo excitado. La funcionalización de estos indicadores con un grupo pentafluorofenilo va a permitir inmovilizarlos, mediante un acoplamiento covalente sencillo por "*click chemistry*", en matrices sólidas como gel de sílice y poli(2-hidroxietilmetacrilato).

En cuanto a los sensores de oxígeno, existen multitud de compuestos que ofrecen unas características excelentes para su construcción, principalmente complejos de Pt(III), Pd(II), Ru(II) e Ir(III). Sin embargo estos complejos suelen ser caros y encarecen mucho la fabricación a gran escala de este tipo de sensores. Para disminuir el coste sería necesario poder disponer de otros complejos de metales más baratos. Hay ciertos indicios que hacen pensar que sería posible diseñar complejos de Cu(I) que poseyesen propiedades similares a estos complejos, por lo que el **segundo objetivo** va a abordar su síntesis, caracterización e inmovilización en diferentes soportes sólidos, para evaluar las verdaderas bondades de estos nuevos complejos en el campo de los sensores de oxígeno. La caracterización se va a llevar a cabo por métodos de fase resuelta y por tiempos de vida de luminiscencia, en el dominio de la frecuencia.

Por otro lado, la contaminación por metales pesados como el mercurio, plantea una gran amenaza a causa de los efectos letales que puede llegar a causar en el medio ambiente y en los organismos vivos que habitan en él, por lo que su detección de forma rápida, sencilla y selectiva es un objetivo crucial. Los principales problemas a la hora de inmovilizar un indicador en soportes sólidos, se deben al carácter hidrofílico que suele tener este, conduciendo a una lixiviación del indicador inmovilizado. Además, la gran mayoría de los polímeros comerciales suelen ser de carácter hidrofóbico, impidiendo o dificultando la difusión del analito desde el medio acuoso hacia la fase sensora; no hay muchos polímeros hidrofílicos y además químicamente compatibles que puedan ser utilizados para este fin. Actualmente, los esfuerzos en este campo están enfocados al desarrollo de nuevos sensores ópticos de detección rápida, selectiva y con elevada sensibilidad para el seguimiento de iones de metales pesados a tiempo

real. Para desarrollar una fase sensora óptica que se acerque a los requerimientos actuales del mercado, es necesario aumentar la estabilidad de las sondas y su sensibilidad analítica; además su carácter hidrofílico supone una dificultad añadida a la hora de inmovilizarlas en un soporte polimérico. Por tanto, el **tercer objetivo** de esta Tesis es desarrollar nuevos polímeros hidrofílicos y utilizarlos como soporte para la preparación de una fase sensora sensible a mercurio en medio acuoso.

El **cuarto objetivo** será procesar el material desarrollado en el tercer objetivo, mediante técnicas electrohidrodinámicas, para disminuir su tamaño, aumentando su superficie específica y por tanto, su sensibilidad; y obtener materiales nanoestructurados, con el fin de aumentar su estabilidad y mejorar los tiempos de respuesta.

Siguiendo en la línea de contaminantes en medio acuoso, la presencia de haluros en aguas supone un gran problema para la industria, que dedica un importante esfuerzo económico a retirarlos de las aguas que usan en sus procesos de fabricación. Existen multitud de formas de retirarlos de forma química, pero la mayoría requieren de compuestos que pueden ser más perjudiciales y dañinos que los propios haluros o son muy costosos debido principalmente a que no se pueden reutilizar. Por ello, en los últimos años ha habido un interés creciente por el desarrollo de nuevos materiales inteligentes capaces de retirar de forma selectiva los haluros de las aguas y que, posteriormente, puedan ser regenerados y reutilizados; disminuyendo así el coste de este proceso. El quitosano es un polímero derivado de la quitina (presente en el exoesqueleto del marisco) y actualmente se están desarrollando trabajos inmovilizando plata en este polímero con aplicaciones biocidas anti-incrustantes, sin embargo estos materiales podrían desarrollarse para precipitar haluros en su superficie. Por ello, el **quinto objetivo** de esta Tesis consistirá en diseñar nuevos materiales basados en mezclas poliméricas de quitosano y acetato de celulosa, con plata inmovilizada en su superficie para precipitar haluros en medio acuoso y determinar su efectividad, esperando conseguir un material barato, efectivo y reutilizable.

Resumen - Summary

Resumen

Esta memoria presenta los resultados obtenidos durante la realización de la Tesis Doctoral que lleva por título “Desarrollo de nuevos materiales para la determinación y/o eliminación de analitos con interés ambiental”. Se ha dividido en dos secciones principales: introducción y parte experimental.

La **introducción** recoge, en primer lugar, una descripción y clasificación de las reacciones y técnicas de polimerización de forma general. Además se trata la polimerización radical y dentro de esta, la polimerización radical controlada y la polimerización radical por transferencia de átomo (ATRP), así como sus metodologías, pues con ésta técnica se ha desarrollado el copolímero utilizado en los capítulos 3 y 4. En segundo lugar se da una visión general de los sensores químicos, sus características, los elementos de los que están constituidos, sus campos de aplicación y una breve clasificación. A continuación se profundiza en una rama más específica de los sensores químicos, como son los sensores ópticos, basados en la interacción de la radiación electromagnética con la materia. En esta sección se realiza una clasificación de los sensores químicos ópticos, y se da una visión general de los tipos de fases sensoras y mecanismos de reconocimiento, así como los diferentes soportes sólidos que se suelen utilizar para desarrollar las fases sensoras, que es el principal objetivo de los dos primeros bloques experimentales de esta Tesis Doctoral. Finalmente, se hace una breve introducción sobre el problema que supone la presencia de haluros en aguas de consumo, concretamente bromuro y yoduro, las dificultades de eliminarlos del medio y la alternativa que supone un nuevo material que retenga los haluros en su superficie.

La segunda parte, denominada **parte experimental**, recoge los resultados obtenidos durante la realización de la presente Tesis Doctoral y la discusión de los mismos; se divide en tres bloques, cada uno compuesto de uno o dos capítulos.

El **primer bloque** se centra en los trabajos desarrollados para la determinación y control de parámetros de interés ambiental, como son el pH y la concentración de O₂. Este bloque abarca los capítulos 1 y 2.

El **capítulo 1** muestra los resultados del trabajo desarrollado en el *Institute of Analytical Chemistry and Food Chemistry* de la *Graz University of Technology* (Austria), y describe la síntesis de una nueva clase de indicadores fluorescentes de pH, derivados de la rodamina, cuyo principio de sensibilidad se basa en el proceso de transferencia electrónica fotoinducida entre los grupos amino no protonados y el cromóforo excitado. La fluorescencia de estos indicadores disminuye al aumentar el pH. La estructura de estos nuevos indicadores posee un grupo pentafluorofenilo en la posición 9 del grupo xanteno que, mediante sustitución nucleofílica, permite el acoplamiento covalente con grupos tioles, y por tanto su inmovilización en soportes sólidos, como matrices poliméricas o partículas de sílice.

El **capítulo 2** se centra en la preparación y caracterización de nuevas fases sensoras ópticas basadas en complejos de Cu(II) para la detección de concentraciones bajas y ultra bajas de oxígeno así como en el uso de herramientas avanzadas de comunicaciones para la excitación y el tratamiento de las señales de emisión. Estos complejos fueron depositados sobre poliestireno y sobre un soporte nanoestructurado basado en un óxido hidróxido de aluminio (AP200/19). Para la evaluación de las fases sensoras y su compatibilidad con los soportes en función de las características del complejo se determinaron sus constantes de Stern Volmer, rendimientos cuánticos de luminiscencia y tiempo de respuesta usando medidas de intensidad y de tiempos de vida de luminiscencia por el método de modulación de fase de multifrecuencia. Estas fases sensoras han mostrado mayor sensibilidad que muchas fases sensoras clásicas de Ir(III).

El mercurio es uno de los contaminantes más peligrosos para el medio ambiente debido a su elevada toxicidad y a su bioacumulación en los seres vivos, por lo que su detección temprana podría evitar graves problemas medioambientales. Aunque existen multitud de ejemplos de sondas moleculares sensibles a mercurio en disolución, hay pocos casos de sondas inmovilizadas en soportes sólidos para la detección de mercurio. En el **segundo bloque** se desarrollan nuevos materiales sensibles al mercurio, basados en la inmovilización de un indicador derivado de la rodamina 6G, denominado FC1, que debido a su polaridad, no se pudo inmovilizar en ningún polímero comercial disponible. Para solventar este problema se realizaron dos trabajos experimentales que se reflejan en los capítulos 3 y 4.

El **capítulo 3** describe el desarrollo de una nueva fase sensora, selectiva a mercurio, basada en la inmovilización del mencionado FC1 en un soporte polimérico afín. Para ello se sintetizó un nuevo copolímero poli(2-hidroxietil metacrilato-co-metil metacrilato), insoluble en agua pero con propiedades hidrofílicas, garantizando su afinidad química con el indicador, evitando así problemas de lixiviación, agregación o migración, y mejorando la permeabilidad del analito hacia el indicador. El copolímero se sintetizó mediante el método de polimerización radical por transferencia de átomo inversa. Además, se optimizaron las condiciones instrumentales y experimentales que pueden afectar a la sensibilidad de la fase sensora. Finalmente, para demostrar su aplicabilidad, se analizaron dos muestras reales de agua (agua de grifo y agua embotellada).

Aunque los resultados fueron satisfactorios, el tiempo de respuesta y la sensibilidad podrían mejorarse haciendo uso de la nanotecnología. Por tanto, el **capítulo 4** se centra en el desarrollo de una tela no tejida sensible y altamente selectiva al mercurio, formada por microfibras que incorporan al indicador encapsulado en el interior de estas. Las microfibras se obtienen mediante la técnica de electrohilado o *electrospinning*, que permite obtener fibras de pequeño tamaño, aumentando considerablemente su superficie específica y por tanto su sensibilidad, por lo que se mejoran los tiempos de respuesta en la detección del analito. El tejido preparado es altamente hidrofílico, pero insoluble tanto en medio acuoso como en disolventes apolares, posee propiedades mecánicas excelentes: es fácilmente manipulable, presenta una elevada consistencia y gran flexibilidad. Además, el indicador encapsulado preserva su sensibilidad, mostrando una intensa fluorescencia en presencia de mercurio.

El **tercer bloque** se compone de un único capítulo, basado en la síntesis de membranas de retención de haluros. Cuando el agua se somete a tratamientos de potabilización, los haluros presentes se oxidan produciendo subproductos de desinfección, que pueden llegar a ser muy tóxicos y difíciles de eliminar. Por tanto, sería de gran interés disponer de materiales capaces de eliminar de forma simple y económica estos haluros del medio antes del tratamiento desinfectante; aspecto que se ha tratado en este último capítulo. En base a varios trabajos de quitosano con plata inmovilizada, el **capítulo 5** desarrolla la síntesis de nuevas membranas de mezclas poliméricas de quitosano y acetato de celulosa con plata adherida, para eliminar haluros en medio acuoso de forma satisfactoria, aprovechando la capacidad de la plata para precipitar haluros en la superficie de la membrana. Además se realiza una caracterización química y textural completa, y finalmente se realiza un estudio de aplicabilidad para eliminar haluros en dos muestras reales de agua.

Summary

This manuscript shows the results obtained during the realization of the Doctoral Thesis titled "The development of new materials for determining and/or removing analytes with environmental interest". This doctoral thesis has been divided into two main parts: the introduction and the experimental part.

The **introduction** starts with a description and classification of polymerization reactions and techniques in general. Moreover, radical polymerization technique and methods of controlled radical polymerization (CRP) are treated, concluding with the *atom transfer radical polymerization (ATRP)* and its methodologies, because the copolymer used in Chapters 3 and 4 has been synthesized using this technique. Secondly, a general overview of chemical sensors, their features, components, application fields and a brief classification is given; analysing in a deeper way a specific area of chemical sensors, such as optical sensors. They are based on the interaction of the electromagnetic radiation with matter. In this section, a classification of optical chemical sensors is made, giving an overview of the different kind of sensing layers and recognition mechanisms as well as the different solid supports usually used for developing sensing layers, which is one of the main aims of this Doctoral Thesis. Finally, a brief introduction about the toxicological problems caused by the presence of bromide and iodide in drinking water, the difficulties of removing them from the media and the relevance of the development of new materials to retain halides in its surface is also given.

The second part of the manuscript, so-called **experimental part**, shows the results obtained during the Doctoral Thesis. This part is divided in three thematic sections, each one having one or two chapters.

The **first section** is composed of chapters 1 and 2. It is focused on the determination and monitoring of important environmental parameters such as pH and oxygen concentration by using optical sensors.

Chapter 1 displays the results obtained during the work developed in the Institute of Analytical Chemistry and Food Chemistry, at the Graz University of Technology (Austria). It describes the synthesis of a new class of fluorescent pH-sensing dyes based on the rhodamine structures. The pH-sensitivity is originated from the intramolecular photoinduced electron transfer

process between non-protonated amino groups and the excited chromophore. The pH sensitivity of these dyes is reflected by a strong decrease in emission intensity when pH increases. The structures carry a pentafluorophenyl group in the 9-position of the xanthene core which is employed for simple and effective covalent coupling by "click" reaction with mercapto groups by nucleophilic substitution. This coupling allows the immobilization of these dyes into several solid supports, such as polymeric matrixes or silica gel beads.

Chapter 2 is focused on the development and characterization of new optical sensing layers based on Cu(I) complexes for low and ultra-low oxygen detection that provide outstanding analytical performance when combined with advanced communication tools for treating the excitation and emission signals. These complexes were incorporated into both a polystyrene matrix and an aluminium oxide hydroxide (AP200/19) nanostructured solid support. In order to evaluate the sensing layers and their compatibilities with the supports in accordance with the features of the complex, the Stern-Volmer constants, luminescence quantum yields and response times were determined by the multifrequency phase modulation method using luminescence intensity and lifetime measurements. These sensing films displayed higher sensitivity than many classical layers based on Ir(III).

Mercury is one of the most hazardous pollutants for the environment due to its high toxicity and bioaccumulation. Therefore, its early detection could avoid serious environmental problems. Although there are many examples of mercury sensing probes in solution, there are just a few examples of this kind of probes immobilized into solid supports. This is the goal of the **second section**: the development of novel mercury sensing materials based on the immobilization of a spirocyclic phenylthiosemicarbazide rhodamine 6G derivative (called FC1), which due to its polarity, it was not able to be incorporated into any of the commercially available polymer. In order to solve this problem, two experimental works were performed that are shown in chapters 3 and 4.

Chapter 3 describes the development of a new sensing film with a high selectivity towards mercury. It is based on the immobilization of the above mentioned FC1 dye, into an affine polymeric support. For reach this goal, a new hydrophilic water-insoluble copolymer, poly(HEMA-co-MMA), was synthesized ensuring its chemical affinity with the dye. In this way leaching, aggregation or migration problems are avoided and permeability of the analyte towards dye is improved. The copolymer was synthesized by reverse atom transfer radical polymerization (ATRP). In addition, instrumental and experimental conditions able to change the sensitivity of the sensing layer were optimized. Finally, the applicability of the sensing film was demonstrated by analysing Hg^{2+} in two real water samples (mineral and tap water).

Although the results were satisfactory, response time and sensitivity could be improved by using nanotechnology. Therefore, **Chapter 4** is focused on the development of a highly selective and sensitive nonwoven mat based on the encapsulation of FC1 into polymeric microfibres produced by electrospinning. The use of this technique allows the production of microfibre mats with very high specific surfaces, increasing the sensitivity and decreasing the response time. The

obtained mat is highly hydrophilic but insoluble in aqueous media as well as in nonpolar solvents. It has excellent mechanical properties: it is easily manipulated and it has high mechanical strength, high consistency and high flexibility. Furthermore, the encapsulated FC1 preserves its sensing ability, displaying intense turn-on fluorescence in the presence of mercury.

The **third section** is composed by one chapter, based on the preparation of membranes for the retention of halides. During water purification treatments, halides present in water are oxidized, leading to formation of disinfection by-products (DBPs) that can be highly toxic and hard to remove. Therefore, it would be very interesting to develop new membranes with halides retention capacities in an easy and inexpensive way, before disinfection process. This is the goal of **Chapter 5**, based on the synthesis of cellulose acetate-chitosan blend membranes loaded with silver, for halides removing from the media by halide precipitation on the membrane surface. These membranes have been chemically and texturally characterized, and their applicability for removing halides has been demonstrated in two real water samples.

Introducción

1. Descripción y clasificación general de las reacciones de polimerización

1.1 Monómeros y polímeros, conceptos básicos

El término *polímero* engloba una extensa variedad de materiales macromoleculares, tanto naturales como sintéticos, muchos de los cuales han sido y siguen siendo de gran utilidad en nuestra sociedad. Por citar solo unos pocos ejemplos, encontramos sustancias tan conocidas como la celulosa, el almidón, las proteínas, las pieles, los cauchos, los adhesivos, etc. Además, tanto a nivel estructural (fibras de proteínas que forman los músculos, o celulosa en el esqueleto vegetal), como bioquímico (enzimas y proteínas encargadas de catalizar las reacciones bioquímicas); todos los seres vivos están formados en un alto porcentaje por polímeros, denominados en este caso *biopolímeros*.

Una macromolécula de polímero está formada por la unión covalente de moléculas más pequeñas denominadas *monómeros*. Si todos los monómeros que forman parte de la cadena son idénticos, la macromolécula se denomina *homopolímero*; si está formada por dos o más tipos diferentes de unidades monoméricas, recibe el nombre de *copolímero*.

La longitud de la cadena de un polímero viene dada por el número de unidades que se repiten a lo largo de la cadena, es decir, por su *grado de polimerización*. Teóricamente, el peso molecular de un polímero es simplemente el peso molecular de la unidad repetitiva por su grado de polimerización.

Un concepto fundamental al hablar de polímeros es el de *funcionalidad*, que está asociado a la capacidad de reacción de los monómeros y se puede definir como la cantidad de sitios reactivos que esa molécula pone en juego en una determinada reacción de polimerización. Estos grupos reactivos son, generalmente, los grupos funcionales del monómero, así por ejemplo, el doble enlace de las olefinas se considera como una funcionalidad igual a 2, y

en este caso, se obtienen polímeros lineales en la reacción de polimerización. Tal es el caso de polímeros como el polietileno, el polipropileno o el policloruro de vinilo, entre otros. Los polímeros de estas características topológicas son materiales *termoplásticos*, esto es, se reblandecen o funden por acción del calor debido a que las interacciones entre cadenas son de naturaleza no covalente, lo que permite moldearlos en formas concretas que se estabilizan al enfriarse. Además es posible volver a reblandecerlos y moldearlos con formas diferentes, por lo que son reciclables. La popularidad de estos termoplásticos hizo que se vulgarizara el término *plástico* como vocablo genérico para describir a la mayoría de los polímeros.

En otros casos, cuando la funcionalidad es superior a 2, la reacción de polimerización puede generar cadenas más o menos cortas, en forma de ramas a lo largo de una cadena principal. Estas ramificaciones laterales pueden unir diferentes cadenas principales de polímero, generando una estructura reticulada que da lugar a polímeros entrecruzados denominados *termoestables*. Estos materiales son rígidos, insolubles y no funden con la temperatura sino que arden, debido al elevado número de interacciones covalentes entre las cadenas principales.

Otro concepto importante es el *peso molecular de un polímero*, que no adquiere un valor único como en los compuestos químicos convencionales, sino que viene dado por una distribución de valores alrededor de un parámetro que es el más probable, dependiendo de la concentración de monómeros, la funcionalidad y las condiciones de reacción¹.

Por lo tanto, en el contexto de los polímeros se habla de pesos moleculares promedio, y se pueden calcular de diferentes maneras, teniendo cada uno su propio valor. La distribución de peso molecular, en la mayoría de los casos, presenta una forma de campana de Gauss.

La forma más sencilla se basa en el cálculo del *peso molecular promedio en número* (M_n), y es el peso total de todas las moléculas poliméricas contenidas en una muestra, dividido por el número total de moléculas poliméricas en dicha muestra; es por tanto un promedio calculado sobre el número de moléculas.

$$\overline{M}_n = \frac{w_t}{\sum N_i}$$

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

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

$$w_t = \sum N_i \cdot M_i$$

donde M_i es el peso molecular de la especie i ; el peso molecular promedio en número sería:

$$\overline{M}_n = \frac{\sum N_i \cdot M_i}{\sum N_i}$$

Otra forma de cálculo que acerca el valor del peso molecular a parámetros más reales, es la que considera la fracción de peso de cada especie existente. De esta manera se obtiene el valor del *peso molecular promedio en peso* (M_w), basado en el hecho de que las moléculas

más grandes contienen una cantidad mayor de la masa total de la muestra polimérica que las moléculas pequeñas. Por lo tanto el peso molecular promedio en peso puede expresarse

$$\overline{M}_w = \frac{\sum N_i \cdot M_i^2}{\sum N_i \cdot M_i}$$

Debido a que el peso molecular másico es siempre mayor que el numérico, el cociente $\overline{M}_w/\overline{M}_n$ resulta en un valor que siempre es mayor que 1, y se define como el *índice de polidispersidad* de un polímero. En el caso ideal de que el cociente resultara igual a la unidad, supondría que todas las cadenas poliméricas tienen el mismo peso estadístico, y por tanto que todas las moléculas tienen el mismo peso molecular. Este sería el caso de un polímero monodisperso; un ideal de estudio no obtenido en la práctica. Se pueden forzar las condiciones para acercarse lo máximo posible a esa condición, pero nunca se llegará a ese límite con los métodos convencionales de síntesis utilizados hoy en día.

1.2 Copolímeros

Como se ha comentado en el apartado anterior, cuando en una polimerización se hacen reaccionar dos o más monómeros distintos, la macromolécula resultante se denomina *copolímero*. Sus unidades estructurales, procedentes de los monómeros utilizados, se pueden colocar en orden distinto a lo largo de la cadena polimérica, obteniéndose así distintos tipos de copolímeros (véase la Figura 1):

- Copolímeros al azar*: Cuando la introducción de los dos tipos de monómeros dentro de la cadena sucede totalmente al azar.
- Copolímeros alternantes*: En este caso la alternancia en la distribución de los monómeros a lo largo de la cadena es totalmente alternante.
- Copolímero de bloque*: En los copolímeros de bloque las unidades de monómero forman bloques, ya sean predominantemente de un tipo u otro.
- Copolímero de injerto*: Esto ocurre cuando el polímero de bloque está ramificado, siendo la unidad estructural de la cadena principal de un tipo de monómero y la ramificación del otro tipo.

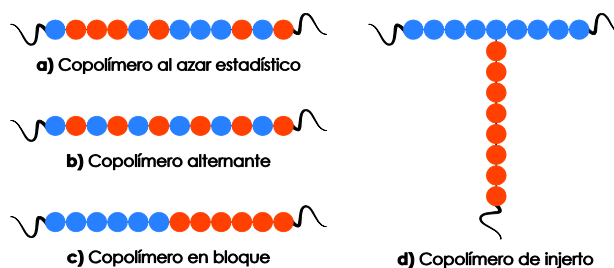


Figura 1. Algunos tipos de copolímero en función de su disposición.

1.3 Clasificación histórica de reacciones de polimerización

Desde un punto de vista histórico, los polímeros se clasificaron inicialmente en dos grandes familias que atendían a los dos grandes métodos introducidos en las primeras décadas de desarrollo de estos materiales. En ambos tuvo mucho que ver la labor de Wallace Carothers, quien propuso que las reacciones de formación de polímeros podrían clasificarse en base a las diferencias de composición entre el polímero sintetizado y el monómero o monómeros de partida. Así, se distinguían dos grandes familias:

- a) *Polimerizaciones por condensación de monómeros multifuncionales*: los polímeros de condensación son aquellos que han sido generados a partir de monómeros polifuncionales mediante sucesivas reacciones de condensación con eliminación de pequeñas moléculas, como por ejemplo agua. En este tipo de polímeros la composición de la unidad de repetición difiere de la de los monómeros de reacción por el hecho de perder una molécula durante la reacción.
- b) *Polimerizaciones por adición a un doble enlace*: estos polímeros se forman sin la pérdida de ninguna molécula pequeña, a diferencia de los anteriores. Para que tengan lugar este tipo de polimerizaciones, se precisa la existencia de un doble enlace $C=C$ en el monómero. En este tipo de polimerizaciones la reacción comenzará por el ataque de algún iniciador a uno de los carbonos del monómero, provocando la ruptura del doble enlace y dando lugar en el otro carbono a la aparición de un radical, de un catión o de un anión, que es por donde continúa la reacción al facilitarse su ataque a otra molécula de monómero. A diferencia de los polímeros de condensación, la unidad de repetición en este tipo de polímeros tiene la misma composición que los monómeros de partida.

Pronto se constató el hecho de que determinados monómeros, al polimerizar, no producían moléculas pequeñas como subproductos de condensación, mientras que las características cinéticas de determinados procesos de polimerización por adición tenían más que ver con las policondensaciones que con las poliadiciones.

1.4 Clasificación actual y descripción general de reacciones de polimerización

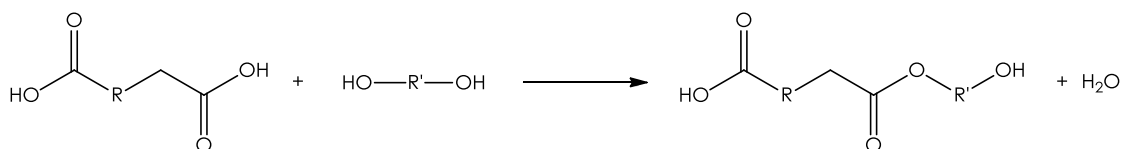
Actualmente, las reacciones de polimerización se clasifican en función de las condiciones cinéticas, que dividen a estas reacciones en dos grandes bloques²: polimerización por etapas y polimerización en cadena.

1.4.1 Polimerización por etapas

En la polimerización por etapas todos los monómeros pueden participar estadísticamente en la formación de las futuras cadenas desde el principio. Así, el tamaño de las

cadena va creciendo lentamente con el tiempo y la concentración de los monómeros de partida cae prácticamente a cero a los pocos instantes de la reacción. En este bloque pueden incluirse muchas policondensaciones y algunas reacciones que implican el concurso de compuestos cíclicos.

Las reacciones más representativas correspondientes a las polimerizaciones por etapas, son aquellas en las que tienen lugar de forma repetida, clásicos procesos de condensación entre dos grupos funcionales distintos, para dar lugar a otro nuevo, con eliminación de moléculas pequeñas como el agua. La condición fundamental para producir polímeros es que los reactivos (monómeros) deben contener una funcionalidad superior a uno. De esta forma, una reacción clásica como la de un ácido y un alcohol para producir un éster y agua pueden generar un polímero si ambos son difuncionales, ya que la nueva entidad generada en el primer paso de la reacción, además de contener un grupo éster, mantiene una bifuncionalidad en sus extremos que le permite continuar reaccionando con otros grupos de diferente naturaleza para seguir generando nuevos grupos éster en cadenas progresivamente más largas.



Entre los procesos de policondensación más habituales destacan las reacciones entre ácidos carboxílicos de funcionalidad igual o superior a dos, aminas di- o multifuncionales para producir poliamidas y las reacciones entre alcoholes e isocianatos para dar lugar a poliuretanos.

1.4.2 Polimerización en cadena

Una de las características principales de la polimerización en cadena o de adición es que se desarrolla mediante la adición continua de monómero a una cadena en crecimiento que contiene un extremo activado. A diferencia de la polimerización por etapas, cada paso es dependiente del anterior. La polimerización en cadena generalmente se produce como resultado de la apertura del doble enlace de muchos compuestos monoméricos, como los derivados vinílicos o acrílicos.

La ruptura del doble enlace está condicionada principalmente por la acción de un iniciador, que activa la densidad electrónica del monómero de tal forma que, dependiendo de la diferencia de electronegatividad de los átomos que forman el doble enlace, la rotura puede ser heterolítica u homolítica, dando lugar a iones o radicales libres respectivamente. Por tanto, la polimerización en cadena se puede subdividir en polimerización iónica y polimerización radical.

En este apartado se realizará una breve descripción de la polimerización iónica y de la polimerización radical, para posteriormente desarrollar con mayor detalle esta última.

1.4.2.1 Polimerización iónica

La polimerización iónica se basa en una ruptura heterolítica del doble enlace de los monómeros olefínicos, por acción de un iniciador que ataca de forma adecuada la densidad electrónica del monómero. Dependiendo del carácter electrófilo o nucleófilo del iniciador, se genera una especie catiónica o aniónica que condiciona el posterior desarrollo de la cadena en crecimiento. Por tanto, la polimerización iónica se puede subdividir a su vez en catiónica o aniónica.

1.4.2.1.1 Polimerización aniónica

La polimerización aniónica puede ser iniciada con bases como NaOH, KOH y KNH_2 , o por compuestos organometálicos entre los que destacan los alquil litio, y de manera especial el $n\text{-BuLi}$ y el sec-BuLi . El producto de esta adición es otro anión que puede adicionar nuevos monómeros en un clásico proceso de propagación. Sin embargo, no todas las olefinas son susceptibles de sufrir una polimerización aniónica, el monómero debe tener una estructura cuya densidad electrónica del doble enlace se mueva con facilidad, o que dicho enlace esté parcialmente polarizado. Monómeros como el estireno y sus derivados, las piridinas o los dienos, están entre los monómeros que cumplen la primera condición. Otros, como los acrilatos, metacrilatos o acrilonitrilos tienen sustituyentes próximos al doble enlace que provocan la adecuada polarización.

La característica más importante de muchas polimerizaciones aniónicas es la ausencia de un mecanismo inherente de terminación: Las especies activas generadas en los primeros instantes del proceso, por reacción del iniciador con el monómero, van adicionando monómero hasta que este desaparece, sin embargo esa actividad se mantiene durante un cierto tiempo, por lo que si se adiciona nuevo monómero la polimerización se reinicia.

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

1.4.2.1.2 Polimerización catiónica

En la polimerización catiónica, bastante parecida a la polimerización aniónica, un catión iniciador se une a una olefina, a un ciclo o a otro monómero, compensando la carga con un contraión colocado en sus proximidades. El catión resultante adiciona más monómero hasta que la reacción se termina. Sin embargo el mecanismo de terminación en la polimerización catiónica tiene lugar mediante una reacción entre el contraión y la cadena en crecimiento, terminando así su vida activa. Al final del proceso se regenera el iniciador, que puede volver a iniciar una nueva cadena. Por lo tanto, el conjunto de secuencias es similar a lo que en las reacciones radicales se denomina una *transferencia de cadena*. Tal proceso de

terminación es el factor dominante de una polimerización catiónica. Debe ser cuidadosamente controlado para impedir que el agua u otras impurezas generen procesos no deseados. Las reacciones, además solo transcurren adecuadamente a bajas temperaturas (-70 °C).

El iniciador catiónico más común es un protón que, aunque no puede existir libremente en un medio condensado, puede estar unido a compuestos con pares de electrones libres. Aunque también se suelen emplear ácidos de Lewis como AlCl_3 , BF_3 o ZnCl_2 .

1.4.2.2 Polimerización radical

Casi todos los compuestos que contienen un doble enlace pueden ser polimerizados o copolimerizados por vía radical. Las únicas condiciones que deben cumplir son la capacidad termodinámica de polimerizar y la posibilidad cinética de hacerlo, en parámetros que hagan rentable el proceso. La primera condición suele cumplirse en casi todos los casos, al ser la apertura del doble enlace y posterior concatenación de unidades un proceso espontáneo. La condición cinética, sin embargo, es algo más restrictiva y elimina ciertos monómeros de las vías comerciales de polimerización radical.

La polimerización radical tiene lugar mediante un proceso de reacción en cadena, siguiendo una serie de etapas que se irán explicando posteriormente. En la etapa inicial o iniciación se necesita el concurso de alguna molécula capaz de generar radicales. Muchos iniciadores de la polimerización radical son compuestos que tienen algún enlace fácil de romper homolíticamente por la acción de luz o calor.

De todos los procesos de polimerización en cadena, la polimerización radical es la más importante. Las razones fundamentales de este éxito descansan en la posibilidad de realizar las polimerizaciones a temperaturas bajas (entre ambiente y 100 °C) y a que los requerimientos de pureza necesarios, tanto de los monómeros como de los iniciadores, para que la reacción se desarrolle eficientemente, son mínimos. También es importante recalcar que la polimerización radical es el método más versátil para preparar copolímeros, al poner más de un monómero a polimerizar en el mismo medio.

Hasta hace poco tiempo, sin embargo, la polimerización radical sufría de una serie de limitaciones que le impedían competir con las polimerizaciones aniónica o catiónica en la preparación de determinados materiales. Así las polimerizaciones aniónicas y catiónicas, permitían sintetizar polímeros y copolímeros de estructuras bien definidas y con pesos moleculares de muy baja polidispersidad, como por ejemplo copolímeros de bloque o injerto. Las reacciones de polimerización radical convencionales no son capaces de generar esos materiales debido a una serie de reacciones que compiten con el propio crecimiento de la cadena, como son las reacciones de terminación o transferencia de cadena^{1a, 2}. Sin embargo recientemente se han desarrollado una serie de procesos por vía radical, que permiten controlar el crecimiento de las cadenas poliméricas, compitiendo con los productos derivados de las

polimerizaciones aniónicas y catiónicas mediante procesos mucho menos complicados. Es la denominada *polimerización radical controlada (CRP)*, que se verá en la sección 1.7 (página 36).

1.5 Formas de llevar a cabo la polimerización

Las reacciones de formación de polímeros, tanto lineales como entrecruzados, pueden llevarse a cabo de diferentes formas, tanto en fase homogénea como heterogénea. Las más habituales son:

1.5.1 Polimerización en masa

Es una técnica de polimerización en fase homogénea y consiste en mezclar todos los componentes (monómeros funcionales, entrecruzador e iniciador de radicales), que deben ser miscibles entre sí durante toda la polimerización, en ausencia de disolvente. Esta polimerización es altamente exotérmica, presentándose dificultades en el control de la temperatura y de la agitación del medio, que rápidamente se vuelve viscoso desde el inicio de la polimerización, por lo que su aplicabilidad se reduce a los monómeros que son térmicamente estables. Sin embargo, es una técnica muy económica, además de producir polímeros con un alto grado de pureza, obteniéndose productos libres de contaminantes y de alta claridad óptica.

1.5.2 Polimerización en disolución

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

Así, en el caso de polímeros lineales, el disolvente se utiliza para evitar la separación de fases, ya que existen polímeros que son inmiscibles en sus propios monómeros (por ejemplo policloruro de vinilo y poliacrilonitrilo); y en el caso de polímeros entrecruzados, el disolvente tiene dos funciones muy importantes. La primera es solvatar las cadenas poliméricas en crecimiento en todo momento, para que puedan crecer en todas las direcciones del espacio hasta conectar unas con otras formando una red tridimensional, homogénea y entrecruzada con un determinado tamaño de poro. Esta red está compuesta por una única macromolécula de peso molecular infinito, donde la fracción sol* es mínima, y en la mayoría de los casos nula.

La segunda función del disolvente es mantener separadas en mayor o menor medida, a las cadenas poliméricas durante su crecimiento. Esta separación es la que da lugar a las

* Restos de pequeñas cadenas poliméricas que no se han incorporado durante la polimerización a la red tridimensional (también denominada gel), y que pueden ser eliminadas por lavado del material.

propiedades porosas (tipo y tamaño de poro) del material y depende del tipo, cantidad, tamaño y propiedades físico-químicas de los disolventes utilizados durante la síntesis.

Además el disolvente o mezcla de disolventes usados influye en las características morfológicas y estructurales de los materiales poliméricos finales, ya que son las interacciones entre las cadenas poliméricas en crecimiento y las moléculas de disolvente, las que condicionan que la polimerización transcurra en todo momento por vía homogénea, o en un momento determinado continúe su camino de forma heterogénea.

Debido a esto se pueden contemplar tres casos para la obtención de **polímeros lineales**:

Caso (1): que las interacciones *polímero-disolvente* sean altas durante toda la polimerización. Si esto ocurre, se obtiene una disolución homogénea y transparente de un polímero, con una distribución de pesos moleculares determinada, disuelto en el disolvente utilizado para su síntesis.

Caso (2): que las interacciones *polímero-disolvente* no sean adecuadas para la solvatación de las cadenas poliméricas durante toda la polimerización. Entonces, en un momento determinado de la polimerización y dependiendo de la fortaleza de las interacciones *polímero-disolvente*, se produce la precipitación (este es el fundamento de la polimerización por precipitación, que será descrita a continuación, en la sección 1.5.3), dando lugar a suspensiones de materiales poliméricos con distintos tamaños y morfologías: partículas esféricas, agregados, etc., formados por agregación de cadenas poliméricas lineales unidas por fuerzas no covalentes (Van der Waals, polares, puentes de hidrógeno, etc.). Una vez producida la precipitación, la polimerización transcurre de forma heterogénea hasta el final. Estos polímeros, al no estar entrecruzados, una vez precipitados y secos son susceptibles de ser redisoluertos, siempre y cuando se usen los disolventes o mezclas de disolventes adecuados.

Caso (3): situación intermedia entre los casos (1) y (2). Se produce solamente en la formación de copolímeros, cuando la composición química de las cadenas poliméricas no se mantiene constante a lo largo de toda la polimerización (reactividades monoméricas muy diferentes), llegando a producirse cadenas con distintas composiciones monoméricas y, por lo tanto con distintas propiedades químico-físicas; debido a esto, unas cadenas poliméricas precipitan y otras quedan en disolución.

En el caso de **polímeros entrecruzados** las implicaciones del disolvente pueden dar lugar también a dos casos extremos y a toda una gama de casos intermedios, pudiendo producirse en un mismo sistema polimérico situaciones que den lugar a mezclas de todos los posibles materiales existentes entre los dos extremos:

Caso (1): las interacciones *polímero-disolvente* son adecuadas durante toda la polimerización. Así, las cadenas poliméricas son adecuadamente solvatadas y crecen

extendidas en todas las direcciones del espacio hasta conectar unas con otras, formando al final de la polimerización una red tridimensional transparente y homogénea.

Caso (2): *las interacciones polímero-disolvente son muy bajas, causando la separación de fases y precipitación, antes de que llegue a producirse la interconexión entre cadenas.* Debido a que en este caso las cadenas poliméricas se encuentran totalmente separadas en el momento de producirse la separación de fases y la precipitación, siempre se obtienen suspensiones de materiales poliméricos entrecruzados (completamente insolubles en cualquier disolvente), con distintos tamaños y morfologías (partículas esféricas, microgeles, agregados, etc.).

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

1.5.3 Polimerización por precipitación

En la polimerización por precipitación suelen utilizarse concentraciones monoméricas muy diluidas, no más del 3% en peso de monómeros con respecto al peso de disolvente, evitando así la posible gelificación producida por una elevada concentración de cadenas poliméricas en crecimiento. El disolvente debe permitir la solubilización inicial de todos los componentes de la polimerización y de las cadenas poliméricas hasta un determinado tamaño o, lo que es lo mismo, un determinado peso molecular. De esta forma, cuando el polímero en crecimiento alcanza dicho peso molecular, se produce una separación de fases que da lugar a la precipitación, originando partículas de diferentes tamaños y morfologías. Posteriormente, la polimerización continúa en la interfase partícula-disolvente atendiendo a fenómenos de polimerización heterogénea.

Los materiales que pueden obtenerse principalmente al producirse la precipitación son: microgeles, suspensiones de micro y nanopartículas esféricas y monodispersas, y micropartículas producidas por fenómenos de homocoagulación (agregación de un pequeño número de nanopartículas para producir una micropartícula).

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

1.5.4 Polimerización por dispersión

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

1.5.5 Polimerización en suspensión

Se produce combinando dos fases a priori inmiscibles; una de ellas se denomina fase discontinua y la otra fase continua. Cuando la fase discontinua es hidrofóbica y la fase continua hidrofílica (normalmente agua), la suspensión se denomina *normal* y cuando la fase discontinua es hidrofílica y la fase continua es hidrofóbica se denomina *inversa*. La fase discontinua está compuesta por la mezcla de polimerización y siempre se encuentra en una proporción mucho menor que la fase continua; normalmente entre el 2% y el 20% con respecto al volumen total. Así, mediante el uso de agentes químicos (surfactantes) y aplicando energía, la fase discontinua se distribuye en forma de pequeñas gotículas en la fase continua. Estas gotículas se mantienen separadas durante la polimerización mediante el uso de agitación y aditivos.

La polimerización en suspensión se distingue del resto de polimerizaciones en fase heterogénea, en que *el iniciador de radicales es soluble en la fase discontinua y no en la fase continua*. Debido a ello, la polimerización se produce en las gotas de fase discontinua, que se convierten así en partículas de polímero a medida que el proceso avanza.

1.5.6 Polimerización en emulsión

Una emulsión es una suspensión coloidal estable, formada por la mezcla de dos líquidos inmiscibles de manera más o menos homogénea. Los polímeros obtenidos mediante polimerización en emulsión se conocen también como látex y son dispersiones coloidales de partículas muy pequeñas de polímero en un medio continuo (normalmente agua).

Las emulsiones pueden llevarse a cabo de forma *normal* (*oil/water, O/W*) o de forma *inversa* (*water/oil, W/O*), donde el aceite es la fase continua o externa y el agua es la fase interna o dispersa.

La polimerización en emulsión es una polimerización heterogénea en medio líquido, donde el iniciador de radicales es soluble en agua, mientras que el monómero es parcialmente soluble. Consta de agua, la mezcla monomérica, un iniciador de radicales, un emulsionante o surfactante y, en ciertas ocasiones, aditivos para el control de la viscosidad. El agua que actúa como fase continua se encuentra en cantidades del orden del 50-70% de la masa total del sistema.

Los monómeros pueden presentar diferentes solubilidades en agua, lo que conlleva a diferentes mecanismos o comportamientos en el proceso de iniciación o formación de las partículas de polímero. Como iniciadores se pueden utilizar todos aquellos que presenten una adecuada solubilidad. Por último, el emulsionante tiene la función de formar micelas (Agregados de 50 a 100 moléculas de un coloide con sus extremos hidrofílicos orientados hacia la fase acuosa, creando en su interior un medio hidrocarbonado), donde queda contenido el monómero.

Desde un punto de vista cualitativo, al añadir el emulsionante al agua, en una concentración entre 0.1 y 3% en peso respecto a la masa de agua, y en función de la concentración micelar crítica (cmc) del emulsionante, una fracción de este queda disuelto en el agua (fase continua), mientras que el resto se agrega formando micelas (fase dispersa). El número y tamaño de las mismas depende de la cantidad de emulsionante. Cuando posteriormente se añade el monómero (generalmente poco soluble en agua), una fracción muy pequeña se disuelve, mientras que otra fracción se introduce en las micelas debido a su ambiente químico interior.

La concentración de monómero en el interior de las micelas varía entre 4 y 6 mol/L, siendo mayor para aquellos monómeros que tienen menor solubilidad en agua. Por último, la mayor parte del monómero se dispersa en gotas de monómero, cuyo tamaño depende de la velocidad de agitación. Dichas gotas se estabilizan mediante la absorción en su superficie de moléculas de emulsionante.

La adición del iniciador soluble en agua supone el comienzo del proceso. Los radicales producidos por el iniciador reaccionan con el monómero disuelto en la fase acuosa formando

radicales oligoméricos de diverso tamaño que, debido a su carácter hidrofóbico, pueden penetrar en la micela, propagándose con el monómero que se encuentra en su interior (nucleación micelar), o también alcanzar la longitud de cadena adecuada para que precipiten². Estas micelas precipitadas agregan o absorben moléculas de surfactante, formando una partícula dispersa donde también se absorbe monómero (nucleación homogénea).

Los radicales oligoméricos que han penetrado en estas partículas precursoras se propagan rápidamente con el monómero, haciendo crecer el tamaño de las mismas. Según avanza el proceso las pre-partículas crecen hasta convertirse en partículas. La formación o nucleación de partículas termina cuando hay un número suficiente de ellas con el tamaño adecuado para capturar todos los radicales oligoméricos producidos en la fase acuosa.

La formación o nucleación de las partículas provoca la desaparición de las micelas no activadas, que suministran las moléculas de surfactante necesarias para la adecuada estabilidad de las partículas que se han formado.

El resultado final, sea cual fuere el mecanismo de nucleación, es la obtención de un número constante de partículas que contienen una determinada relación de saturación monómero-polímero, relación que varía en función de la naturaleza de estos. Al final de este periodo de nucleación, el sistema consta de partículas de polímero, gotas de monómero e iniciador. Este periodo de nucleación suele ser rápido y generalmente no sobrepasa el 10% de la conversión.

Una vez terminada la nucleación, las partículas de polímero continúan propagándose. Este crecimiento exige la estabilización correspondiente mediante la migración de las moléculas de emulsionante que restan en la fase acuosa y el mantenimiento del nivel de saturación del monómero, a medida que este se consume.

El monómero migra a través de la fase acuosa desde las gotas de monómero, que actúan como depósito, hasta las partículas. Este proceso continuo hace que, a medida que las partículas crecen, las gotas de monómero se hagan cada vez más pequeñas hasta que todo el monómero es absorbido por las partículas.

Durante este periodo, el número de partículas se mantiene constante así como la relación monómero-polímero en el interior de las mismas. En este intervalo, el sistema consta de la fase acuosa con el iniciador, partículas de polímero y gotas de monómero.

Por último, la polimerización sigue progresando en las partículas que han absorbido todo el monómero de las gotas, quedando una pequeña cantidad de monómero disuelto en la fase acuosa en función de la solubilidad del monómero. Alcanzado este punto, solo queda fase acuosa y partículas de polímero, en las que la polimerización progresa más lentamente a medida que desaparece todo el monómero contenido en las mismas. El sistema alcanza en general y sin dificultad el 100% de conversión obteniéndose un látex de partículas de polímero.

1.5.7 Polimerización en miniemulsión

Una miniemulsión es un sistema donde, mediante un aporte alto de energía, se crean pequeñas gotas con una alta estabilidad en una fase continua. La estabilidad de las gotas se logra por la adición de un agente que se disuelve en la fase discontinua, pero que es totalmente insoluble en la fase continua. Al principio de la homogeneización la polidispersidad de las gotas es bastante alta, pero mediante constantes procesos de fusión y fisión de las gotas, inducidos por el aporte de energía (normalmente con un ultrasonidos de alta frecuencia), la polidispersidad decrece hasta que la miniemulsión alcanza su estado termodinámico más estable.

Debido a sus características*, la miniemulsión es una potente herramienta en el diseño y síntesis de nanopartículas con diferentes características químicas y físicas, así como en el diseño de nanopartículas híbridas.

1.5.8 Polimerización en microemulsión

Este tipo de polimerización se basa en llevar a cabo la polimerización en el seno de una microemulsión, que es una dispersión transparente, termodinámicamente estable e isotrópica. La microemulsión es un proceso espontáneo que no necesita la aplicación de energía y su estabilidad termodinámica se alcanza por la baja tensión superficial (prácticamente nula) de los sistemas, lo cual hace que gane la contribución entrópica, produciéndose una reducción en el tamaño de gota³.

Las microemulsiones necesitan del uso de una gran cantidad de surfactante (10 - 15% en peso) para conseguir su estabilidad termodinámica, mientras que el peso de fase discontinua no excede del 10 o 15% en microemulsiones globulares. Normalmente y como consecuencia de la necesidad de una monocapa completamente cerrada de surfactante, existen pocos ejemplos de microemulsiones formadas por un solo surfactante, utilizándose comúnmente co-surfactantes que suelen ser alcoholes de cadena corta. La composición más común suele ser un sistema ternario compuesto por un surfactante iónico, un co-surfactante disuelto en la fase continua y la fase discontinua. Las microemulsiones pueden ser, al igual que las emulsiones, *normales* (*oil/water, O/W*) o *inversas* (*water/oil, W/O*). Las distintas estructuras que se pueden formar, en función de las proporciones de componentes de la microemulsión, van desde estructuras finitas o discontinuas como partículas esféricas, vesículas o cilindros, hasta estructuras continuas como bicapas, cristales líquidos (cúbicos, hexagonales, etc.).

Las polimerizaciones en microemulsión se producen de forma rápida; entre 15 min y unas pocas horas. Bajo condiciones apropiadas, la polimerización en microemulsión puede producir látex transparentes y azulados formados por nanopartículas monodispersas con diámetros de

* La miniemulsión permite llegar al tamaño nanométrico con partículas monodispersas y altamente estables, que mantienen su independencia en el tiempo durante la polimerización.

partícula comprendidos entre 30 y 60 nm. Se ha encontrado experimentalmente que el tamaño de partícula en polimerizaciones en microemulsión O/W depende de los siguientes parámetros³:

- a) Relación surfactante/monómero. Cuanto mayor es la relación surfactante/monómero, menor es el tamaño de partícula.
- b) De la introducción de co-monómeros polares. Dependiendo del tipo y concentración de co-monómero polar, el tamaño de partícula y la polidispersidad pueden aumentar o disminuir.
- c) La concentración de iniciador. Un incremento en la concentración de iniciador normalmente produce un decrecimiento en el tamaño de partícula.
- d) La presencia de un entrecruzador puede producir una disminución del tamaño de partícula y de la polidispersidad.

En cuanto al mecanismo de la polimerización en microemulsión, numerosos estudios cinéticos tanto en polimerizaciones en microemulsión en O/W, como en W/O, han puesto de manifiesto un mecanismo similar a la polimerización en emulsión. Por lo tanto, la polimerización en microemulsión puede considerarse, al igual que la emulsión una polimerización heterogénea desde sus comienzos hasta el final de la polimerización con el mismo grado de complejidad en su tratamiento teórico.

1.6 Descripción general de la polimerización radical

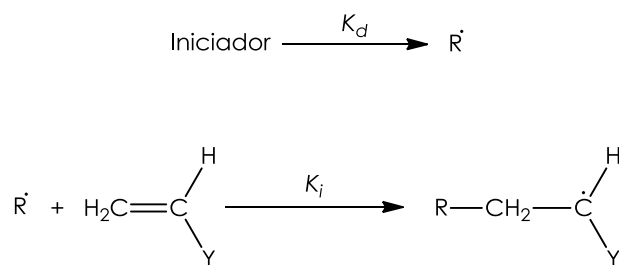
En las siguientes secciones, se tratará de forma más detallada y específica la *polimerización radical*, así como la *polimerización radical controlada*, debido al uso que se ha hecho de ellas en la parte experimental de esta memoria, para el diseño y síntesis de nuevos polímeros lineales.

1.6.1 Esquema cinético de la polimerización radical

El mecanismo básico de la *polimerización radical en fase homogénea* es un proceso en cadena que puede describirse mediante un esquema-resumen de las posibles etapas implicadas.

1.6.1.1 Iniciación:

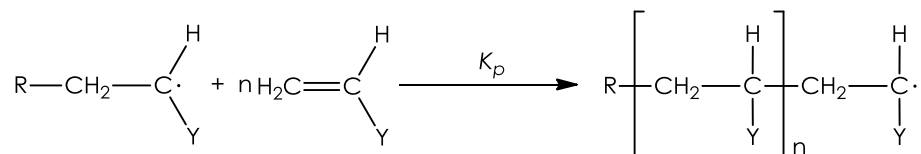
La iniciación consta de dos procesos. En el primero se generan una serie de radicales que, en una segunda etapa, pueden transferir su actividad al monómero mediante una adición al doble enlace, generando los radicales propagantes. Se han desarrollado una gran variedad de métodos para la producción de radicales primarios. Entre los más utilizados están la acción del calor (iniciación térmica), y la acción de la radiación UV-visible (iniciación fotoquímica).



Las sustancias que poseen enlaces con bajas energías de disociación son susceptibles de descomponerse térmicamente a velocidades razonables. Estas descomposiciones presentan una gran dependencia con la temperatura, de forma que su rango de aplicación se limita a un pequeño intervalo de temperatura. Entre los diversos iniciadores destacan la familia de los peróxidos y la familia de los azocompuestos; entre estos últimos, el azo-bis-isobutironitrilo (AIBN) es muy empleado debido a la ausencia de reacciones secundarias (típicas de muchos peróxidos).

1.6.1.2 Propagación:

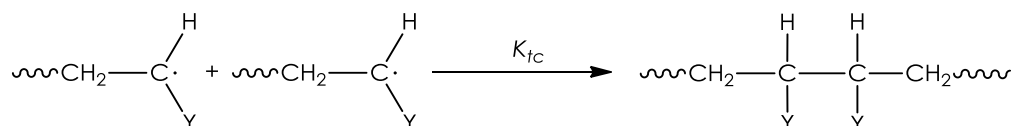
La propagación de cadena consiste en una secuencia de adiciones de extremos radicales al doble enlace de sucesivas unidades monoméricas. El esquema para la propagación, según el mecanismo de polimerización radical viene dado por:



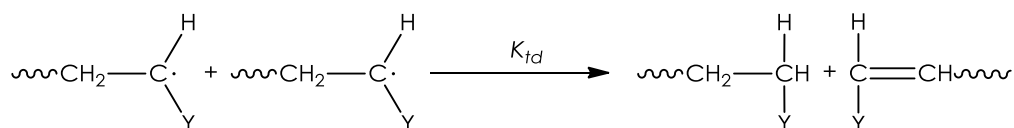
1.6.1.3 Terminación natural:

La terminación natural se basa en dos tipos de reacciones de terminación en las cuales se eliminan radicales para dar moléculas neutras y cuyos mecanismos cinéticos se pueden expresar como:

Terminación por combinación



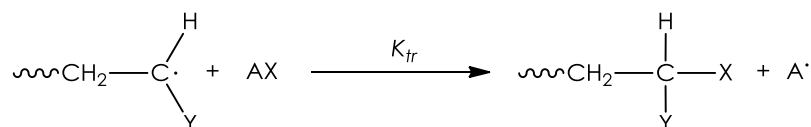
Terminación por desproporción



En general, la mayoría de los monómeros vinílicos terminan predominantemente por combinación, aunque siempre existe un mínimo porcentaje de desproporción.

1.6.1.4 Terminación por transferencia de cadena:

La terminación por transferencia de cadena se basa en una reacción de terminación en la que uno de los productos de la reacción sigue siendo un radical. El mecanismo cinético de este proceso se puede expresar como:



donde AX puede ser cualquier sustancia del medio capaz de transferir un átomo o grupo de átomos a las especies radicalarias propagantes. El nuevo radical puede iniciar una nueva cadena influenciando así la velocidad de reacción.

Un efecto importante de las reacciones de terminación en general es que afectan al peso molecular o distribución del peso molecular.

1.6.2 Copolimerización radical

La polimerización de mezclas apropiadas de monómeros permite la obtención de una gran variedad de copolímeros con diferentes topologías, funcionalidades y materiales híbridos con propiedades muy diversas^{1a, 2, 4} (ver Figura 2).

Mediante la polimerización radical convencional las topologías poliméricas que se pueden obtener con éxito son únicamente copolímeros estadísticos y alternantes. La obtención de las demás topologías requiere un mayor control de las condiciones de polimerización, por lo que hay que recurrir a las polimerizaciones radicales controladas (CRP).

La importancia de estas copolimerizaciones en cadena puede resumirse en dos aspectos fundamentales: en primer lugar, la copolimerización permite estudiar o comparar reactividades entre los diferentes monómeros; dependientes de sus estructuras químicas. En segundo lugar, el proceso de copolimerización permite la formación de nuevos tipos de polímeros que participan de las propiedades de los homopolímeros correspondientes. En función de la cantidad de cada monómero en la cadena polimérica, las propiedades del copolímero varían notablemente. Por tanto, un adecuado control del proceso puede permitir la síntesis de copolímeros con propiedades a medida, en función de la aplicación concreta deseada.

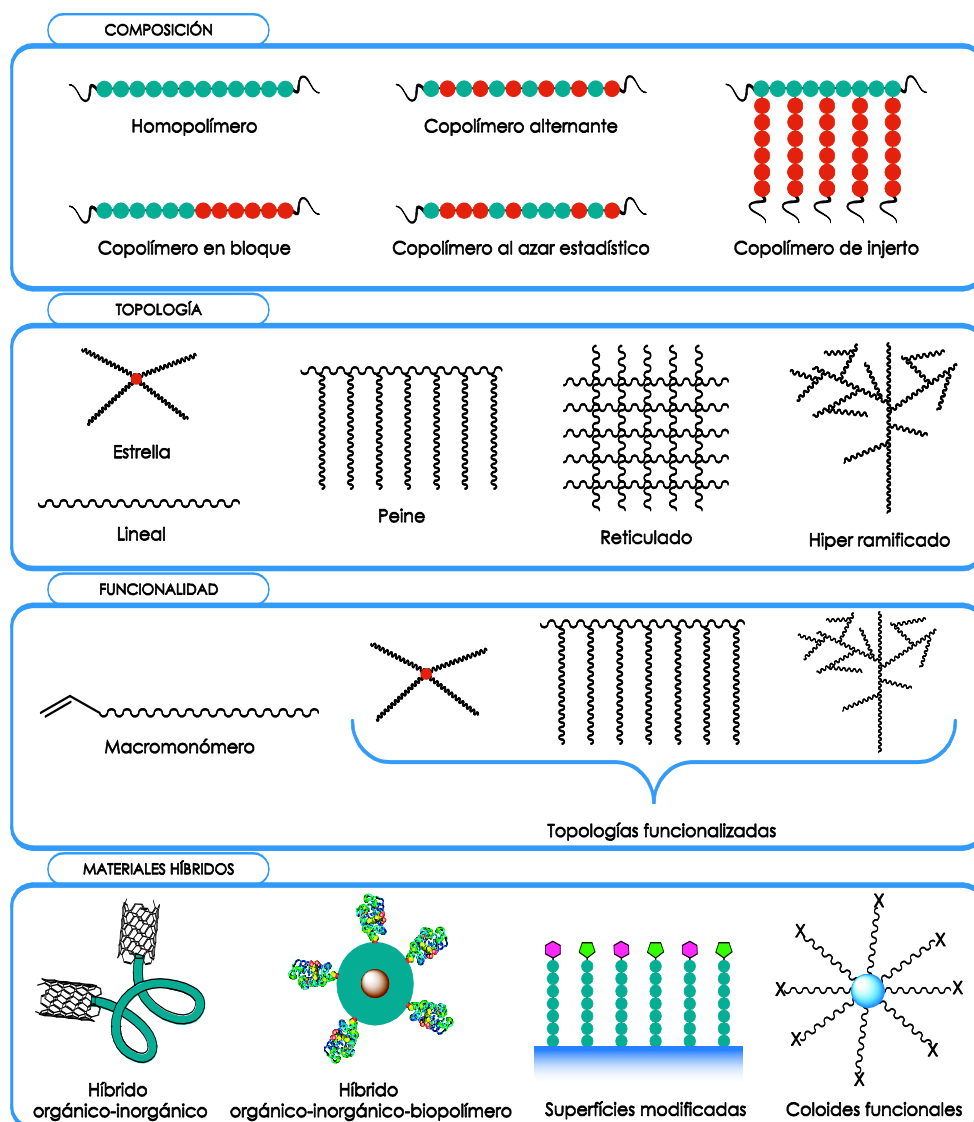


Figura 2. Estructuras polimerizables obtenidas mediante polimerización radical controlada (CRP).

1.7 Polimerización radical controlada (CRP)

1.7.1 Generalidades

En los últimos años ha habido un importante crecimiento en el desarrollo y conocimiento de la polimerización radical controlada. El origen de este rápido avance reside en la necesidad de producir, de forma accesible, estructuras complejas de polímeros para ser aplicados en diversos ámbitos donde se necesitan materiales poliméricos avanzados y adecuados para el diseño de nuevas aplicaciones. Para este fin se requieren copolímeros de bloque que contengan segmentos tanto rígidos como flexibles en una adecuada combinación, dando lugar al desarrollo de nuevos termoplásticos y elastómeros. También son importantes los copolímeros de bloque que contengan unidades hidrofílicas e hidrofóbicas, generando materiales que sean fácilmente accesibles al agua (hidrogeles), para aplicaciones médicas entre otros usos. La obtención de polímeros con grupos funcionales adecuados, puede resultar

muy interesante para unir moléculas especiales como fármacos, sensores, convertidores de energía, etc.

Para conseguir estos materiales tan especiales se necesita controlar adecuadamente el crecimiento de las cadenas durante la polimerización. Hasta hace poco tiempo, la única vía para sintetizar todas las arquitecturas poliméricas mencionadas en la Figura 2 eran las polimerizaciones aniónicas y catiónicas; un proceso difícil de llevar a cabo incluso en ambientes controlados como los laboratorios de investigación, debido sobre todo a las altas condiciones de pureza exigidas, al medio de polimerización y a las bajas temperaturas a las que se debe realizar el proceso².

Actualmente, existen muchos métodos para llevar a cabo las reacciones radicalarias controladas⁵. Todos ellos se basan en el establecimiento de un equilibrio químico rápido y dinámico entre una mínima cantidad de macrorradicales en crecimiento y una gran cantidad de especies inactivas; estas pueden ser muchos tipos de moléculas, dependiendo del tipo de polimerización; como por ejemplo haluros de alquilo en *polimerización radical por transferencia de átomo* (más conocida por sus siglas en inglés ATRP), o tioésteres en *polimerización por transferencia de cadena mediante adición-fragmentación reversible* (más conocida por sus siglas en inglés RAFT)⁶. El éxito de este tipo de polimerizaciones se debe al equilibrio químico que se establece entre los macrorradicales en crecimiento y las especies inactivas; pues hace que las etapas de terminación características en la polimerización convencional sean prácticamente nulas, y por tanto todas las cadenas poliméricas crecen simultáneamente, adicionando monómero durante todo el proceso de polimerización.

Las etapas de terminación en la polimerización radical son responsables de la polidispersidad en el peso molecular, y de la variación de composición monomérica entre las cadenas poliméricas en crecimiento. Esto se debe a que en el medio coexisten cadenas poliméricas con distinto grado de crecimiento; al producirse la terminación de una cadena, se forma otro radical que comienza una nueva cadena, hasta que se consuman todos los monómeros presentes en el medio.

En resumen, las etapas de terminación impiden que se pueda controlar adecuadamente la polimerización radical para el diseño de copolímeros con composiciones químicas, pesos moleculares y topologías deseadas. En la polimerización radical controlada todas las cadenas se inician simultáneamente y, bajo condiciones apropiadas, permanecen activas durante todo el curso de la reacción.

Por tanto, los cambios en la concentración monomérica instantánea, debidos a la desaparición de monómero por su incorporación en las cadenas poliméricas, se reflejan a lo largo de todas las cadenas, dando lugar al final de la polimerización a una elevada similitud en el peso molecular y en la composición química de todas las cadenas. De esta forma se obtienen copolímeros estadísticos, en gradiente o copolímeros de bloque, en función de los valores de las relaciones de reactividad de los monómeros participantes en la polimerización.

En esta memoria nos vamos a centrar en un tipo concreto de polimerización radical controlada, como es la polimerización radical por transferencia de átomo catalizada por metales, más conocida por sus siglas en inglés ATRP (Atom-transfer radical polymerization). Por ello en primer lugar se hará un análisis de sus aspectos mecanísticos y teóricos generales, sin entrar en detalles cinéticos y, posteriormente, se describirán las variantes de esta técnica y su uso en el diseño de polímeros y copolímeros.

1.7.2 Mecanismos en la polimerización radical por transferencia de átomo (ATRP)

En el proceso de ATRP^{5,7} participan, principalmente, un haluro de alquilo (R-X), un metal de transición (M^{n+}), y los monómeros formadores de cadena. El mecanismo básico implica la rotura homolítica del haluro de alquilo, R-X, debida a una transición electrónica entre el metal (M^{n+}) y el haluro, generando el correspondiente complejo metal-haluro con mayor estado de oxidación ($M^{n+1}-X$) y un radical alquilo R^{\bullet} , que adiciona monómero presente en el medio para formar una cadena polimérica. Este radical puede seguir propagándose por adición de monómero y terminar por acoplamiento o desproporción; o ser reversiblemente desactivado en el equilibrio por la especie $M^{n+1}-X$. En estos casos la terminación radical es muy baja o prácticamente nula debido a que, en algún momento, la cadena polimérica deja de crecer en virtud de un equilibrio que no es favorable a la propagación y que implica un proceso redox, desplazando el equilibrio hacia las especies inactivas y, por tanto, haciendo que la constante de activación sea mucho menor que la constante de desactivación ($k_{act} \ll k_{deact}$). De esta forma la especie propagante queda aletargada hasta que estadísticamente vuelve a formar una cadena terminada en un radical que, durante un cierto tiempo, vuelve a adicionar más monómero para posteriormente volver a formar el haluro. Por tanto, todas las cadenas se inician y crecen estadísticamente a la vez, consiguiéndose un control del peso molecular y una elevada similitud en la composición química de todas las cadenas, similares a los obtenidos en las polimerizaciones iónicas sin terminación. La Figura 3 muestra un esquema general del equilibrio que se forma en la ATRP.

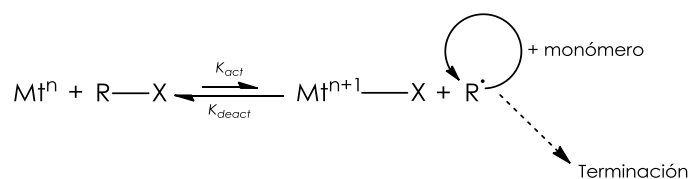


Figura 3. Equilibrio de la polimerización radical por transferencia de átomo (ATRP).

Resumiendo, el proceso está basado en una transferencia reversible de átomos de halógeno, entre un haluro de una cadena inactiva y un catalizador basado en un metal de transición.

La eficiencia de la ATRP⁷ se debe la presencia de un metal de transición, que puede expandir su esfera de coordinación y aumentar su número de oxidación; un ligando complejante y un contraión, que puede formar un enlace covalente o iónico con el centro del metal.

La ATRP se ha llevado a cabo con éxito haciendo uso de una gran variedad de metales como son: Ti, Mo, Re, Fe, Ru, Os, Rh, Co, Ni, Pd y Cu. Pero se ha demostrado que los complejos de cobre (normalmente los aminados), funcionan como catalizadores de forma más rápida y eficiente en estas reacciones. Los ligandos aminados más utilizados para formar los complejos de Cu utilizados en ATRP pueden ser bidentados como la bipyridina (bpy) y la fenantrolina (phen), tridentados como la dietilentriamina (DETA) y la terpiridina (tpy) y tetradentados como la tris-2-aminoetilamina (TREN), entre otros.

1.7.3 Metodologías en la ATRP

La Figura 4 muestra un esquema de las diferentes variantes de la ATRP.

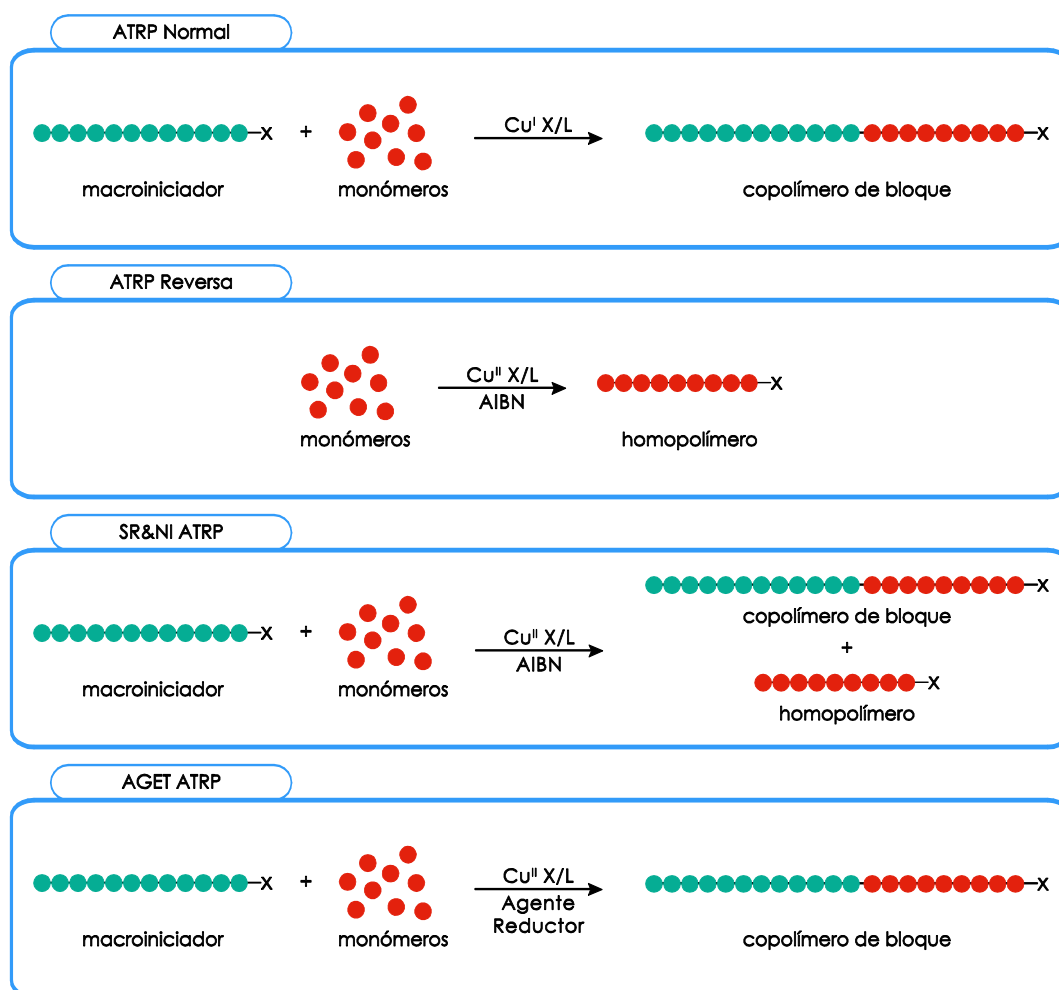


Figura 4. Esquema de las diferentes variantes de la ATRP.

1.7.3.1 ATRP normal

En esta técnica, los radicales se generan a partir de un haluro de alquilo en presencia de un metal de transición en su estado de oxidación más bajo, por ejemplo $\text{CuBr}(\text{dNbpy})_2$. Dentro de esta técnica se ha investigado abundantemente en el desarrollo de nuevos catalizadores más activos con dos fines: (1) utilizar menos cantidad de catalizador y (2)

polimerizar monómeros menos reactivos. Sin embargo, los sistemas catalíticos que son muy activos suelen ser menos estables y tienden a oxidarse, por lo que se hace necesaria una cuidadosa eliminación del oxígeno y otras especies oxidantes que pueda contener el medio.

1.7.3.2 ATRP reversa

Esta técnica puede ser adecuada para evitar el problema de oxidación que ocurre en la ATRP normal, ya que en este caso los iniciadores y el metal de transición en su más bajo estado de oxidación (por ejemplo Cu^{I}), son generados "*in situ*" desde un iniciador de radicales convencional (como puede ser AIBN) y el metal de transición en su estado de oxidación más alto (por ejemplo Cu^{II}). De esta manera el equilibrio entre las especies activas e inactivas, también se establece de forma eficiente. Con este método los componentes iniciales de la reacción son menos sensibles a oxígeno u otras especies oxidantes que puedan estar presentes en el medio. La ATRP reversa se ha utilizado con éxito en la síntesis de una gran cantidad de polímeros y copolímeros, tanto en masa, como en disolución o en emulsión.

1.7.3.3 ATRP reversa simultánea e iniciación normal (SR&NI)

En contraste con la ATRP reversa, esta técnica utiliza un sistema de iniciación dual, compuesto por un iniciador de radicales convencional (AIBN), el metal de transición en su estado de oxidación más alto y un iniciador con un átomo o grupo de átomos transferible (véase Figura 4). La ventaja de este método es que se pueden añadir a la reacción sistemas catalíticos altamente activos en su más alto estado de oxidación y en baja concentración respecto al iniciador convencional, lo cual no puede hacerse en la ATRP reversa. Esto es posible debido a que en este caso, el átomo transferible no proviene únicamente de la sal de cobre. Los radicales generados por el iniciador convencional son desactivados por el complejo $\text{Cu}^{\text{II}}\text{X}/\text{L}$ formándose $\text{Cu}^{\text{I}}/\text{L}$ y algunas cadenas poliméricas halogenadas; el complejo $\text{Cu}^{\text{I}}/\text{L}$ puede luego activar el haluro de alquilo (iniciador) y consecuentemente, seguir el curso como una ATRP normal.

La SR&NI ATRP ha sido utilizada con éxito en la síntesis de homopolímeros muy homogéneos, tanto en masa como en disolución y en emulsión. También ha tenido aplicación en miniemulsión⁷, donde la adición antes de la sonicación, tanto del catalizador precursor como de la sal oxidativamente estable, simplifican el procedimiento⁸. Sin embargo este método tiene algunas limitaciones en la producción de copolímeros de bloque, porque el iniciador de radicales convencional forma radicales que reducen a los complejos de Cu^{II} a Cu^{I} , formando homopolímeros (halogenuros de alquilo) del monómero que se está utilizando, y debido a que estas cadenas siempre están presentes, se produce una pérdida parcial sobre el control de la funcionalidad y la topología en la síntesis de copolímeros de bloque.

1.7.3.4 ATRP por transferencia de electrón generada por un activador (AGET)

En esta técnica se utiliza un agente reductor (agente de transferencia de electrones) para reducir el complejo de Cu^{II} ; además no se utiliza un iniciador convencional de radicales, por lo que se evita la formación de homopolímeros, solventando el problema de la *SR&NI* ATRP. Se ha demostrado con un gran número de complejos de Cu^{II} que los dos agentes reductores más eficientes en esta metodología son el $\text{Sn}(\text{II})$ 2-etilhexanoato⁹ y el ácido ascórbico¹⁰. Estos agentes reaccionan con los complejos de Cu^{II} dando lugar al activador Cu^{I} , el cual a su vez y en presencia de los iniciadores (haluros de alquilo o macrorradicales) da lugar al establecimiento de una polimerización por ATRP normal.

1.7.4 Condiciones experimentales en ATRP

Monómeros. En ATRP y sus variantes se han utilizado con éxito una gran variedad de monómeros tales como estirenos, metacrilatos, metacrilamidas, dienos, acrilonitrilo y otros muchos monómeros con sustituyentes que pueden estabilizar a los radicales propagantes.

Disolventes. Debido a que la ATRP y sus variantes se pueden llevar a cabo en masa, en disolución, en emulsión, etc., el uso de disolventes es muy común y por tanto se utiliza gran variedad de ellos: tolueno, benceno, anisol, difenil éter, acetona, dimetilformamida, dimetilsulfóxido, agua, diferentes alcoholes, etc. Normalmente el uso de disolventes es necesario en sistemas en los que pueda existir separación de fases producida por la insolubilidad de un polímero en su propio monómero. También hay que tener en cuenta que la estructura y solubilidad de los catalizadores puede cambiar dependiendo del disolvente utilizado.

Temperatura. La velocidad de polimerización en ATRP y sus variantes aumenta al incrementar la temperatura, debido al aumento de las constantes de velocidad; así la ATRP y sus variantes se pueden llevar a cabo en un amplio rango de temperaturas. En general, al aumentar la temperatura también aumenta la solubilidad del catalizador; sin embargo, si la temperatura es demasiado alta, el catalizador puede llegar a descomponerse. Por tanto la temperatura óptima depende del monómero, del catalizador y, en general, de todos los componentes utilizados en la reacción.

Aditivos. En ocasiones es esencial el uso de aditivos para llevar a cabo con éxito la ATRP. Por ejemplo, es necesario usar un ácido de Lewis, como el aluminio, para controlar la polimerización del metilmetacrilato catalizada por complejos de rutenio. Los compuestos de aluminio también pueden activar y estabilizar los altos estados de oxidación de algunos sistemas catalíticos.

2. Sensores Químicos

2.1 Qué es un sensor

Percibir el medio que nos rodea solo es posible a través de los sentidos. Así, vista, oído y tacto responden a estímulos físicos individuales como luz, ondas de sonido y presión (o temperatura), respectivamente. Por otro lado, los sentidos que responden a estímulos químicos son el gusto y el olfato. Los órganos sensoriales son los "dispositivos" que nos permiten captar dichos estímulos y son los ojos, los oídos, la piel, la lengua y la nariz respectivamente. Los sensores cumplen una función análoga a los órganos sensoriales. En todos los casos, un receptor responde a un estímulo particular e interactúa con un transductor, desencadenando una cascada de señales que, en última instancia, llegan al cerebro. De forma similar, el sensor convierte la variable de entrada en una señal eléctrica adecuada para su medición.

El término *sensor*, tan ampliamente utilizado hoy en día, comenzó a ganar importancia en la década de 1970, como consecuencia del desarrollo tecnológico de la Tercera Revolución Industrial, también denominada Revolución Científico-Técnica, iniciada a mediados del siglo XX y que continúa hasta nuestros días¹. En sus orígenes, la electrónica era comparable a un "ser" ciego, sin oído, tacto, gusto ni olfato. Incapaz de percibir estímulos externos como cambios de luz, temperatura, presión o humedad. Su capacidad se limitaba a dar respuestas, únicamente tras ser activado, ignorante del medio que lo rodeaba. La evolución de los sistemas electrónicos ha permitido importantes avances en el desarrollo de los sensores que imitan a los órganos sensoriales humanos, permitiendo poner en contacto a las máquinas con el mundo exterior, dotando de "sentidos" a la tecnología y haciéndolas cada vez más inteligentes y autónomas, capaces de generar respuestas concretas en función de los cambios del entorno, como activando sistemas extintores en un incendio, alarmas de seguridad por detección de movimiento, o los *airbag* de los vehículos en caso de colisión; sin necesidad de ser activadas por la mano del hombre.

El desarrollo de la tecnología ha evolucionado tanto, que ya supera con creces nuestro sistema sensorial. Los sensores se han convertido en "sentidos ultra-perfeccionados" llegando a lugares a los que el hombre no tiene acceso; detectando estímulos imperceptibles para el ser humano, como las ondas electromagnéticas o los ultrasonidos. Sin embargo, no sería suficiente contemplar los sensores meramente como algunos tipos de órganos sensoriales artificiales;

pueden ser utilizados en muchos otros campos además de las máquinas inteligentes. La información que aportan ha cobrado un valor extraordinario en todos los ámbitos de la actividad humana, desde la seguridad alimentaria y ambiental, hasta el desarrollo más vanguardista de diagnóstico médica o búsqueda de vida en otros planetas.

Aunque aún no existe una definición exhaustiva, moderna y generalizada sobre el término sensor, parece estar bastante claro qué queremos decir cuando hablamos de sensores; no obstante encontramos diferencias respecto a si el receptor solo es un sensor, o si el término engloba la unidad completa, conteniendo al receptor y al transductor. Respecto a estas diferencias hay un amplio consenso sobre las características que deberían tener los sensores, como por ejemplo:

- Estar en contacto directo con la variable investigada.
- Transformar información no eléctrica en señales eléctricas.
- Dar una respuesta rápida.
- Operar en continuo, o al menos en ciclos repetidos.
- Ser pequeños.
- Ser baratos.

Por tanto, podríamos definir un sensor como un dispositivo robusto, sencillo y preferiblemente portátil, que consta de algún elemento sensible a magnitudes físicas o químicas, capaz de detectarlas y transformarlas, por sus propias características, o por medio de dispositivos intermedios, en señales físicas interpretables. Los sensores físicos cuantifican fenómenos de naturaleza física, tales como fuerza, presión, temperatura, humedad, etc. De igual manera, los sensores (bio)químicos están diseñados para medir parámetros (bio)químicos, como composición o concentración de especies.

2.2 Características de un sensor químico

El hecho de conseguir que las capacidades catalíticas y de reconocimiento, únicas de los sistemas químicos y biológicos, puedan ser acoplados a transductores electroquímicos u ópticos ha iniciado una nueva rama de la ciencia analítica: los sensores. La investigación de sensores se basa en una cooperación multidisciplinar entre químicos, electrónicos, ingenieros mecánicos, especialistas en polímeros, ciencias de materiales, quimiometría, electroquímica, óptica y procesamiento de datos. Dependiendo del campo de aplicación, pueden llegar a colaborar médicos, biotecnólogos, ingenieros de procesos o militares. Así, la detección química puede considerarse como un nuevo pilar de la Química Analítica que complementa las técnicas analíticas existentes como la cromatografía, electroquímica, espectroscopia y quimiometría.

Existen dos orígenes principales en el desarrollo de la ciencia de sensores como campo independiente. Uno es el desarrollo de la microtecnología, que estimula la demanda de órganos

sensoriales. La segunda fuente es consecuencia de la evolución de la Química Analítica, que ejerce una creciente demanda de análisis e instrumental portátil.

La Química Analítica persigue, por definición, “obtener información sobre sustancias, especialmente sobre la presencia y abundancia de los constituyentes, incluyendo información sobre su distribución espacial y sus cambios temporales”¹².

A finales del siglo pasado apareció una fuerte tendencia a la automatización en Química Analítica, desarrollando métodos más sencillos, económicos y principalmente portátiles, para poder analizar muestras *in situ* y a tiempo real, sin alterar sus propiedades y evitando problemas habituales de contaminación, extravío o trazabilidad. Hasta entonces lo normal era centralizar enormes laboratorios debido al elevado coste de la instrumentación moderna, recoger las muestras y transportarlas para analizarlas posteriormente. Sin embargo se hizo evidente que todos los problemas no podrían resolverse de manera sencilla. En algunos casos era difícil, si no imposible, transportar ciertas muestras a largas distancias sin que se descompusiesen. Esto es un problema típico en el análisis ambiental, una rama de importancia creciente. Generalmente resultó ser mucho más sencillo llevar el instrumento a la muestra que viceversa. Las técnicas portátiles de análisis químico atrajeron gran interés. Comenzaron a popularizarse sondas analíticas pequeñas y fácilmente transportables que pudiesen ponerse en contacto directo con la muestra de forma sencilla. Un ejemplo es el electrodo selectivo de iones, como un medidor de pH, o un sensor de glucosa en sangre. Esta tecnología emergente atraviesa las fronteras de muchas disciplinas académicas tradicionales y es probable que tenga un efecto profundo sobre la forma de procedimientos analíticos que se llevarán a cabo en el futuro, con una migración desde el laboratorio más sofisticado y especializado hacia el análisis en tiempo real en el campo, casa o la consulta médica.

2.2.1 Definiciones

Según Wolfbeis¹³, el término *sensor* se está vulgarizando cada vez más, así como los términos *nano* o *bio*, y esto ha llevado a que la terminología *sensor* sea cada vez más ambigua. En el campo de la química se está utilizando el término *sensor* para denominar lo que únicamente es la parte receptora de un sensor que, durante más de 100 años, se ha venido denominando sonda molecular o indicador. Los sensores son dispositivos, no moléculas. Para poder funcionar, los sensores también necesitan un transductor o, en otras palabras, un sistema de lectura. Por lo tanto, es fácil darse cuenta de que las tiras reactivas simples no son sensores ni instrumentos analíticos complejos, sino sondas.

La búsqueda bibliográfica sobre sensores conduce a dos conjuntos diferentes. El primero se refiere a **sensores de todo tipo** (electroquímicos, piezoeléctricos, térmicos, luminiscentes, etc.). Estos cubren la mayor parte de las definiciones establecidas de un sensor, mientras que el segundo conjunto se refiere principalmente a **sondas**, pues actúan de forma irreversible. Con el fin de ayudar a solventar este tipo de confusiones, Wolfbeis realizó una distinción¹⁴ entre varios tipos de dispositivos, sus aplicaciones típicas y cómo actúan y operan; esta distinción se refleja en la Tabla 1.

Respecto a las definiciones de biosensor, son algo diversas, pero la mayoría de ellas coinciden en que su distinción, respecto a los sensores químicos, radica en el hecho de que usan un componente biológico como una enzima, un anticuerpo, un ácido polinucleico, o incluso células como elemento receptor de reconocimiento molecular. Por lo tanto, un biosensor puede considerarse como un tipo especial de sensor químico. Más recientemente, se ha extendido la definición de biosensores a sistemas que pueden detectar y determinar especies biológicas, por ejemplo haciendo uso de polímeros de impronta molecular (MIPs). De este modo, un electrodo de pH capaz de detectar el pH sanguíneo no es un biosensor, porque no utiliza un receptor biológico, y tampoco detecta una especie biológica, sino química, el protón. Por otro lado, un sensor de genes para detectar iones de plomo en el agua potable, es un biosensor.

Tabla 1. Términos utilizados frecuentemente en el contexto de investigación de sensores.

Dispositivo	Aplicación	Modo de acción y operación
Sensor	Monitorización online	R, A o NA
	Ensayo de un solo uso	R, A o NA
Sonda	Ensayo de un solo uso	I ^b , A
Tira reactiva	Ensayo de un solo uso	I, A
Dosímetro	Medida de la exposición a especies químicas o radiación	I ^b , NA
Placa dosimétrica	Normalmente es un dosímetro personal	I, A
Dispositivo de alarma	Proporciona una señal cuando se excede un umbral preestablecido	R o I, NA
Monitores	Sensor, dosímetro, o dispositivo de alarma	I o R, A o NA

R, Reversible; I, Irreversible; A, Operación Asistida; NA, Operación No Asistida

^b Si el área sensible se renueva constantemente, puede ser un cuasi-sensor.

A pesar de la multitud de definiciones que tratan de describir qué es un sensor químico, debido a la gran diversidad de sistemas que son considerados actualmente sensores, parece que aún no se ha llegado a un consenso general para dar una definición única y específica. Veamos algunas definiciones:

Según la IUPAC (1991)¹⁵, "un sensor químico es un dispositivo que transforma información química, abarcando desde la concentración de un componente específico de la muestra, hasta la composición total del análisis, en una señal analíticamente útil. La información

química puede provenir de una reacción química del analito o de una propiedad física del sistema investigado." Esta definición es bastante general, sin embargo en la literatura existen algunas definiciones más pragmáticas, como la de Wolfbeis¹⁴: "Los sensores químicos son dispositivos de pequeño tamaño formados por un elemento de reconocimiento, un elemento de transducción y un procesador de señal, capaz de dar información continua y reversible sobre la concentración química".

Una de las definiciones más actuales y apropiadas de un sensor químico es la denominada "definición de Cambridge"¹⁶: Los sensores químicos son dispositivos miniaturizados que pueden ofrecer información en tiempo real y en línea sobre la presencia de compuestos específicos o iones incluso en muestras complejas".

Algunos autores¹⁷ recomiendan una distinción entre el concepto de sensor químico, "como un transductor que proporciona información directa y continua sobre la composición química de su entorno, consistente en un transductor físico y en una capa químicamente selectiva."; y el concepto de sistema sensor, como "instrumentos analíticos en los que una o más operaciones tienen que ser realizadas antes de obtener información química en pasos discretos".

2.2.2 El sensor químico ideal

En general, los requerimientos de un sensor vienen definidos por su aplicación específica, donde la detección siempre implica la interacción entre un analito y el sistema capaz de detectarlo (el sensor). Los siguientes parámetros son particularmente importantes, por lo que deben tenerse en consideración durante la investigación y desarrollo de todo tipo de sensores¹⁸:

- *Sensibilidad*: es la variación de la señal analítica por unidad de concentración del analito, es decir, la pendiente de la recta de calibrado. Cuanto mayor es la pendiente, mayor es la sensibilidad.
- *Selectividad*: es la capacidad de discriminación entre el analito objetivo y otros interferentes químicamente análogos, que pueden estar también presentes en la muestra. Es, dentro del método analítico, la característica básica que determina la precisión de los resultados.
- *Límite de detección (Limit of detection, LOD)*: es la mínima concentración de analito que puede detectar el sistema de forma fiable. La concentración de LOD es estadísticamente distinguible del blanco o señal de fondo.
- *Límite de cuantificación o determinación (Limit of quantification, LOQ)*: es la mínima concentración de analito que puede detectar el sensor de forma cuantitativamente precisa y exacta (es decir, el LOQ toma un valor mayor que el LOD y establece un límite de detección por encima del cual el sensor opera en el intervalo dinámico lineal de forma precisa y exacta).

- *Intervalo dinámico*: rango de concentraciones entre el límite de detección y el límite máximo de concentración detectable (el límite inferior es determinado por la sensibilidad del detector y el límite superior aparece debido a los efectos de saturación).
- *Reversibilidad*: capacidad del sensor para responder dinámicamente (de forma reversible), a los cambios en la concentración de la muestra.
- *Linealidad*: desviación relativa de una recta de calibración determinada experimentalmente, respecto a una línea recta ideal.
- *Tiempo de respuesta*: tiempo que necesita la señal analítica del sensor en alcanzar un valor estable, al producirse un cambio en la concentración del analito. Con frecuencia se utiliza el parámetro t_{95} , que representa el tiempo empleado por el sensor para alcanzar el 95% de la señal analítica.
- *Robustez*: Es la inercia que presenta un sensor a modificar su señal analítica cuando tienen lugar pequeños cambios en las condiciones ambientales u operativas, que se consideran las variables que gobiernan el experimento de medida.
- *Vida útil*: Se define como el período de tiempo estimado en el que un sensor puede continuar funcionando correctamente (dentro de unos límites predeterminados). Normalmente se estima en horas de trabajo. En el caso de los sensores químicos, el tiempo de vida útil está fuertemente ligado a la estabilidad de la fase sensora.

Un *sensor químico ideal*^{14, 19} sería un dispositivo analítico barato, de peso y tamaño reducido, portátil, de uso sencillo, infalible, que respondiese con selectividad precisa a la especie de interés (analito), con el gasto mínimo de energía, de forma directa, reversible, no destructiva y continua sobre la propia matriz de la muestra no tratada, con una adecuada sensibilidad a lo largo de un amplio intervalo dinámico, para producir una señal medible en cualquier concentración de analito requerida, proporcionando información sobre la distribución espacial y temporal de una especie química a tiempo real. Esto implica varios aspectos entre los que se incluyen a) la ausencia de muestreo con su error intrínseco; b) no es necesario un pretratamiento de muestra (como etapas de dilución, con sus errores); c) análisis en tiempo real.

Sin embargo, muchos de los sensores actuales no cumplen con uno o varios de los criterios definidos, y son dispositivos complejos, generalmente optimizados para una aplicación particular. De hecho, numerosos autores denominan también sensores a ciertos diseños que no son capaces de medir de forma continua la concentración de ciertas especies, es decir, son irreversibles y solo permiten una única determinación, por lo que se denominan sensores "desechables". En determinadas ocasiones puede ocurrir que el "sensor" no sea lo suficientemente sensible o selectivo, por lo que en estos casos puede ser de gran ayuda la incorporación de alguna técnica simple de pretratamiento, en línea con la detección, para separar el analito de las especies interferentes presentes en la muestra^{19c}.

En resumen, el uso principal de un sensor ideal es integrar dos de los tres pasos generales del proceso analítico (operaciones preliminares y medida y transducción de la señal analítica), Figura 5.

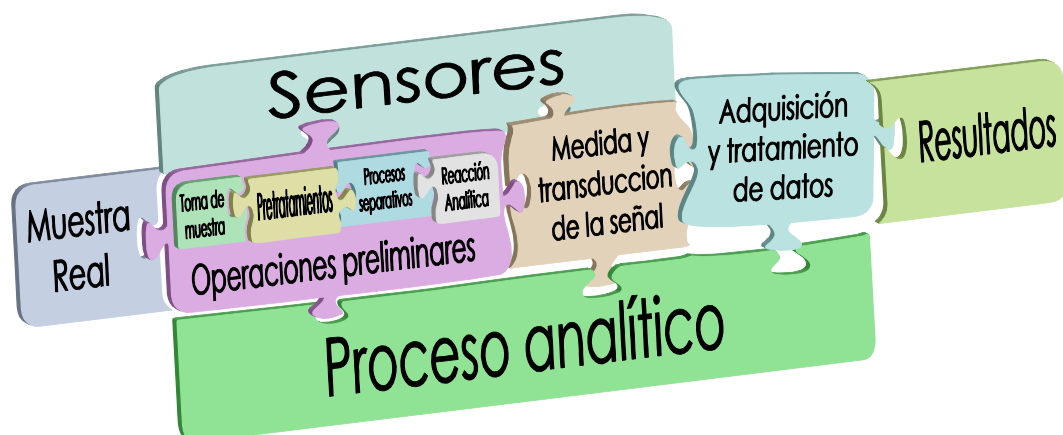


Figura 5. Relevancia de los sensores en el proceso analítico.

2.3 Elementos de los sensores químicos

Los sensores químicos responden selectiva y cuantitativamente a un tipo de analito concreto, a través de una interacción química en la que se generan señales primarias de reconocimiento. Normalmente constan de dos componentes básicos conectados en serie (Figura 6): Una fase sensora o zona de reconocimiento molecular, y un elemento transductor de la señal de reconocimiento^{15, 18a}, aunque algunos autores consideran necesarios elementos adicionales, concretamente unidades electrónicas de amplificación, procesamiento y medida de señal.

El receptor molecular está normalmente inmovilizado en una matriz, como por ejemplo una membrana, que también puede proporcionar algo de selectividad. A este conjunto se le conoce como **zona química** o de reconocimiento molecular, cuya función es interactuar selectivamente con el analito de interés, dando lugar a un cambio en alguna propiedad fisicoquímica del sistema. La detección puede basarse en varios principios:

- Principios físicos, cuando no existe ninguna reacción química involucrada en la detección, sino que responde a un parámetro físico, como podría ser luminiscencia, absorbancia, temperatura, índice de refracción, etc.
- Principios químicos, en los que el receptor interactúa con las moléculas de analito a través de una reacción química, dando lugar a una señal analítica. Por ejemplo la reducción de una especie o una reacción de reconocimiento.
- Principios bioquímicos²⁰, donde la interacción de la fase sensora con el analito es de naturaleza bioquímica, por lo que es especialmente selectiva, como pueden ser las interacciones antígeno – anticuerpo, enzima – sustrato, bases de ADN complementarias, etc.

El elemento **transductor** (que por sí solo no muestra selectividad), permite transformar el evento fisicoquímico producido por la interacción con el analito (luz, calor, intercambio de electrones), en una señal analítica medible que se relaciona con la concentración de analito a través de una calibración realizada previamente.

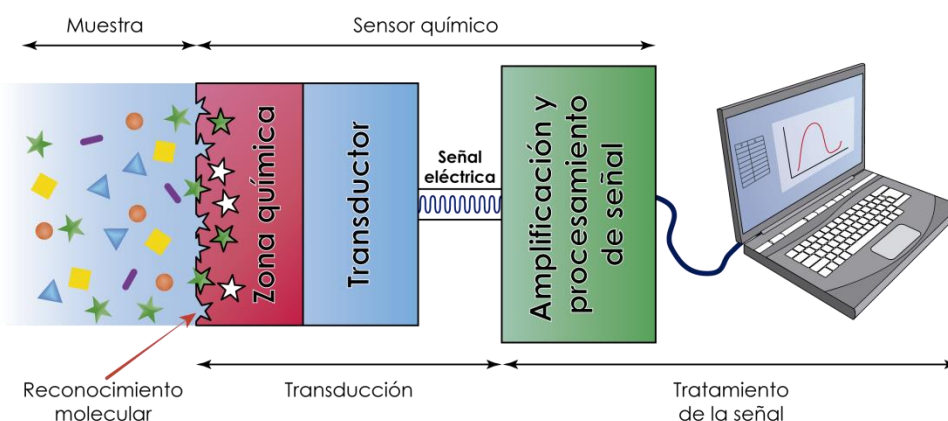


Figura 6. Partes de un sensor químico de acuerdo al tipo de transducción²¹.

2.4 Importancia y actualidad de los sensores

En términos generales, los sensores introducen tres mejoras técnicas diferentes en el proceso analítico. En primer lugar, los sensores reducen la participación humana en operaciones preliminares, facilitando la automatización de las etapas del proceso analítico. Además, el pequeño tamaño inherente de los sensores (miniaturización), los hace muy útiles para aplicaciones como monitorización *in situ* en general y monitorización *in vivo* en particular. La tercera y mayor ventaja de los sensores es la simplificación, especialmente en materia de operaciones preliminares. El desarrollo incesante de sensores químicos, respaldado por la constante evolución y miniaturización de las nuevas tecnologías, ha hecho posible expandir sus múltiples aplicaciones a campos tan diversos como el de la seguridad alimentaria, las ciencias de la salud, el ambiental, el industrial, etc.

2.4.1 Campos de aplicación

2.4.1.1 En el campo de la seguridad alimentaria

Con la creciente demanda de alimentos se hace necesario evitar el desperdicio de estos, por lo que los avances en cuanto al embalaje resultan especialmente útiles para conseguirlo, pues ayudan a mantener los alimentos frescos durante un mayor período de tiempo. Además, los consumidores demandan una regularización cada vez más estricta sobre los aditivos (conservantes, aromatizantes, edulcorantes, etc.). En este contexto se están desarrollando envases inteligentes (*smart packaging*²²), que se pueden definir como sistemas que controlan las condiciones de los alimentos empaquetados, proporcionando información sobre su calidad durante su transporte y almacenamiento. Así, el desarrollo de sistemas sensores que respondan cambiando de color en función de la calidad de los alimentos en términos de frescura, deterioro microbiano u oxidación, está adquiriendo cada vez más importancia en la industria alimentaria²³, así como en sistemas de trazabilidad y análisis de peligros y puntos críticos de control (APPCC).

2.4.1.2 En el campo de las ciencias de la salud

La aplicación comercial de biosensores ha tenido un impacto particularmente significativo en el campo del diagnóstico médico y clínico²⁴, llegando a desarrollarse dispositivos muy económicos (desechables o reutilizables). Debido a su carácter miniaturizable y a su capacidad de medida continua e *in situ*, las pruebas clínicas pueden realizarse en minutos con una precisión y fiabilidad aceptable; proporcionando al médico indicaciones inmediatas y propiciando la detección temprana de enfermedades infecciosas²⁵. Una de las mayores ventajas que presentan los sensores es que son dispositivos no invasivos o mínimamente invasivos, que no destruyen la muestra y, por tanto, su uso en este campo podría mejorar los dispositivos que se están utilizando en la actualidad.

Hoy en día existen multitud de kits de diagnósticos pensados para el ámbito doméstico. Como ejemplo podríamos destacar los test de embarazo; las pruebas de antaño²⁶ han dado paso a las actuales, basadas en inmunoensayos antígeno-anticuerpo, que revelan la presencia en orina de la *hormona HCG*, generada únicamente por la mujer embarazada. Otro ejemplo son los dispositivos de control de glucosa en sangre, como el *Accu-Chek Aviva Blood Glucose Monitor System* (comercializado por Roche®), que incorporan glucosa oxidasa en las tiras reactivas.

Por otro lado, los biosensores de ADN son considerablemente prometedores para obtener información específica sobre la secuencia de ácido nucleico humano, viral y bacteriano de una manera más rápida, fácil y barata, en comparación con los ensayos de hibridación tradicional. El desarrollo de biosensores de ADN ayuda en la detección de patógenos y en el diagnóstico de enfermedades genéticas²⁷.

2.4.1.3 En el campo del control medioambiental

El empleo de sensores químicos y de nuevas disciplinas como la nanotecnología²⁸ constituyen herramientas muy útiles en la identificación y cuantificación de contaminantes ambientales²⁹ de forma remota y continua, dando información muy valiosa a la hora de llevar a cabo una estrategia adecuada para remediar los efectos de la polución en áreas contaminadas o en zonas con desechos peligrosos para la vida. Ante la creciente preocupación pública sobre la calidad del agua potable, el control continuo de las aguas subterráneas³⁰ se ha convertido en un asunto de vital importancia, por lo que el papel que desempeñan los sensores en este ámbito es medir pH, contaminantes orgánicos, herbicidas³¹ y trazas de sustancias; tanto en aguas como en suelos.

2.4.1.4 En el campo industrial

La eficiencia de producción y la calidad de productos dependen críticamente de los procesos de control. Cada vez con más frecuencia los sensores on-line están reemplazando a las técnicas clásicas de muestreo, y la Química Analítica se está extendiendo desde los laboratorios a las fábricas. Teniendo en cuenta los costes derivados de una reacción química

fallida y sus consecuencias medioambientales, existen requerimientos extremadamente fiables en la instrumentación de control de procesos.

Por otro lado, la mayoría de los sensores para procesos de control continuo se enfrentan a condiciones adversas. Normalmente, requieren de una fiabilidad mayor del 99% bajo temperaturas extremas³² con mucho ruido, vibración y exposiciones a sustancias químicas, pero con un mantenimiento mínimo y periodos de tiempo bastante largos. Además, se espera que el instrumento permanezca preciso durante un periodo de tiempo prolongado. Por tanto, Las características de los sensores más demandadas en la industria son precio, robustez y estabilidad frente al tiempo o a la temperatura, además de cumplir con una biocompatibilidad en procesos biotecnológicos.

2.5 Nanotecnología y sensores químicos

La nanociencia es una disciplina basada en el conocimiento de las propiedades de la materia en estado nanométrico (mil millonésima parte de un metro). Su objetivo es investigar los mecanismos fundamentales por los cuales se forman, organizan y transforman las estructuras a un nivel nanométrico, e implica complejas investigaciones interdisciplinarias de las propiedades físicas y químicas de los objetos nanométricos. La nanociencia sirve como base para el desarrollo de la nanotecnología, cuyo objetivo principal es desarrollar métodos eficientes (económica y ambientalmente), para el diseño de materiales nanoestructurados novedosos como la preparación de películas y recubrimientos, fabricación de nanoestructuras funcionales y elementos para dispositivos nanoelectrónicos, que son aplicaciones prometedoras en diversos campos, desde sistemas de información y telecomunicaciones, sensores, optoelectrónica y catálisis, hasta la medicina y la bioingeniería. Todos los métodos innovadores de producción, caracterización y modificación adaptados a la nanotecnología, están orientados sistemáticamente hacia la idea de "ingeniería a nivel atómico y molecular".

Los materiales nanoestructurados cruzan la frontera entre la Nanociencia y la nanotecnología y vinculan ambas áreas. Aunque se habla ampliamente sobre nanotecnología, actualmente existe poco consenso sobre dónde comienza el nano-dominio. Se reconoce que el rango de tamaño que ofrece el mayor potencial, y por lo tanto el mayor interés, está por debajo de los 100 nm; sin embargo, todavía hay muchas aplicaciones para las cuáles las partículas más grandes pueden proporcionar propiedades de gran interés.

Un cambio de macro y micro a nano-escala, modifica cualitativamente la mayoría de las propiedades fisicoquímicas de los materiales. Cuando los tamaños de los materiales se reducen en una o más dimensiones, sus propiedades físicas y químicas pueden cambiar drásticamente debido al extraordinario aumento en la relación superficie-volumen. Como resultado la mayor superficie de las nanopartículas, en comparación con su volumen, desempeña un papel significativo en las características importantes de estos materiales. Estos cambios afectan a sus propiedades ópticas, químicas, electromagnéticas, mecánicas y

térmicas, haciendo que los compuestos y materiales resultantes muestren propiedades inexistentes en objetos macro y microscópicos de la misma naturaleza química³³.

La gran relación superficie-volumen y sus efectos sobre las propiedades del material son una característica clave en la nanociencia y la nanotecnología. Así, la forma de un nanomaterial es de gran interés, porque varias formas producirán distintas relaciones superficie-volumen y por tanto diferentes propiedades. Luego las nanopartículas se caracterizan por una dependencia variable de las propiedades en función de su tamaño, forma y composición. Cualitativamente, las propiedades especiales de los nanomateriales son debidas tanto a la superficie extraordinariamente desarrollada de sus partículas constituyentes, como a los efectos cuánticos y electrónicos que muestran las nanopartículas. Además, en los materiales con una o más dimensiones en la nanoescala, estas propiedades pueden ser enormemente útiles para mejorar y adaptar el funcionamiento de los sensores. Por lo tanto, las características del sensor tales como sensibilidad, tiempo de respuesta y capacidad de realizar mediciones *in vivo* pueden mejorarse drásticamente.

Por ejemplo, en el campo de la biotecnología se han diseñado los llamados nanosensores PEBBLE³⁴ (del inglés *Probes encapsulated by biologically localized embedding*), que vendría a traducirse como *sondas encapsuladas por embebido biológicamente localizadas*, con el fin de realizar mediciones cuantitativas en el medio intracelular, pues son lo suficientemente pequeños como para ser insertados en las células vivas con la mínima perturbación física.

Sin embargo, deben considerarse algunos aspectos de seguridad respecto al uso "libre" de nanosensores para mediciones *in vivo*. La principal preocupación es la retención de estas partículas en el cuerpo y el efecto nocivo a largo plazo³⁵ puesto que las nanopartículas pueden ser responsables de una serie de interacciones materiales que podría conducir a efectos toxicológicos³⁶. En cualquier caso, las propiedades ópticas que pueden ser controladas en la nanoescala son de gran interés en el campo del diseño de los sensores ópticos³⁷. Ya existen multitud de aplicaciones en diversos campos, como el control de contaminación medioambiental³⁸, en el ámbito clínico³⁹, seguridad alimentaria⁴⁰ o biotecnología⁴¹.

Aunque la nanotecnología se encuentra aún en su infancia, se espera que cambie drásticamente las características funcionales de los sensores químicos y probablemente ganará importancia en todos los campos de aplicación de sensores en los próximos diez o veinte años.

2.6 Clasificación de sensores químicos

El tremendo desarrollo que han experimentado los sensores químicos durante los últimos años, además de la enorme variedad de procesos químicos y sistemas de detección que pueden utilizarse en el desarrollo de un sensor, hace indispensable llevar a cabo una clasificación^{14-15, 19} de los mismos en grupos con características comunes. La enorme magnitud que abarca el campo de los sensores proporciona una buena idea de la variedad de estos que

puede existir, y muestra lo complicado que puede llegar a ser establecer unas reglas generales, por lo que intentar clasificar estos sistemas de manera simple es prácticamente imposible. En la Tabla 2 se han clasificado algunos sensores, atendiendo a distintos criterios de actuación y configuración, que se desarrollan con más detalle a continuación.

Tabla 2. Clasificación general de los sensores, basada en diversos criterios de actuación y configuración.

		A	B	C	D	E	F	G	H
Sensor	Óptico	Activo	Conectado	Reversible	Tipo Sonda	Continuo	Uniparámetro	Físico	
	Másico	Pasivo	Integrado	Irreversible	Planar	Discontinuo	Multiparámetro	Químico	
	Magnético		No conectado	Regenerable	Célula de flujo			Bioquímico	
	Termométrico			Desechable					
	Electroquímico								

A: En función del tipo de transducción.

B: Dependiendo de la existencia de una reacción química del analito con la zona sensible.

C: Configuración de la fase sensora y el transductor.

D: En función del tipo de interacción con el analito.

E: Configuración del sensor.

F: Modo de operación.

G: Capacidad de análisis de parámetros.

H: Tipo de reconocimiento de la fase sensora.

Una de las clasificaciones de sensores más intuitivas y predominantes es la que se hace de acuerdo a *cómo opera el transductor* empleado para detectar los cambios físico-químicos que tienen lugar en presencia del analito. Los principales sistemas de transducción empleados en la construcción de sensores se pueden clasificar en:

- **Dispositivos ópticos**, que transforman cambios del fenómeno óptico, como resultado de la interacción del analito con el receptor. Este grupo se puede subdividir en función del tipo de propiedades ópticas aplicadas en los sensores químicos, como pueden ser:
 - Absorbancia, medida en un medio transparente, causada por la absorción del analito por sí mismo o por una reacción con algún indicador adecuado.
 - Reflectancia, se mide en un medio no transparente, utilizando normalmente un indicador inmovilizado.
 - Luminiscencia, basada en la medida de la intensidad de luz emitida por una reacción química en el sistema receptor. Aunque una atenuación o quenching selectivo de luminiscencia también puede ser la base de estos dispositivos⁴².

- Índice de refracción, medido como el resultado de un cambio en la composición de la disolución.
 - Efecto optotérmico, basado en la medida del efecto térmico causado por la absorción de luz.
 - Dispersión de luz, basado en los efectos causados por partículas de tamaño definido presentes en la muestra.
- **Dispositivos electroquímicos**, que transforman el efecto de la interacción electroquímica producida entre el analito y el electrodo, en una señal útil. Estos efectos pueden estimularse eléctricamente o pueden ser causados por una interacción espontánea en condiciones de corriente cero. Pueden distinguirse los siguientes grupos:
- Sensores voltamétricos, incluyendo los dispositivos amperométricos, donde la corriente se mide de forma continua o alterna. Este subgrupo puede incluir sensores basados en electrodos químicamente inertes. En este grupo entran los sensores galvánicos (con y sin fuente de corriente externa).
 - Sensores potenciométricos, donde el potencial del electrodo indicador (electrodo selectivo a iones, electrodo redox, electrodo metálico/óxido metálico), se mide frente a un electrodo de referencia.
 - Transistores de efecto de campo químicamente modificados, conocidos por sus siglas en inglés como CHEMFET (*Chemically Modified Field Effect Transistor*). En ellos, el efecto de la interacción entre el analito y la capa activa es un cambio de corriente en la fuente. Las interacciones entre el analito y la capa activa son, desde un punto de vista químico, similares a las encontradas en los sensores potenciométricos selectivos a iones.
 - Sensores de gases potenciométricos de electrolito sólido, que difieren de los sensores potenciométricos sencillos en que los electrolitos en estado sólido trabajan a altas temperaturas y su aplicación principal es la medida de gases.
- Los **dispositivos de sensibilidad másica** transforman el cambio de masa (en una superficie especialmente modificada), en un cambio de la propiedad del material soporte. Dicho cambio de masa se debe a la acumulación del analito. Dentro de este grupo, podemos encontrar:
- Dispositivos piezoeléctricos, utilizados principalmente en fase gaseosa, aunque también en disolución, y se basan en la medición del cambio de frecuencia del oscilador de cuarzo, causada por la adsorción de una masa de analito en el oscilador.

- Dispositivos de onda acústica superficial, que dependen de la modificación de la velocidad de propagación de una onda acústica generada, y que se ve afectada por la deposición de una masa definida del analito.
- **Dispositivos magnéticos** basados en el cambio de las propiedades paramagnéticas del gas analizado. Suelen aplicarse para monitorizar el oxígeno.
- **Dispositivos termométricos**, basados en la medida del calor liberado o absorbido en una reacción química o adsorción de un analito. En este grupo, los efectos del calor pueden medirse de varias formas, por ejemplo, en los llamados sensores catalíticos, el calor de una reacción de combustión o de una reacción enzimática se mide con un termistor.
- Otros tipos de sensores químicos pueden basarse en otras propiedades físicas, como la radiación, si son aplicados para determinar composiciones químicas.

Debido al trabajo realizado en esta Tesis, nos centraremos en el estudio de los Sensores Químicos Ópticos.

3. Sensores Ópticos

3.1 Generalidades de los sensores ópticos

La disciplina de la Espectroscopia abarca el estudio y uso de las interacciones de la radiación electromagnética con la materia, y proporciona información que comprende desde la estructura electrónica de los átomos hasta la dinámica de las cadenas poliméricas. Según los principios básicos de la espectroscopia, la radiación electromagnética atraviesa la muestra, que puede ser sólida, líquida o gaseosa; la interacción de esta radiación con la muestra se evalúa desde el cambio de algunos parámetros ópticos y puede ser directamente relacionada con la concentración de analito.

El conocimiento espectroscópico sirve como base para el desarrollo y uso de sensores ópticos que, por definición, están basados en la medición de fotones. Representan un grupo de sensores químicos que hacen uso de la radiación electromagnética para generar la señal analítica en un elemento de transducción de señales.

Los sensores ópticos también han sido nombrados como optodos y optrodos; ambos términos destacan el hecho de que la información recogida por dichos sensores implica mediciones ópticas, en analogía a los electrones como en el caso de los electrodos. Se ha sugerido usar el término optrodo para la combinación de los métodos de detección ópticos y electroquímicos, tales como aquellos basados en electroluminiscencia, pero ambos términos se utilizan indistintamente.

El sistema sensor óptico en sí mismo comprende la parte sensible, la fuente de luz y el dispositivo de lectura. Estos sensores pueden basarse en varios principios ópticos, como absorbancia, reflectancia, luminiscencia, etc. (Figura 7), cubriendo diferentes regiones de los espectros (UV, visible e IR). La interacción del analito de interés con la fase sensora produce un cambio en alguna propiedad óptica del sistema y genera una señal analítica en el elemento de transducción, que detecta la modulación de algunas propiedades de la radiación, y no solo permite la medición de la intensidad de la luz, sino también de otras propiedades relacionadas, como tiempo de vida, índice de refracción, dispersión, difracción o polarización⁴³.

Un sistema de detección óptica puede estar basado en la detección (a) directa o (b) mediada por el indicador. En un sensor óptico directo, se detecta el analito directamente a

través de alguna propiedad óptica intrínseca, como, por ejemplo la absorbancia o la luminiscencia. En un sistema mediado por el indicador, se detecta el cambio en la respuesta óptica de un agente intermedio, generalmente una molécula (indicador) sensible al analito, y se utiliza para controlar la concentración de analito.

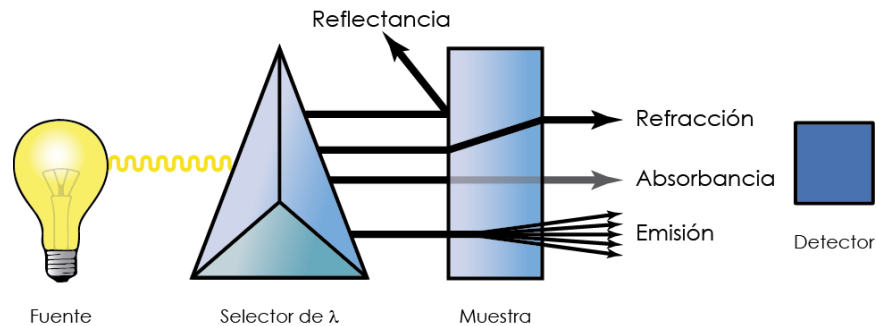


Figura 7. Disposición instrumental general en medidas espectroscópicas⁴⁴.

Los métodos más comúnmente aplicados en sensores ópticos son aquellos basados en la absorción⁴⁵ o la emisión⁴⁶ de luz. Sin embargo, en comparación con los métodos de absorción, los de emisión (fluorescencia y fosforescencia) son particularmente importantes debido a su extrema sensibilidad y buena selectividad. Los métodos de luminiscencia son aproximadamente 1000 veces más sensibles que la mayoría de los métodos espectrofotométricos.

La luminiscencia ofrece una gran variedad de técnicas de aplicación, entre las que destacan las medidas en estado estacionario (intensidad de emisión), tiempo de vida, transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET), y medidas relativas (que permiten hacer la medida independiente de las principales fuentes de error, como son la dependencia de la luz de excitación o las variaciones en el camino óptico).

Las técnicas de medida de la intensidad de emisión son las más populares, porque la instrumentación necesaria es muy simple y de bajo coste. No obstante, tienen algunas desventajas respecto a las mediciones de tiempo de vida de emisión, en las que la muestra se excita a través de un pulso electromagnético, en lugar de una iluminación continua como es el caso de los métodos basados en la intensidad. La precisión y exactitud de los métodos basados en intensidad de luminiscencia suelen verse afectadas considerablemente por factores tan diversos como las fluctuaciones de intensidad de la fuente lumínica, la sensibilidad del detector, la concentración del indicador, la turbidez de la muestra o el espesor de la capa de detección. Sin embargo, algunos de estos problemas pueden ser minimizados o incluso eliminados midiendo tiempos de vida, en lugar de intensidades de luminiscencia.

La espectroscopia de emisión luminiscente ha desarrollado métodos analíticos caracterizados por su sensibilidad, selectividad y versatilidad. Paralelamente, la industria de las telecomunicaciones ha logrado la comercialización de fibras ópticas de bajo coste que permiten transmitir luz y cubrir así largas distancias. Además, la disponibilidad de nuevas fuentes de radiación baratas como los láseres y los diodos emisores de luz (LEDs, *Light-Emitting Diodes*)

permiten excitar la muestra en prácticamente todo el intervalo de longitudes de onda del espectro electromagnético UV-visible. Asimismo, se han desarrollado fotodetectores de elevada sensibilidad y bajo coste, como es el caso de los fotodiodos y las cámaras CCD (*Charge-Coupled Device*), así como una amplia variedad de componentes ópticos de reducidas dimensiones y bajo coste (filtros ópticos, colimadores, divisores de haz, etc.). Por último, nuevos métodos de tratamiento de señal, junto con microprocesadores de alta capacidad y pequeño tamaño, permiten almacenar y procesar datos de forma cada vez más efectiva, incluso en el caso de relaciones complejas de señal-concentración.

La conjugación de todas estas nuevas tecnologías y metodologías permite hacernos una idea del espectacular nivel de desarrollo que está experimentando actualmente el campo de los sensores ópticos⁴⁷, desarrollando dispositivos cada vez más efectivos de pequeño tamaño, bajo coste, bajo consumo, portátiles y de elevadas prestaciones analíticas⁴⁸, ya sea para el análisis y/o control de parámetros de interés químico⁴⁹, ambiental⁵⁰, clínico⁵¹, etc.

3.2 Clasificación de los sensores ópticos

Como se indicaba en la clasificación de sensores químicos realizada en la Tabla 2, y dentro del tipo de transducción óptica, los sensores ópticos pueden clasificarse en función de la naturaleza del fenómeno óptico medido. En este caso se puede hablar de sensores de absorbancia, de reflectancia, de dispersión raman, luminiscentes (fluorescentes, fosforescentes, bioluminiscentes, quimioluminiscentes), etc.

Dentro de los distintos mecanismos de transducción, los procesos fotoluminiscentes resultan particularmente atractivos para el desarrollo de sensores ópticos, ya que la radiación detectada puede ser diferenciada de la radiación incidente sobre la fase activa por su longitud de onda. Además, dan lugar a sistemas sensores altamente sensibles que permiten determinar muy bajos niveles de concentración. Estas características hacen especialmente adecuado el uso de dichas técnicas fotoluminiscentes como técnicas de detección en el desarrollo de sensores químicos^{19c}.

Continuando con la clasificación, los sensores ópticos pueden clasificarse atendiendo además a diversos aspectos:

- B. Los sensores químicos pueden ser **activos o pasivos** dependiendo de si incorporan o no una "fase sensible" donde tiene lugar la reacción (bio)química de reconocimiento. En principio los sensores pasivos no cumplen los requisitos incluidos en la definición de sensor en cuanto a su estructura (existencia de una "fase sensible"), puesto que simplemente se trata de una medida directa de una propiedad físico-química del analito; sin embargo, son los más fáciles de realizar, operan de forma similar a los sensores activos y tienen la ventaja añadida de una completa reversibilidad, por lo que son los más utilizados en la mayoría de las aplicaciones industriales.

- C. Otra clasificación de los sensores establece tres categorías en función de la forma de *acoplamiento del elemento de reconocimiento y el transductor*. Estos dos elementos esenciales pueden estar **conectados** ópticamente (por ejemplo, mediante el empleo de una fibra óptica) o eléctricamente. Por otro lado, el transductor (detector) y la "fase sensible" pueden estar **integrados** en un único elemento. En el caso de los **no conectados** (*Wireless sensors*)⁵², la zona de reconocimiento no está físicamente conectada con el elemento transductor, por lo que la detección se lleva a cabo a distancia, de forma inalámbrica⁵³.
- D. En función del *tipo de interacción* con el analito, las fases sensoras se pueden clasificar en **reversibles** e **irreversibles**. Estos últimos a su vez, se pueden subdividir en:
- *regenerables*: son aquellos que dan lugar a una respuesta similar a la de un sensor reversible, pero con la diferencia de que no operan de forma continua, pues requieren una etapa de regeneración para poder ser utilizados de nuevo.
 - *no regenerables*: en el caso de los sensores irreversibles no regenerables o desechables, solo responden a incrementos en la concentración del analito saturándose con facilidad, por lo que se suelen emplear para una única medida.
- E. De acuerdo a la apariencia externa o *configuración del sensor* y a la forma en que la fase sensible entra en contacto con la muestra podemos distinguir entre: **sensores tipo sonda**, **sensores planares** y **sensores tipo célula de flujo**.
- En los sensores tipo sonda u *optrodos*, la fase sensora está localizada en el extremo del terminal sensible (electrodo o fibra óptica), que a su vez se encuentra en contacto directo con la muestra.
 - En el caso de los sensores planares, el elemento sensible está localizado en una superficie plana sobre la que se depositan unas gotas de la muestra.
 - Finalmente, en los sensores tipo célula de flujo (*optosensores*), la muestra es aspirada (o inyectada) y transferida a una célula de flujo donde se encuentra empaquetada la fase sensible. Su principal característica es que la fase sensora se sitúa en el sistema de detección, es decir, los procesos de reacción y detección son simultáneos.
- F. En cuanto al *modo de operación*, los sensores químicos pueden trabajar en **modo discontinuo o en modo continuo**. Mientras que los sensores tipo sonda pueden ser utilizados tanto en modo continuo como en modo discontinuo, los sensores tipo célula de flujo solo pueden operar en régimen continuo.
- G. De acuerdo al *número de analitos que son capaces de determinar* en una misma muestra, la mayoría de los sensores responden a la concentración de una única especie

(**uniparamétricos**), mientras que existen algunos capaces de determinar simultáneamente varios analitos (**multiparamétricos**). Entre estos últimos podemos distinguir dos tipos:

- aquellos que incorporan un elemento de reconocimiento por cada analito en la misma fase sensible.
- aquellos que hacen uso de un único elemento de reconocimiento conectado o integrado a un transductor capaz de realizar análisis multielemental.

H. Atendiendo al *tipo de reconocimiento de la fase sensora*, puede ser **químico** o **bioquímico**. Ver definición de biosensor, en la sección 2.2.1.

3.3 Tipos de fases sensoras

Todos los sensores ópticos tienen en común un elemento esencial que hace posible el reconocimiento y la detección del analito de interés: *la fase sensora* o *zona de reconocimiento químico*. Dicha fase sensora está constituida generalmente por un reactivo indicador inmovilizado sobre un soporte sólido⁵⁴. El empleo de estos soportes, ya sean orgánicos (polímeros) o inorgánicos (óxidos metálicos nanoestructurados, sílice), confieren a la fase sensora una serie de ventajas importantes como son: una mayor estabilidad de los reactivos, sensibilidad, selectividad o incluso una mayor velocidad de reacción, siendo sus costes de fabricación y adquisición generalmente moderados. Estas cualidades hacen de los soportes sólidos una herramienta ampliamente utilizada en la preparación de fases sensoras.

Actualmente existe una gran variedad de soportes sólidos para preparar fases sensoras. Por citar solo unos ejemplos, una fase sensora puede ser una membrana polimérica en la que pueden ser solubilizados diferentes reactivos que interaccionen con el analito de interés (produciendo un cambio en las propiedades ópticas de la misma⁵⁵), membranas nanoestructuradas formadas por un óxido metálico⁵⁶ o un sol-gel en el que se inmovilice un reactivo que actúe de la misma forma que en el caso anterior, nano/micropartículas orgánicas/inorgánicas o híbridas⁵⁷ (partículas con un núcleo magnético (Fe_3O_4) recubierto con una capa polimérica⁵⁸); o nano/microfibras⁵⁹ que incorporen el reactivo en su superficie; una resina polimérica entrecruzada en cuya superficie se adsorban los analitos (preconcentrándose y produciendo una variación en las propiedades ópticas de la fase sensora)⁶⁰, o un polímero de impronta molecular (MIP, del inglés *Molecularly Imprinted Polymer*) en cualquiera de sus diversos formatos (micro/nanopartículas esféricas, micro/nanofibras o membranas poliméricas de impronta molecular)⁶¹, en el que se hayan generado huecos específicos para el analito de interés.

3.4 Mecanismos de reconocimiento

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

- 1) *Mecanismo de coextracción o cambio iónico*: La fase sensora contiene un ionóforo (que interacciona con el analito), un cromoionóforo (cuyas propiedades ópticas serán sensibles al cambio de una propiedad química de la membrana, por ejemplo el pH) y, en el caso de un cambio de carga en la membrana, debido a la entrada o salida de especies cargadas, un aditivo aniónico lipofílico (encargado de mantener la electroneutralidad dentro de la membrana). La interacción del analito de interés con el ionóforo provoca un cambio en una propiedad química de la membrana, por ejemplo la entrada de iones H^+ (coextracción) que modifican el pH de la membrana, o la cesión de iones H^+ del ionóforo al cromoionóforo (cambio iónico), que al igual que en el caso anterior, produce un cambio en el pH de la membrana. Esta variación de pH induce un cambio en las propiedades ópticas del cromoionóforo relacionado con la concentración del analito de interés. Por tanto, se trata de un mecanismo de reconocimiento indirecto.
- 2) *Mecanismo catalítico/enzimático*: La fase sensora contiene un catalizador (o enzima) inmovilizado que, en presencia del analito de interés, cataliza una reacción donde se genera una nueva sustancia que produce un cambio en las propiedades ópticas de la misma. Este cambio puede ser un aumento o una disminución de la propiedad óptica medida, por ejemplo la aparición de luminiscencia, cuya intensidad es proporcional a la concentración de analito.
- 3) *Mecanismo de interacción directa analito-cromoionóforo*: La fase sensora contiene un cromoionóforo que, tras interactuar con el analito de interés (interacción física o química), cambia alguna de sus propiedades ópticas. Esta variación puede ser un aumento o una disminución de dicha propiedad, como por ejemplo una atenuación de la luminiscencia molecular, proporcional a la concentración del analito.
- 4) *Mecanismo de interacción directa analito-soporte*: La fase sensora, que no contiene ningún aditivo ópticamente activo, interacciona con el analito que se retiene por interacciones físicas y/o químicas, preconcentrándose y produciendo en las propiedades ópticas de la fase sensora una variación proporcional a la concentración del analito. Este es el caso de las fases sensoras basadas en resinas poliméricas entrecruzadas o en polímeros de impronta molecular.

3.5 Soportes sólidos usados en el desarrollo de fases sensoras ópticas

Los reactivos utilizados en sensores ópticos (ya sean indicadores o enzimas), se inmovilizan preferentemente en soportes rígidos y ópticamente transparentes, constituyendo su conjunto la fase sensible al analito a determinar. Las características y el buen funcionamiento del futuro sensor dependerán en gran medida de la correcta elección del soporte sólido, principalmente en términos de sensibilidad, tiempo de respuesta, intervalo dinámico e incluso de la selectividad del método.

En todo caso, la elección del soporte depende de los requerimientos predecibles por las interacciones indicador-analito. Por ejemplo, en el caso de analitos gaseosos la respuesta está gobernada por el coeficiente de difusión de los gases hacia el soporte, su solubilidad en el mismo y la permeabilidad de este. Así, cuando se trata de indicadores fluorescentes frente a desactivadores gaseosos no polares, como el oxígeno, el indicador puede disolverse en un polímero adecuado para formar la capa sensible, a través de la cual pueda difundir libremente el desactivador, pero no las sustancias iónicas, mejorando en este caso la selectividad. En ocasiones el analito puede no penetrar hacia el interior del polímero, o puede que el indicador no sea soluble en tales polímeros, por lo que es preciso inmovilizar al reactivo en la superficie del soporte polimérico para facilitar el acceso del analito hacia el indicador.

Otro factor a tener en cuenta en la elección del soporte es las posibles interferencias que podrían producir las propiedades ópticas intrínsecas de ciertos soportes, como es el caso de algunos polímeros de poliestireno (cuya excitación se da en la región del UV). En estos casos se observarían señales considerables en el espectro, correspondientes al blanco.

3.5.1 Membranas poliméricas

Los primeros soportes sólidos que se utilizaron en la preparación de fases sensoras ópticas fueron las membranas poliméricas, debido a su extendido uso en el desarrollo de sensores electroquímicos y a la posibilidad de formar películas sensoras delgadas que contienen todos aquellos reactivos necesarios para llevar a cabo la reacción de reconocimiento de la especie de interés. Los polímeros utilizados en la construcción de fases sensoras pueden tener una o más de las siguientes funciones: (a) actuar como soporte rígido, sobre el cual se inmoviliza el indicador o biomolécula correspondiente; (b) proporcionar selectividad hacia ciertas especies, en virtud de la permeabilidad selectiva de la mayoría de los polímeros; (c) servir de capa protectora para evitar el arrastre o contaminación del elemento de transducción y, por último, (d) proporcionar un aislamiento óptico, con el fin de reducir interferencias de la luz ambiental. Por lo que la correcta elección del polímero tendrá un efecto importante sobre el tiempo de respuesta del sensor y sobre la función de respuesta del mismo.

La elección del soporte polimérico es un proceso empírico, basado en el cumplimiento de una serie de requisitos deseables para cualquier soporte destinado a ser utilizado en un sensor óptico, como pueden ser inercia química, estabilidad, transparencia óptica, permeabilidad al analito, así como compatibilidad con la muestra y con el resto de los componentes utilizados en la fabricación de la fase sensora. Así, para la obtención de la fase sensora se parte de un cóctel, que no es más que una disolución en un disolvente altamente volátil, de un polímero lineal y todos los reactivos necesarios para la determinación. Existen diferentes técnicas de deposición, tales como *spin coating*, *knife coating*, *drop coating*, etc., cuya selección se hará en función del espesor requerido o del tipo de soporte inerte en el que se vaya a depositar la fase sensora. Tras la deposición de esta disolución y la evaporación del disolvente, el polímero retiene los elementos sensores.

Ventajas de utilizar membranas poliméricas como soportes para fases sensoras:

- Pueden ser diseñadas de forma sencilla, pues se dispone de toda la tecnología previa usada en el desarrollo de este tipo de membranas en sensores electroquímicos.
- En función de la técnica de deposición usada, es posible controlar el espesor de la membrana polimérica y se pueden recubrir multitud de dispositivos de medida de forma sencilla y rápida.
- La gran información y tipos de polímeros de los que se dispone habitualmente hace posible variar sus propiedades físico-químicas, de manera que se puedan adaptar a las necesidades requeridas.
- Estas membranas pueden ser fácilmente entrecruzadas, aumentando así su estabilidad e impidiendo problemas de redisolución o "*leaching*", obteniendo resinas tridimensionales, similares a las que se han usado también en el desarrollo de fases sensoras ópticas.

Los principales inconvenientes de este tipo de soportes radican en:

- Baja estabilidad, debido a la degradación de los compuestos ópticamente activos necesarios para el reconocimiento.
- Problemas de agregación de estos compuestos y por tanto disminución progresiva de su sensibilidad.
- Tiempos de respuesta altos, debido a que el analito tiene que difundir hacia el interior de la membrana polimérica para que pueda producirse la reacción de reconocimiento.

Estas deficiencias de las membranas poliméricas se pueden solventar haciendo una buena selección de ionóforos y/o cromoionóforos, así como del polímero lineal. Por lo que es necesario llevar a cabo un esfuerzo investigador en el desarrollo de nuevos compuestos ópticamente activos que sean altamente foto y termoestables, así como el perfeccionamiento de las reacciones químicas implicadas entre el indicador y los analitos de interés, que permitan aumentar su sensibilidad analítica.

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

Los polímeros, en general, no suelen ser buenos disolventes para la mayoría de los indicadores de interés, debido a que transcurrido cierto tiempo cristalizan o se disponen en la superficie polimérica formando finas láminas. Además, los indicadores iónicos no se disuelven fácilmente en la mayoría de los polímeros usuales y los analitos cargados no penetran en los polímeros hidrofóbicos. Por tanto se hace necesario inmovilizarlos en la interfase entre el soporte y la disolución de la muestra.

Algunos soportes hidrófilos, como la celulosa, han sido ampliamente utilizados en la inmovilización de indicadores⁶², agentes quelatantes⁶³ o proteínas⁶⁴. La facilidad de penetración del agua a través de las membranas de celulosa, hace que su empleo presente la ventaja de acortar los tiempos de respuesta en medios acuosos.

Existen otros soportes de tipo poli(acrilamida) y poli(metacrilamida) que tienen gran estabilidad química pero, a su vez, gran tendencia al hinchamiento, observándose una deriva de la señal cuando se hidratan. Un grupo de polímeros hidrófilos frecuentemente utilizados son los hidrogeles⁶⁵. Químicamente están constituidos por un grupo heterogéneo de polímeros que comprenden entre otros, polihidroxietilacrilatos, poliacrilamidas, polivinilpirrolidonas, polivinilalcoholes y poliuretanos. Los hidrogeles ofrecen una excelente biocompatibilidad, probablemente debida a su elevado contenido en agua y a sus particulares propiedades superficiales.

Otro tipo de materiales poliméricos empleados como soportes en la construcción de fases sensoras son los intercambiadores iónicos. En general, se trata de materiales sólidos insolubles que contienen cationes o aniones reemplazables por una cantidad estequiométricamente equivalente de iones del mismo signo en contacto con la disolución del electrolito. Su matriz está formada por una red tridimensional de cadenas hidrocarbonadas de carácter hidrófobo, a las que se enlazan ciertos grupos iónicos de distinta fuerza ácida, siendo los grupos sulfonato ($-\text{SO}_3^-$) y los grupos carboxilato ($-\text{COO}^-$) los más comunes en el caso de los intercambiadores catiónicos, que se encuentran disponibles en el mercado en multitud de formas (perlas, membranas, etc.). Las membranas de intercambio iónico ofrecen la ventaja de soportar el reactivo en posiciones concretas y ser accesibles al analito. Además, tanto las moléculas de indicador como las de analito pueden difundir fácilmente hasta las regiones interiores de las partículas, mientras que moléculas de mayor tamaño, como las proteínas, no pueden alcanzarlas, por lo que se evita la posible interferencia de estos compuestos. El principal inconveniente que presentan los intercambiadores iónicos es que su matriz es elástica y se comportan como "células higroscópicas" que se hinchan y se deshinchán de modo reversible con absorción o desorción de humedad.

Aparte del poliestireno, disponible en el mercado en varias formas (perlas, membranas, etc.) y con distintos grupos catiónicos o aniónicos en su superficie, existen otros polímeros hidrófobos como el Nafión (un polietileno parcialmente fluorado con grupos $-\text{HSO}_3$ en su superficie), que permite la inmovilización de indicadores catiónicos. Su excelente estabilidad química y mecánica hace que sea uno de los materiales más populares para este tipo de aplicaciones. Otro tipo de polímeros incluyen la celulosa modificada, copolímeros de estireno/acrilamida y partículas de Látex modificada con grupos carboxilo.

3.5.2 Matrices inorgánicas: Sol-geles y óxidos metálicos

En las últimas décadas se está investigando activamente sobre la obtención de nuevos soportes inorgánicos, sol-gel, que sumen las ventajas de este tipo de soportes (estabilidad, inercia química, rigidez, etc.), a las de los polímeros orgánicos (variedad de monómeros, rutas de síntesis, etc.). Por otro lado, las grandes ventajas que ofrecen los óxidos metálicos nanoestructurados en multitud de campos está haciendo que, cada vez más, aparezcan nuevas membranas inorgánicas de tamaño, porosidad y transparencia perfectamente controlables y, por lo tanto, se tenga una mayor disponibilidad de estos materiales para su uso en el desarrollo de fases sensoras ópticas.

Mediante ambas tecnologías es posible la inmovilización en una matriz inorgánica de una o varias especies que se pueden incorporar a la matriz durante o después del proceso de obtención del material, actuando de igual forma que las membranas poliméricas comentadas anteriormente, pero con las características de los materiales inorgánicos. Además, debido a que durante el proceso de síntesis se puede controlar su porosidad, estos materiales proporcionan fases sensoras más sensibles y estables con respecto a las poliméricas.

La popularidad del vidrio se debe al hecho de que su superficie puede alterarse con facilidad mediante un tratamiento químico adecuado, de forma que prácticamente cualquier indicador con propiedades hidrófilas o hidrófobas puede unirse covalentemente a su superficie. Por otra parte, el vidrio presenta la ventaja de que no se hincha en soluciones acuosas y además proporciona una cierta selectividad al encontrarse disponible en partículas de poro controlado. Sin embargo, el principal inconveniente del vidrio es su fragilidad.

Los recientes avances en la tecnología de fabricación de cerámicas han hecho posible modelar vidrios porosos de sílice a temperatura ambiente según el llamado proceso sol-gel que posee un gran potencial para la obtención de fases reactivas de sensores químicos sin más que seleccionar los reactivos adecuados. La técnica de fabricación del sol-gel consiste en la hidrólisis de tetraalcoxilanos en disoluciones hidroalcohólicas, para producir una suspensión coloidal (sol), que al condensar produce el gel, y que tras su secado y pérdida del disolvente produce un xerogel. De esta forma, se consiguen "dopar" los vidrios de sílice con compuestos de diversa naturaleza, introduciéndolos junto a los reactivos de polimerización y quedando así atrapados en las cavidades del futuro vidrio; al mismo tiempo es posible su interacción con especies solubles que acceden a ellos a través de los poros del vidrio. El proceso sol-gel es un método atractivo para la inmovilización de moléculas en matrices de sílice por su preparación a

temperatura ambiente, posibilidad de atrapar gran cantidad de reactivo y sencillez. La inmovilización de las moléculas óptimamente activas en la matriz del sol-gel se puede llevar a cabo por diversos métodos:

- Dopaje químico: la molécula que se pretende retener, se añade junto a los monómeros al inicio de la polimerización, quedando atrapada en el interior poroso del sol-gel.
- Inmovilización química: mediante la formación de enlaces covalentes entre la molécula a inmovilizar y los grupos silanol.
- Impregnación: sumergiendo el soporte poroso en una disolución concentrada de la molécula a retener que queda adsorbida físicamente en los poros del material inorgánico.
- Copolimerización: empleando monómeros alcoxisilanos modificados, los cuales contienen la molécula a retener enlazada covalentemente.

Los óxidos metálicos nanoestructurados están basados en la dispersión de partículas de óxidos metálicos sobre un polímero. Los óxidos más utilizados son AlOOH , SiO_2 , ZrO_2 y TiO_2 , y el polímero que se utiliza para fijar estos aglomerados o nanopartículas sobre un soporte inerte es el alcohol polivinílico. Sus características han permitido su desarrollo en multitud de aplicaciones, ya que posee un gran poder conductor, apropiado índice de refracción, transparencia, estabilidad y su principal característica: la posibilidad de obtener diferentes tamaños de poros y por tanto variar su interacción con la materia y/o la energía. Además, se pueden generar membranas multicapa con diferentes características físico-químicas. La obtención de estos óxidos metálicos nanoestructurados está ampliamente desarrollada debido al gran interés que despiertan estos materiales en campos tan relevantes como la microinformática, robótica, sensores electroquímicos, etc., permitiendo obtener multitud de materiales con características totalmente diferentes en función del óxido metálico usado así como el proceso de síntesis. Un tipo de óxido metálico muy concreto que ha dado muy buenos resultados en la preparación de fases sensoras ópticas ha sido desarrollado por la empresa *Ilford Imaging Switzerland*, este genera membranas nanoporosas en las que se puede controlar el tamaño, volumen y carga de los poros y se pueden incorporar reactivos selectivos a las especies a determinar, estabilizándolos, disminuyendo los tiempos de respuesta y mejorando su sensibilidad^{56a, 66}. Se ha demostrado que los óxidos metálicos incrementan la sensibilidad de reactivos luminiscentes hasta 40 veces con respecto a su sensibilidad cuando son incorporados en membranas poliméricas⁶⁷. Además, proporcionan gran estabilidad frente a la fotodescomposición y aumentan la estabilidad en condiciones normales debido a la baja probabilidad de la formación de aglomerados y precipitación de reactivos en los nanoporos⁶⁸. Pueden ser esterilizados mediante autoclave y/o rayos gamma sin pérdida significativa de su actividad sensora^{56b}. Otra característica de estos óxidos metálicos es la posibilidad de incorporación de dos o más reactivos sin que se produzcan aglomerados, permitiendo procesos físico-químicos reversibles entre ellos, como procesos de transferencia de energía (FRET)^{66c, 67} y de transferencia de protones^{56a}, lo que abre nuevas posibilidades y un futuro prometedor en el desarrollo de sensores ópticos. En el Capítulo 2 de esta Tesis Doctoral se ha utilizado un soporte

nanoestructurado llamado AP200/19^{66c}, consistente en una fina lámina de polietilentereftalato (PET) cubierto con una fina capa de óxido hidróxido de aluminio (AlOOH) en el que, tras la inmovilización en sus nanoporos de una serie de especies ópticamente activas (complejos organometálicos de cobre, sensibles a O₂), se ha conseguido determinar satisfactoriamente O₂ con sensibilidades y tiempos de respuesta superiores a los conseguidos con las membranas poliméricas.

3.5.3 Polímeros de impronta molecular (MIPs)

Los polímeros de impronta molecular (MIPs) se pueden definir⁶⁹ como “*polímeros tridimensionales con huecos específicos, inducidos por una molécula molde, que sirven para el reconocimiento molecular y que dan lugar a un material, donde el molde dirige la disposición y orientación de los componentes que lo forman, mediante un mecanismo de autoensamblaje*”. Es decir, se trata de materiales biomiméticos que reproducen de un modo más básico el mecanismo de reconocimiento de los sistemas biológicos (hormona-receptor, enzima-sustrato, antígeno-anticuerpo). Por tanto, la tecnología MIP consiste en desarrollar un material polimérico capaz de interactuar selectivamente con una molécula o ion, actuando como “cerradura” ante un analito “llave”, similar al modelo de Fischer⁷⁰.

Para preparar un MIP, lo más usual es usar un proceso de polimerización radicalaria, donde uno o varios tipos de componentes formadores de polímero (monómeros funcionales), se sitúan en una configuración complementaria a la molécula molde, tanto para la formación de enlaces covalentes como para la auto-asociación, que junto con un entrecruzador y un disolvente porógeno, forman lo que se conoce como el *complejo de prepolimerización*. Este, una vez que se inicia la reacción radicalaria mediante la adición de un iniciador de radicales, da lugar a un polímero tridimensional y entrecruzado que contiene a la molécula molde en su estructura. Una vez finalizada la polimerización y tras la extracción del molde, por lavado con disolventes o una combinación de tratamiento químico y lavado, se crean cavidades en el interior del polímero que son complementarias en tamaño, forma geométrica y orientación de grupos funcionales, a la molécula usada como molde. Estos sitios vacantes con la impronta están entonces disponibles para volver a unir al molde o a sus análogos estructurales.

Las interacciones entre la molécula molde y los monómeros que dan lugar al complejo de prepolimerización pueden ser de dos tipos:

Los MIPs obtenidos por **vía covalente**, desarrollada por G. Wulff⁷¹, se basan en la interacción covalente entre la molécula molde y uno o varios monómeros funcionales usados en la polimerización⁷². De forma que al extraer la molécula molde, estos grupos funcionales quedan libres y son susceptibles de volver a unirse con ella durante el proceso de reconocimiento molecular.

Los MIPs obtenidos por **vía no covalente**, introducida por K. Mosbach⁷³, se basan en interacciones no covalentes, tales como pares iónicos, interacciones dipolo-dipolo, enlaces de

hidrógeno, interacciones hidrofóbicas y fuerzas de Van der Waals; generando aductos entre la molécula molde y los monómeros funcionales.

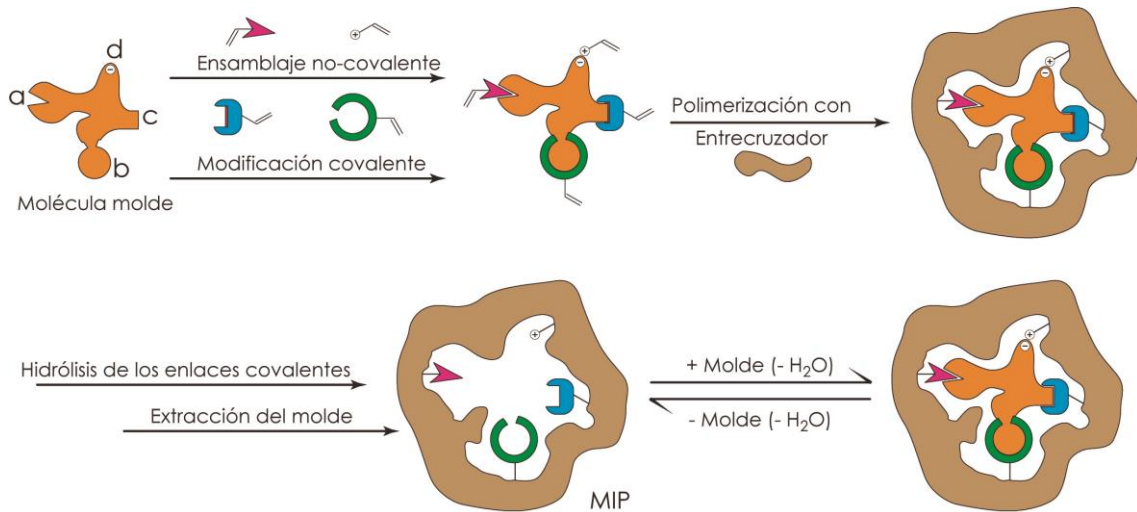


Figura 8. Representación esquemática de los procesos de impronta molecular.

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

Por último, el porógeno o mezcla de los mismos (disolventes que forman poros al evaporarse) juega un papel importantísimo en la formación y estabilización de la estructura porosa del MIP, además de ser el medio de solubilización tanto de la molécula molde, como de los monómeros y de las cadenas poliméricas en crecimiento que se van formando durante el proceso de polimerización.

La Figura 8 muestra algunas de las interacciones usuales en la creación de afinidad en los sitios de unión para la molécula molde. Las interacciones con grupos funcionales (a-d) del molde representan las siguientes estrategias de impresión: (a) Enlace de hidrógeno no covalente; (b) interacción covalente reversible; (c) método semicovalente (espaciador sacrificado); (d) interacción electrostática con un monómero cargado con carga opuesta. La liberación y re-enlace del molde con el polímero final conlleva una reacción sencilla de condensación/hidrólisis en el sitio de unión. La eliminación del molde conlleva un proceso químico como la hidrólisis, si es necesario romper enlaces covalentes. Si el re-enlace (de la nueva molécula molde, o analito) conlleva una condensación (impronta covalente), se liberarán una o más moléculas de agua en la unión del molde.

Existen diferentes técnicas para obtener un MIP. Las más habituales son las siguientes:

3.5.3.1 Polimerización en bloque

También conocidos como *BulkMIPs*⁷⁴, consiste en mezclar todos los componentes del MIP (monómeros funcionales, entrecruzador, iniciador de radicales y molécula molde) en ausencia de cualquier disolvente orgánico. Por tanto, deben ser solubles unos en otros, obteniéndose solo una fase. De esta forma se obtiene un material poco poroso, ya que no se sintetiza en presencia de ningún disolvente porógeno. Este tipo de MIP es poco usado en el campo de los sensores químicos debido a la dificultad de extracción del molde y a la limitación que supone tener que usar compuestos que deban ser solubles entre sí.

3.5.3.2 Polimerización en disolución

Consiste en mezclar todos los componentes del MIP con un disolvente orgánico o una mezcla de ellos. Estos disolventes orgánicos tienen dos funciones principales: por un lado la solubilización de los componentes iniciales así como de los subproductos de la polimerización, y por otro lado generar poros (acción porógena) que hagan aumentar la superficie activa del polímero. En función de la mezcla de disolventes y del volumen usados se puede controlar la solubilización de los diferentes productos de polimerización, de manera que se forme una red tridimensional en bloque (**polimerización en disolución en bloque**, **polimerización en monolito**⁷⁵ o **monolith polymerization**), o bien permitiendo la solubilización hasta un cierto peso molecular a partir del cual precipita el polímero obtenido, al ser insoluble en el medio en el que se encuentra (**polimerización por precipitación**)⁷⁶.

3.5.3.3 Polimerización en suspensión

La polimerización en suspensión⁷⁷ se produce combinando dos fases: una discontinua, compuesta por un disolvente orgánico hidrofóbico donde se encuentra la mezcla de polimerización, y otra continua, compuesta por un disolvente hidrofílico (normalmente agua) que está en mayor proporción. Así, mediante el uso de agentes químicos y/o bien mediante aplicación de energía, dentro de la fase continua se van formando pequeñas gotículas de la fase discontinua en las que se produce la polimerización, obteniéndose partículas de MIP de tamaño y forma similar a las gotículas formadas. Por tanto, dentro de esta técnica de preparación de MIPs podemos destacar tres tipos: **polimerización por emulsión**⁷⁸, **polimerización por miniemulsión**⁷⁹ y **polimerización por microemulsión**⁸⁰.

La polimerización en suspensión está teniendo gran relevancia en la actualidad para la fabricación de micro y nanopartículas de MIPs de formas y tamaños controlables. Además, en conjunción con otras técnicas, permite la obtención de nano o micropartícula multicapa o tipo "core-shell", en las que además de las propiedades típicas del MIP, se pueden incluir propiedades extra, como por ejemplo propiedades magnéticas.

3.5.3.4 Polimerización en fase sólida

En este tipo de polimerización alguno de los compuestos iniciales está soportado químicamente sobre una fase sólida, propiciando la polimerización sobre su superficie. Dentro de la polimerización en fase sólida destacan dos tipos: **polimerización por implantación**⁸¹ (*grafting imprinting*), cuando el iniciador de radicales une covalentemente al soporte sólido

poroso (véase la Figura 9), y la denominada **polimerización jerarquizada**⁸² (*hierarchical imprinting*), cuando lo que se une al soporte sólido es la molécula molde (véase la Figura 10).

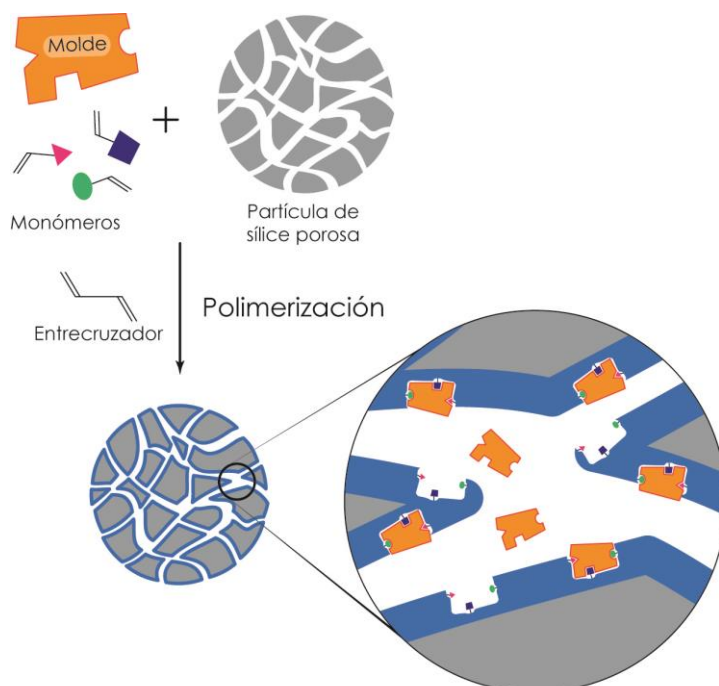


Figura 9. Simulación de la técnica de "grafting imprinting", donde se obtiene una partícula cuya porosidad está recubierta por un MIP.

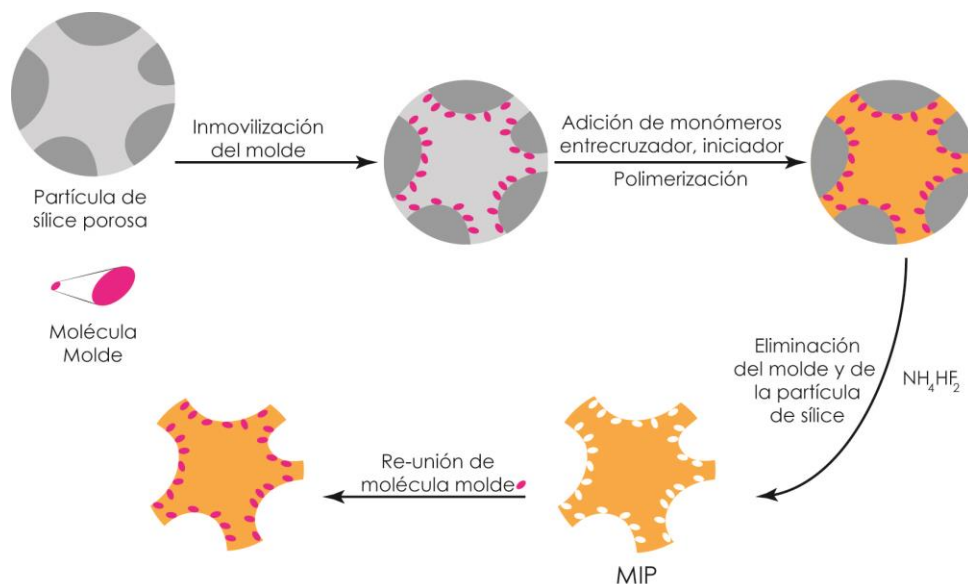


Figura 10. Simulación de la técnica de *hierarchical imprinting*, donde se representa una partícula de sílice inicial y, tras su disolución, la partícula MIP obtenida.

3.5.4 Materiales híbridos nanoestructurados: orgánico-inorgánico y orgánico-inorgánico-biomolécula

En los últimos años se ha invertido un gran esfuerzo investigador en el desarrollo de nanomateriales híbridos multifuncionales en diferentes formatos (nanopartículas, nanofibras))⁸³, destinados a su aplicabilidad en distintos campos de la ciencia, como son la biomedicina⁸⁴, la biocatálisis⁸⁵, la microelectrónica⁸⁶, el desarrollo de biosensores⁸⁷, etc.

Dentro del término *material híbrido nanoestructurado* quedan englobados una gran variedad de materiales nanométricos multifuncionales con una amplia gama de propiedades.

En lo que respecta al desarrollo de fases sensoras, son muchas las posibilidades que ofrecen los materiales híbridos. Entre los más representativos actualmente se encuentran los que incorporan propiedades magnéticas para facilitar su implementación en fibras ópticas⁵⁸ o sensores tipo microchip⁸⁸.

3.5.4.1 Nanopartículas magnéticas preparadas por miniemulsión- evaporación y por precipitación- evaporación usando copolímeros lineales

La preparación de este tipo de nanofases sensoras se basa en el procesado, mediante las técnicas de miniemulsión y precipitación, de un ferrofluido totalmente estable. Este ferrofluido se prepara dispersando nanopartículas de magnetita de entre 15 y 25 nm, estabilizadas con un surfactante adecuado, en una disolución que contiene un polímero lineal y los reactivos necesarios para el reconocimiento químico. Los polímeros lineales utilizados pueden ser previamente sintetizados u obtenidos de forma comercial. Durante la preparación de este tipo de nanofases sensoras no se utiliza ningún tipo de proceso o reacción química compleja, como puede ser cualquier tipo de reacción de polimerización, lo cual agiliza y facilita la preparación y optimización de este tipo de materiales.

Las técnicas usadas para preparar este tipo de materiales son la miniemulsión- evaporación y la precipitación- evaporación.

3.5.4.1.1 Miniemulsión- evaporación

Esta técnica se basa en la preparación de miniemulsiones O/W (oil/water) o W/O en las cuales, la fase discontinua es el ferrofluido comentado anteriormente. Una vez conseguida esta miniemulsión, se procede a la evaporación del disolvente, lo que conduce a la formación de nanopartículas poliméricas, en cuya estructura incluyen la magnetita y los compuestos para el reconocimiento químico. La Figura 11 muestra: (A) un esquema del procedimiento de preparación de nanofases sensoras magnéticas sensibles a O₂ mediante miniemulsión O/W y posterior evaporación del disolvente; fotografías de SEM (B y C) de nanofases sensoras magnéticas preparadas por esta metodología, utilizando un copolímero lineal de alto peso molecular (240000 Mw) de estireno-co-anhídrido maleico; y la fotografía de SEM (D) de una nanofase sensora magnética preparada con poli(ES-co-MA) de bajo peso molecular (14400 Mw).



Figura 11. (A) Esquema de preparación de nanopartículas híbridas por miniemulsión-evaporación y fotografías SEM (B, C y D) de nanofases sensoras magnéticas preparadas por esta metodología.

3.5.4.1.2 Precipitación-evaporación

Esta técnica se basa en la precipitación de polímeros lineales para la obtención de nanopartículas. Su fundamento consiste en un cambio brusco e instantáneo de las interacciones polímero-disolvente, provocando la precipitación del polímero lineal que previamente ha sido disuelto en un disolvente adecuado.

Así, en primer lugar, el polímero lineal se disuelve en un disolvente muy afín a este, donde las interacciones polímero-disolvente son muy elevadas. Posteriormente se induce la precipitación del polímero lineal por adición sobre un mal disolvente para el mismo. En esta técnica, por tanto, es imprescindible que ambos disolventes (el utilizado para disolver el polímero y el utilizado para precipitarlo), sean miscibles entre sí. Además, el disolvente utilizado para disolver el polímero tiene que estar en baja proporción respecto al disolvente utilizado para precipitarlo.

En el caso de la precipitación de polímeros hidrofóbicos, uno de los sistemas de disolventes más estudiado y utilizado es tetrahidrofurano/agua⁵⁷. La Figura 12 muestra (A) un esquema de preparación de nanofases sensoras magnéticas por la técnica de precipitación-evaporación, y (B) una foto de microscopía electrónica de barrido de nanofases sensoras magnéticas sensibles a O_2 preparadas con esta técnica, usando poli (ES-co-MA) de alto peso molecular (240000 Mw).

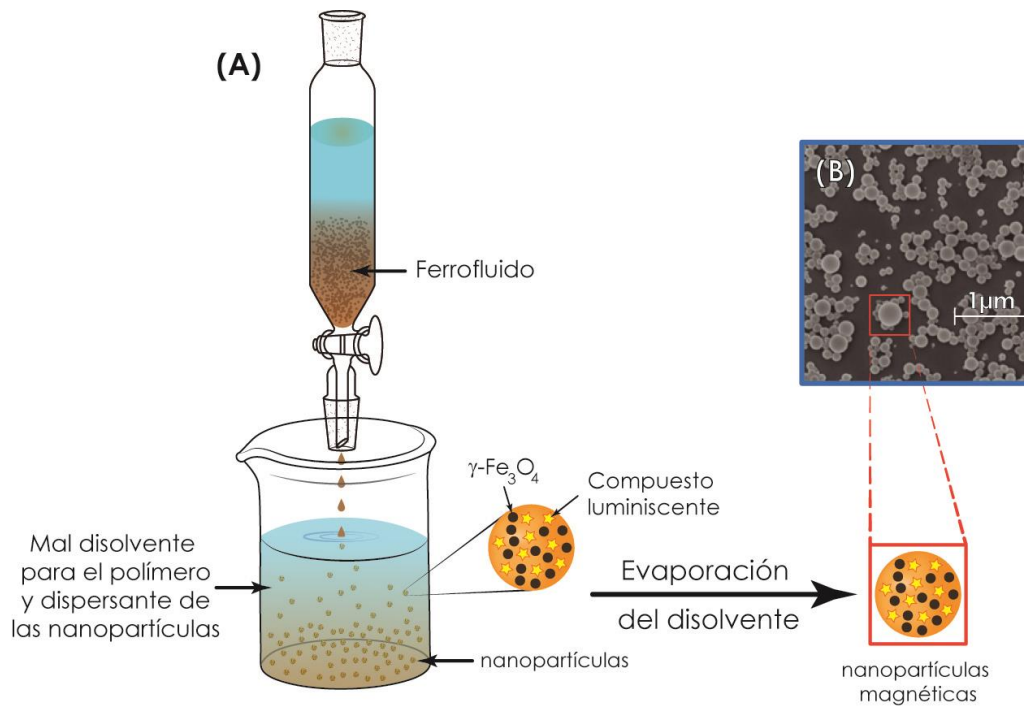


Figura 12. (A) Esquema de preparación de nanopartículas híbridas por la técnica de precipitación-evaporación y (B) fotografía SEM de nanofases sensoras magnéticas sensibles a O_2 preparadas por esta metodología.

Uno de los polímeros más usados en el desarrollo de fases sensoras con las técnicas de miniemulsión-evaporación y precipitación-evaporación es el poli(ES-co-MA), debido a que los grupos anhídrido se pueden hidrolizar fácilmente, aportando un cierto carácter hidrofílico a estas partículas, que facilita su suspensión en medios acuosos (véase la Figura 13).

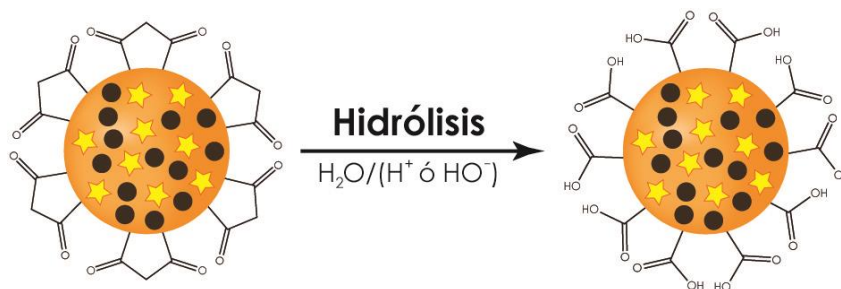


Figura 13. Hidrólisis de los grupos anhídrido de la superficie de las nanofases sensoras lipofílicas magnéticas.

3.5.5 Nanofibras preparadas por electrohilado de polímeros lineales

La técnica de atomización electrohidrodinámica consiste, básicamente, en la inyección lenta de un fluido conductor, a través de una aguja electrificada. Este hilo conductor puede estar formado por un polímero lineal disuelto en un disolvente adecuado; a veces es necesario el uso de aditivos en pequeñas concentraciones con el objeto de modificar la polaridad del líquido conductor.

Para un intervalo apropiado de valores del caudal inyectado y de la diferencia de potencial eléctrico aplicado entre la aguja y un conductor conectado a tierra, el menisco electrificado adopta la forma de un *cono de Taylor* estacionario, desde cuyo vértice se emite un chorro que rompe *aguas abajo*, por inestabilidades capilares, formando un *espray* de gotas cargadas, denominado *electrospray*, como el que se observa en la Figura 14. También se pueden producir chorros simples o coaxiales electrificados de tamaño micro y nanométrico. Esta técnica se denomina *electrospinning*⁸⁹ (ver Figura 15).

El electrohilado ya se ha aplicado con éxito en la síntesis de nanopartículas de estructura compleja (nanocápsulas, nanoesferas huecas, nanotubos y nanofibras coaxiales), de interés potencial en campos de la Tecnología como son: biotecnología, farmacia, electrónica de alta velocidad, materiales avanzados, etc. Algunas de las nanoestructuras generadas con esta tecnología se muestran en las fotografías de la Figura 16.

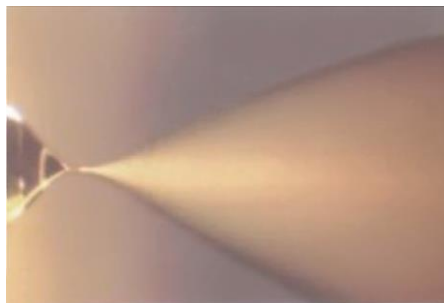


Figura 14. Cono de Taylor, chorro y *espray* de gotas cargadas.

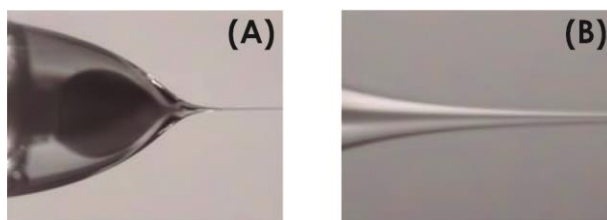


Figura 15. Electrospinning coaxial o coelectrospray. (A) Menisco estructurado donde un polímero fluye por el exterior y tinta comercial por el interior. (B) Vista ampliada del extremo del chorro coaxial.

Con las técnicas electrohidrodinámicas se pueden diseñar, sintetizar y procesar una gran variedad de copolímeros lineales, para preparar nanomateriales como nanofibras (tanto huecas como coaxiales), nanopartículas (huecas o tipo *core-shell*), etc.

La ventaja de estos métodos, frente a otros existentes, radica en que los materiales de estructura compleja se preparan en una sola etapa, en lugar de las tres o cuatro que habitualmente pueden ser necesarias por otras metodologías. Además, estas técnicas permiten tener un elevado control de los sistemas, por lo que se pueden preparar materiales avanzados de estructura compleja (nanotubos coaxiales, nanoesferas huecas, etc.), que serían muy difíciles de fabricar por otras técnicas, tanto físicas como químicas. Otra de las ventajas por las que

destaca esta tecnología es que, al generar los chorros mediante campos eléctricos, sus diámetros, y por tanto el de las nanopartículas, pueden ser mucho menores que los obtenidos mediante otras técnicas también basadas en generación y control de chorros líquidos. Esta reducción de tamaño es esencial para aplicaciones en multitud de campos de la Nanotecnología.

Por lo tanto estas técnicas tienen un elevado potencial en la preparación de materiales multifuncionales avanzados, con un alto grado de control, para su aplicación en cualquier ámbito de la ciencia. Por ejemplo en el campo de las fases sensoras ópticas, utilizando estas técnicas se pueden desarrollar fases sensoras multifuncionales en multitud de formatos, como nanopartículas, partículas tipo core-shell, nanofibras, nanofibras coaxiales, etc. Esto se puede hacer utilizando polímeros lineales previamente sintetizados que posean propiedades especiales; que aumente o disminuya su luminiscencia con cambios en las propiedades físicas del medio, como pueden ser pH o temperatura; o al variar la concentración de un analito determinado. También se pueden utilizar polímeros sin propiedades ópticas y encapsular en su interior los compuestos químicos necesarios para el reconocimiento químico.

La investigación y los avances producidos en el desarrollo de estas técnicas, en conjunción con el conocimiento y los avances en la síntesis de nuevos polímeros con propiedades a la carta, está siendo y será, sin duda alguna, en un futuro cercano, una de las herramientas más potentes en la investigación y el desarrollo de nuevos materiales multifuncionales avanzados, con aplicaciones muy importantes y relevantes en muchos ámbitos de la ciencia.

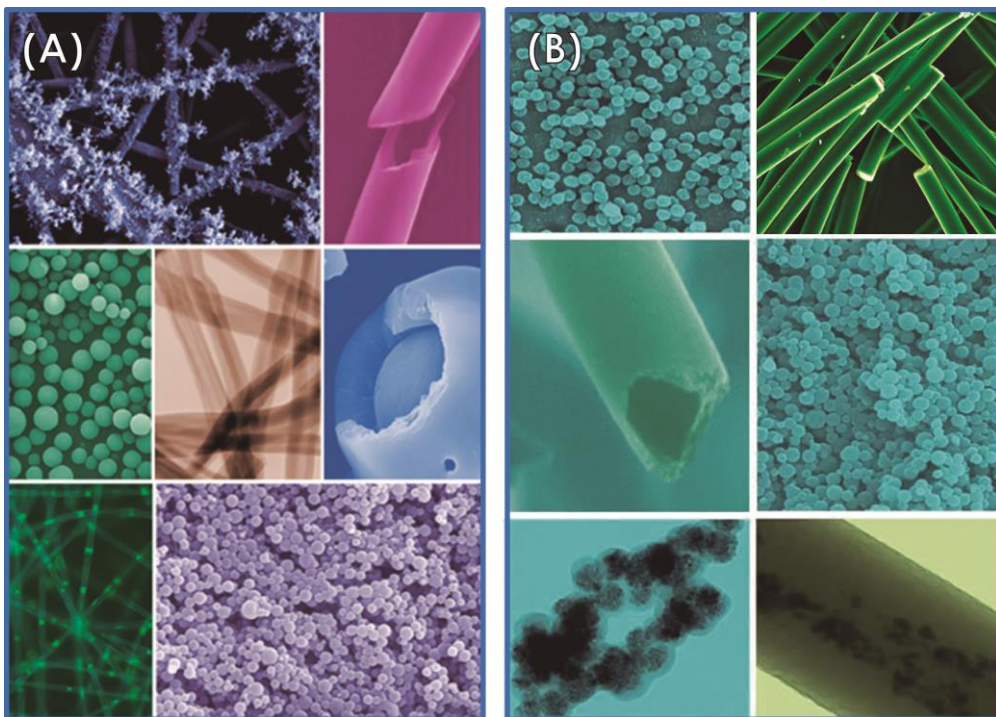


Figura 16. Diferentes productos obtenidos mediante tecnología perteneciente a las empresas (A) Yflow; y (B) nanomyp.

3.5.6 Técnicas de inmovilización del reactivo ópticamente activo

Una vez seleccionados el indicador y el soporte óptimos, la preparación de la fase sensora se lleva a cabo normalmente mediante la incorporación del indicador en el soporte elegido. El proceso de inmovilización del elemento de reconocimiento en el soporte es una etapa clave en el desarrollo del sensor e influirá de forma crítica en su funcionalidad, de forma que pueden verse afectados algunos factores, tales como las propiedades espectrales del indicador, su reactividad, o el tiempo de respuesta.

Aunque muchos de los procedimientos de inmovilización son comunes para indicadores y biomoléculas en general, la inmovilización de indicadores y reactivos se puede llevar a cabo en condiciones más drásticas que las requeridas para las enzimas. Además, la química de la inmovilización en el caso de los indicadores no se limita a reacciones en disolución acuosa, necesarias en el caso de las enzimas.

La elección de la técnica dependerá de la naturaleza del elemento a inmovilizar, el tipo de transductor/soporte sólido, las propiedades fisicoquímicas del analito (dimensiones, composición química, dominios hidrofílicos e hidrofóbicos) y las condiciones de trabajo del sensor. En general, podemos distinguir entre métodos físicos y métodos químicos⁹⁰ (Figura 17).



Figura 17. Métodos de inmovilización de moléculas.

3.5.6.1 Métodos de inmovilización física

En principio, los métodos físicos de inmovilización son completamente reversibles, basados en interacciones de tipo electrostático, formación de enlaces iónicos o interacciones proteína-proteína, entre otras. Se pueden subdividir a su vez en: adsorción, atrapamiento y encapsulación.

a) Adsorción

Es la técnica de inmovilización más sencilla. El indicador o biomolécula se encuentra retenido en el soporte por simples fuerzas de Van der Waals, interacciones dipolo-dipolo o por

enlaces de hidrógeno. La ventaja de esta técnica reside en el hecho de que no requiere el empleo de ningún reactivo adicional, por lo que se reduce el peligro de contaminación de la muestra. Sin embargo, presenta el inconveniente de que puede ser reversible y variable, por lo que cualquier variación de las condiciones experimentales (pH, temperatura, fuerza iónica, etc.), pueden provocar la lixiviación del indicador. Además, la densidad de moléculas inmovilizadas sobre la superficie suele ser inferior a otros métodos de inmovilización alternativos.

Una estrategia utilizada para aumentar la adsorción, especialmente útil en los biosensores electroquímicos, consiste en electrodepositar el elemento de reconocimiento sobre la superficie metálica de un electrodo⁹¹. Para ello se aplica un sobrepotencial durante un tiempo limitado en un área restringida, lo que permite una deposición selectiva. En general, debido a la naturaleza de la unión conseguida mediante adsorción, tanto la orientación espacial de las moléculas inmovilizadas, como la accesibilidad de los analitos y sustratos a los lugares de unión de las mismas, se encuentran sometidas al azar.

Algunos de los soportes empleados para este tipo de inmovilización son las resinas de intercambio iónico, el poliestireno, el gel de sílice, la alúmina, el carbón activado, o metales como oro, plata amalgamada y mercurio, entre otros.

b) Atrapamiento⁹²

Consiste en la retención física del elemento de reconocimiento en las cavidades interiores de una matriz sólida porosa, constituida generalmente por polímeros entrecruzados como pueden ser poliacrilatos, poliacrilamidas, polimetacrilatos, poliuretanos, etc. Con esta estructura, las moléculas de analito pueden difundir hacia el indicador pero este no puede salir.

En general, este método de inmovilización puede llevarse a cabo de diferentes formas, como la polimerización interfacial, la simple evaporación del disolvente, el atrapamiento en una matriz polimérica y la retención mediante membranas.

Se han utilizado distintas membranas semipermeables como medio de atrapamiento, del tipo acetato de celulosa, policarbonatos, teflón, Nafión y poliuretanos. Presentan la ventaja de preservar la configuración y actividad de las moléculas inmovilizadas, aunque introducen barreras difusionales que normalmente afectan a los tiempos de respuesta de los sensores. En los últimos años están cobrando también gran interés los sistemas de atrapamiento a través de procesos **sol-gel**, dada la facilidad de preparación y la elevada estabilidad que se consigue. Los alcoxisilanos producidos, generan en medio ácido una red sólida de estructura comparable a los cristales convencionales, con un tamaño de poro y grosor controlable⁹³.

c) Encapsulación

Permite la inclusión de moléculas en una cavidad esférica o microcápsula porosa que permite el paso de analitos de pequeño tamaño, pero que impiden escapar al reactivo que

contienen en su interior. Los materiales empleados para la microencapsulación suelen ser nylon o poliuretano, entre otros.

3.5.6.2 Métodos de inmovilización química

La inmovilización por métodos químicos, dada su naturaleza irreversible, da lugar a una mayor estabilidad del reactivo inmovilizado, pues supone la unión covalente entre el indicador y el soporte funcionalizado. Existen dos tipos de inmovilización química: entrecruzamiento y unión covalente.

d) Entrecruzamiento

Se trata de un tipo de inmovilización química que requiere el uso de agentes bifuncionales que, al polimerizar, quedan retenidos dentro del soporte debido al entrecruzamiento producido. Estos reactivos son completamente insolubles en agua y se adsorben fácilmente sobre superficies sólidas.

e) Unión covalente⁹⁴

Generalmente se trata de la más irreversible de las técnicas de inmovilización. Su aplicación requiere la presencia de grupos funcionales adecuados, como grupos amino, grupos carboxílicos, alcoholes, tioles o grupos imidazol; tanto en el soporte, como en el indicador. Los pasos a seguir generalmente implican tres etapas: (1) activación del soporte polimérico y/o indicador, para crear una función suficientemente reactiva; (2) reacción de acoplamiento, y (3) eliminación del exceso de reactivo.

Las desventajas de este método son la dificultad y laboriosidad de preparación. Además, la unión puede tener lugar a través del grupo reactivo del indicador, con la consiguiente desactivación del mismo; o bien pueden sufrir cambios conformacionales que modifiquen su afinidad por el analito.

En los sensores ópticos, el sustrato que más se emplea como superficie de inmovilización es el vidrio y en este caso la mayoría de los métodos de inmovilización utilizan silanos, que proporcionan una molécula fácilmente modificable y sirven además como grupos activables.

4. Eliminación de haluros en medio acuoso

4.1 Haluros en medio acuoso y sus inconvenientes

La potabilización de agua requiere ciertos procesos de eliminación de microorganismos patógenos que suponen un alto riesgo para la salud humana. La gran mayoría se pueden eliminar mediante técnicas físicas de tratamiento de agua, como son las floculación-coagulación, sedimentación y filtración. Una etapa final de desinfección garantiza la seguridad del agua potable, que se realiza por tratamiento con oxidantes fuertes, tales como cloro, dióxido de cloro, cloraminas y ozono. Sin embargo, el uso de estos potentes oxidantes presenta un inconveniente: la formación de subproductos tóxicos de desinfección. Desde que Rook⁹⁵ descubrió este hecho en 1974 y lo relacionó con efectos adversos para la salud⁹⁶, se han identificado cientos de subproductos⁹⁷ de desinfección potencialmente tóxicos. La mayoría son derivados halogenados⁹⁸, consecuencia de las reacciones de oxidación de la materia orgánica disuelta, junto con otras especies inorgánicas, tales como el bromuro y yoduro, presentes de forma natural en la mayoría de las aguas⁹⁹. La concentración de estos haluros depende principalmente de la geoquímica de los materiales con los que el agua ha entrado en contacto¹⁰⁰. Por ejemplo, en aguas superficiales y subterráneas de zonas costeras su concentración suele ser bastante alta, aunque la actividad biológica de microorganismos y algas marinas puede contribuir a la eliminación de yoduro de fuentes de agua a través de procesos metabólicos específicos¹⁰¹.

El ion bromuro no se considera tóxico a las concentraciones en las que se suele encontrar en la mayoría de los acuíferos, sin embargo su presencia es potencialmente peligrosa, debido a que puede reaccionar con una gran variedad de desinfectantes comunes¹⁰², como cloro, cloraminas u ozono, formando subproductos de desinfección. Por ejemplo, cuando se oxida con ozono¹⁰³ o grupos hidroxilo genera bromatos, que son muy tóxicos para la salud humana. De hecho, la Agencia Internacional de Investigación del Cáncer ha catalogado al bromato dentro del Grupo 2B, como sustancia posiblemente carcinógena, y la Organización

Mundial para la Salud ha establecido su concentración máxima permitida en aguas de consumo en 25 µg/L¹⁰⁴.

El cloro y las cloraminas reaccionan rápidamente tanto con el bromuro como con el yoduro, oxidándolos a ácido hipobromoso (HBrO)¹⁰⁵ y ácido hipoyodoso (HIO), respectivamente. En contacto con la materia orgánica¹⁰⁶ disuelta dan lugar a ácidos haloacéticos (AHAs) y trihalometanos (THMs)¹⁰⁷, entre los que se encuentra el yodoformo, que proporciona un olor y sabor desagradables¹⁰⁸ al agua. Se cree que los Yodo-trihalometanos son más tóxicos que sus análogos clorados y bromados¹⁰⁹; aunque aún existen pocos estudios relativos a sus medidas en agua de consumo, por lo que no existe mucha información sobre toxicidad. En estudios recientes¹¹⁰, se han identificado por primera vez los ácidos yodados como subproductos de desinfección en agua de consumo, utilizando cloraminas como desinfectante. Existe una emergente preocupación sobre estos nuevos subproductos ácidos yodados, porque el ácido yodoacético es altamente citotóxico y más genotóxico que los ácidos bromoacéticos¹¹¹.

Los trihalometanos (THMs) y los ácidos haloacéticos (HAAs) son los subproductos más abundantes presentes en el agua potable tratada. Por tanto, para evitar la formación descontrolada de esta gran cantidad de subproductos, la mejor estrategia de prevención sería la eliminación de los precursores, antes del proceso de desinfección. Tradicionalmente se ha enfocado en la eliminación de la materia orgánica, con métodos de tratamiento de agua, tales como coagulación mejorada, adsorción sobre carbón activado, membranas de ultrafiltración y nanofiltración, etc. Sin embargo estos tratamientos no eliminan los haluros. Por lo tanto, las estrategias actuales están enfocadas a la eliminación simultánea de precursores, tanto orgánicos como inorgánicos, antes de la desinfección del agua, de una manera sencilla y rentable.

4.2 Técnicas de eliminación de haluros

Se han propuesto diferentes alternativas¹¹² para la eliminación de bromuro y yoduro que pueden clasificarse en tres grandes categorías: técnicas electroquímicas, de membrana y adsorbentes.

Las técnicas electroquímicas se han utilizado para eliminar contaminantes eficientemente de aguas de deshecho y ambientales. Las técnicas electroquímicas abarcan la electrólisis¹¹³, que utiliza el paso de una corriente eléctrica a través de una solución para inducir la descomposición química; y la deionización capacitiva¹¹⁴, donde aplicando una diferencia de potencial eléctrico, los iones se adsorben en los electrodos. El problema es que actualmente su escalado es económicamente inviable.

La tecnología de membrana ha cobrado interés recientemente, convirtiéndose en una tecnología de separación caracterizada por las importantes aplicaciones industriales que posee en la purificación de agua potable de alta calidad. Entre las técnicas de membrana destacan las de ósmosis inversa¹¹⁵, nanofiltración¹¹⁶ y electrodiálisis¹¹⁷. Es una tecnología probada para la

eliminación de una amplia gama de contaminantes, y una de las más eficaces para eliminar bromuro y yoduro, además de ser capaz de eliminar materia orgánica. Sin embargo, es relativamente costosa, requiere tratamiento previo, tiene alto consumo energético y tiene dificultades de escalado, por lo que estos inconvenientes restringen su uso generalizado en plantas de tratamiento de agua potable. Además, el fenómeno de *biofouling*¹¹⁸ o acumulación de microorganismos, representa un gran problema, principalmente en las técnicas de filtrado.

Las técnicas de adsorción para eliminar haluros generalmente son más baratas y fáciles de implementar que las de membrana o electroquímicas, sin embargo su eficiencia de adsorción suele verse afectada por la presencia de aniones competitivos y materia orgánica. Las técnicas de adsorción incluyen óxidos hidratados¹¹⁹, carbones activados¹²⁰, aerogeles de carbón dopado con plata¹²¹, resinas de intercambio iónico¹²² y adsorbentes basados en aluminio¹²³ entre otras. El desarrollo de nuevos adsorbentes de bajo coste y eficaces, que retirasen eficientemente materia orgánica y haluros en presencia de aniones competidores, representaría un importante paso para la eliminación de subproductos de desinfección.

Bibliografía de la Introducción

1. (a) Odian, G., *Principles of Polymerization*. 4th ed.; Wiley: New Jersey, **2004**; (b) Ravve, A., *Principles of Polymer Chemistry*. 3rd ed.; Springer New York: **2012**.
2. Areizaga, J.; Cortázar, M. M.; Elorza, J. M.; Iriun, J. J., *Polímeros*. Editorial Síntesis S. A.: Madrid, **2002**.
3. Elaissari, A., *Colloidal Polymers: Synthesis and Characterization*. CRC Press: New York, **2003**.
4. Hagiopol, C., *Copolymerization: Toward a Systematic Approach*. Springer: New York, **2000**.
5. (a) He, W.; Jiang, H.; Zhang, L.; Cheng, Z.; Zhu, X., Atom transfer radical polymerization of hydrophilic monomers and its applications. *Polymer Chemistry* **2013**, *4* (10), 2919-2938; (b) Patten, T. E.; Matyjaszewski, K., Atom Transfer Radical Polymerization and the Synthesis of Polymeric Materials. *Advanced Materials* **1998**, *10* (12), 901-915; (c) Coessens, V.; Pintauer, T.; Matyjaszewski, K., Functional polymers by atom transfer radical polymerization. *Progress in Polymer Science* **2001**, *26* (3), 337-377; (d) Pyun, J.; Kowalewski, T.; Matyjaszewski, K., Synthesis of Polymer Brushes Using Atom Transfer Radical Polymerization. *Macromolecular Rapid Communications* **2003**, *24* (18), 1043-1059; (e) Matyjaszewski, K., Transition Metal Catalysis in Controlled Radical Polymerization: Atom Transfer Radical Polymerization. *Chemistry – A European Journal* **1999**, *5* (11), 3095-3102; (f) Ran, J.; Wu, L.; Zhang, Z.; Xu, T., Atom transfer radical polymerization (ATRP): A versatile and forceful tool for functional membranes. *Progress in Polymer Science* **2014**, *39* (1), 124-144.
6. Keddie, D. J., A guide to the synthesis of block copolymers using reversible-addition fragmentation chain transfer (RAFT) polymerization. *Chemical Society Reviews* **2014**, *43* (2), 496-505.
7. Braunecker, W. A.; Matyjaszewski, K., Recent mechanistic developments in atom transfer radical polymerization. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical* **2006**, *254* (1-2), 155-164.
8. (a) Li, M.; Jahed, N. M.; Min, K.; Matyjaszewski, K., Preparation of Linear and Star-Shaped Block Copolymers by ATRP Using Simultaneous Reverse and Normal Initiation Process in Bulk and Miniemulsion. *Macromolecules* **2004**, *37* (7), 2434-2441; (b) Min, K.; Li, M.; Matyjaszewski, K., Preparation of gradient copolymers via ATRP using a simultaneous reverse and normal initiation process. I. Spontaneous gradient. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **2005**, *43* (16), 3616-3622.
9. Jakubowski, W.; Matyjaszewski, K., Activator Generated by Electron Transfer for Atom Transfer Radical Polymerization. *Macromolecules* **2005**, *38* (10), 4139-4146.
10. Min, K.; Gao, H.; Matyjaszewski, K., Preparation of Homopolymers and Block Copolymers in Miniemulsion by ATRP Using Activators Generated by Electron Transfer (AGET). *Journal of the American Chemical Society* **2005**, *127* (11), 3825-3830.
11. (a) Caselli, F., Technological Revolutions. *The American Economic Review* **1999**, *89* (1), 78-102; (b) Smith, B. L., The Third Industrial Revolution: Policymaking for the Internet. *Colum. Sci. & Tech. L. Rev.* **2001**, *3*, 45.
12. (a) Cammann, K., Analytical Chemistry — today's definition and interpretation. *Fresenius J Anal Chem* **1992**, *343* (11), 812-813; (b) Danzer, K., Object of Analytical Chemistry. In *Analytical Chemistry*, Springer Berlin Heidelberg: **2007**; pp 1-11.

13. (a) Wolfbeis, O. S., Fiber-Optic Chemical Sensors and Biosensors. *Analytical Chemistry* **2006**, 78 (12), 3859-3874; (b) Nagl, S.; Wolfbeis, O., Classification of Chemical Sensors and Biosensors Based on Fluorescence and Phosphorescence. In *Standardization and Quality Assurance in Fluorescence Measurements I*, Resch-Genger, U., Ed. Springer Berlin Heidelberg: **2008**; Vol. 5, pp 325-346.
14. Wolfbeis, O. S., Chemical sensors — survey and trends. *Fresenius J Anal Chem* **1990**, 337 (5), 522-527.
15. Hulanicki, A.; Geab, S.; Ingman, F., Chemical sensors definitions and classification. *Pure Appl. Chem.* **1991**, 63 (9), 1247-1250.
16. Cammann, G. G.; Guilbault, E. A.; Hall, H.; Kellner, R.; Wolfbeis, O. S., The Cambridge Definition of Chemical Sensors. In *Cambridge Workshop on Chemical Sensors and Biosensors*, Cambridge University Press: New York, **1996**.
17. (a) Janata, J.; Bezegh, A., Chemical sensors. *Analytical Chemistry* **1988**, 60 (12), 62R-74R; (b) Thévenot, D. R.; Toth, K.; Durst, R. A.; Wilson, G. S., Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. *Biosensors and Bioelectronics* **2001**, 16 (1-2), 121-131.
18. (a) Gründler, P., Introduction. In *Chemical Sensors: An Introduction for Scientists and Engineers*, Springer Berlin Heidelberg: **2007**; pp 1-13; (b) Demchenko, A. P., Theoretical Aspects. In *Introduction to Fluorescence Sensing*, Springer Netherlands: **2009**; pp 37-64.
19. (a) Valcarcel, M.; Luque de Castro, M. D., Flow-through (bio)chemical sensors-Plenary lecture. *Analyst* **1993**, 118 (6), 593-600; (b) Valcarcel, M.; Luque de Castro, M. D., Sensors in Analytical Chemistry. In *Techniques and Instrumentation in Analytical Chemistry*, Valcárcel, M.; Luque de, C., Eds. Elsevier: **1994**; Vol. 16, pp 13-47; (c) Costa Fernández, J. M.; Sanz Medel, A., Sensores químicos fosforescentes a temperatura ambiente. In *Fosforescencia molecular analítica: una aproximación práctica*, Schulman, S. G.; Fernández Gutiérrez, A., Eds. Universidad de Granada: Granada, España, **2001**; pp 355-395.
20. (a) Borisov, S. M.; Wolfbeis, O. S., Optical Biosensors. *Chemical Reviews* **2008**, 108 (2), 423-461; (b) Fraden, J., Chemical Sensors. In *Handbook of Modern Sensors*, Springer New York: **2010**; pp 569-606.
21. (a) Orsini, A.; D'Amico, A., Chemical sensors and chemical sensor systems: fundamentals limitations and new trends. In *Advances in Sensing with Security Applications*, Byrnes, J.; Ostheimer, G., Eds. Springer Netherlands: **2006**; Vol. 2, pp 69-94; (b) Calvo, E.; Otero, M., Chemical Sensors. In *Piezoelectric Transducers and Applications*, Vives, A., Ed. Springer Berlin Heidelberg: **2008**; pp 241-257.
22. (a) Butler, P., Smarter packaging for consumer food waste reduction. In *Emerging Food Packaging Technologies*, Yam, K. L.; Lee, D. S., Eds. Woodhead Publishing: **2012**; pp 409-434; (b) Cavallo, J. A.; Strumia, M. C.; Gomez, C. G., Preparation of a milk spoilage indicator adsorbed to a modified polypropylene film as an attempt to build a smart packaging. *Journal of Food Engineering* **2014**, 136 (0), 48-55.
23. (a) Narsaiah, K.; Jha, S.; Bhardwaj, R.; Sharma, R.; Kumar, R., Optical biosensors for food quality and safety assurance—a review. *J Food Sci Technol* **2012**, 49 (4), 383-406; (b) McGrath, T. F.; Elliott, C. T.; Fodey, T. L., Biosensors for the analysis of microbiological and chemical contaminants in food. *Anal Bioanal Chem* **2012**, 403 (1), 75-92; (c) Bidmanova, S.; Hrdlickova, E.; Koudelakova, T.; Damborsky, J.; Prokop, Z., Online Monitoring of Biodegradation Processes Using Enzymatic Biosensors. In *Biodegradative Bacteria*, Nojiri, H.; Tsuda, M.; Fukuda, M.; Kamagata, Y., Eds. Springer Japan: **2014**; pp 155-179; (d) Mortari, A.; Lorenzelli, L., Recent sensing technologies for pathogen detection in milk: A review. *Biosensors and Bioelectronics* **2014**, 60 (0), 8-21; (e) Terry, L. A.; White, S. F.; Tigwell, L. J., The Application of Biosensors to Fresh Produce and the Wider Food Industry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2005**, 53 (5), 1309-1316.
24. (a) Newman, J. D.; Turner, A. P. F., Home blood glucose biosensors: a commercial perspective. *Biosensors and Bioelectronics* **2005**, 20 (12), 2435-2453; (b) Wilson, G. S.; Gifford, R., Biosensors for real-time in vivo measurements. *Biosensors and Bioelectronics* **2005**, 20 (12), 2388-2403; (c) Pickup, J. C.;

- Hussain, F.; Evans, N. D.; Rolinski, O. J.; Birch, D. J. S., Fluorescence-based glucose sensors. *Biosensors and Bioelectronics* **2005**, *20* (12), 2555-2565.
25. Erdem, A.; Muti, M.; Karadeniz, H.; Congur, G.; Canavar, E., Electrochemical Biosensors for Screening of Toxins and Pathogens. In *Portable Chemical Sensors*, Nikolelis, D., Ed. Springer Netherlands: **2012**; pp 323-334.
26. Galli Mainini, C., Reacción diagnóstica de embarazo en la que se usa el sapo macho como animal reactivo. *La Semana médica* **1947**, *54* (12), 337-340.
27. Debnath, M.; Prasad, G. K. S.; Bisen, P., DNA Biosensors. In *Molecular Diagnostics: Promises and Possibilities*, Springer Netherlands: **2010**; pp 209-225.
28. Durrieu, C.; Lagarde, F.; Jaffrezic-Renault, N., Nanotechnology Assets in Biosensors Design for Environmental Monitoring. In *Nanomaterials: A Danger or a Promise?*, Brayner, R.; Fiévet, F.; Coradin, T., Eds. Springer London: **2013**; pp 189-229.
29. (a) Rogers, K.; Koglin, E., Biosensors for Environmental Monitoring: An EPA Perspective. In *Biosensors for Direct Monitoring of Environmental Pollutants in Field*, Nikolelis, D.; Krull, U.; Wang, J.; Mascini, M., Eds. Springer Netherlands: **1997**; Vol. 38, pp 335-349; (b) Farré, M.; Rodríguez-Mozaz, S.; Alda, M.; Barceló, D.; Hansen, P.-D., Biosensors for Environmental Monitoring at Global Scale and the EU Level. In *Biosensors for Environmental Monitoring of Aquatic Systems*, Barceló, D.; Hansen, P.-D., Eds. Springer Berlin Heidelberg: **2009**; Vol. 5J, pp 1-32; (c) Rodríguez-Mozaz, S.; Lopez de Alda, M.; Barceló, D., Biosensors as useful tools for environmental analysis and monitoring. *Anal Bioanal Chem* **2006**, *386* (4), 1025-1041.
30. (a) Farré, M.; Barceló, D., Biosensors for Aquatic Toxicology Evaluation. In *Biosensors for Environmental Monitoring of Aquatic Systems*, Barceló, D.; Hansen, P.-D., Eds. Springer Berlin Heidelberg: **2009**; Vol. 5J, pp 115-160; (b) Lagarde, F.; Jaffrezic-Renault, N., Cell-based electrochemical biosensors for water quality assessment. *Anal Bioanal Chem* **2011**, *400* (4), 947-964.
31. Liu, S.; Zheng, Z.; Li, X., Advances in pesticide biosensors: current status, challenges, and future perspectives. *Anal Bioanal Chem* **2013**, *405* (1), 63-90.
32. Richter, D.; Fritze, H., High-Temperature Gas Sensors. Springer Berlin Heidelberg: **2013**; pp 1-46.
33. Kalantar-zadeh, K.; Fry, B., Inorganic Nanotechnology Enabled Sensors. In *Nanotechnology-Enabled Sensors*, Springer US: **2008**; pp 283-370.
34. Buck, S. M.; Xu, H.; Brasuel, M.; Philbert, M. A.; Kopelman, R., Nanoscale probes encapsulated by biologically localized embedding (PEBBLEs) for ion sensing and imaging in live cells. *Talanta* **2004**, *63* (1), 41-59.
35. Sounderya, N.; Zhang, Y., Use of Core/Shell Structured Nanoparticles for Biomedical Applications. *Recent Patents on Biomedical Engineering* **2008**, *1* (1), 34-42.
36. Nel, A.; Xia, T.; Mädler, L.; Li, N., Toxic Potential of Materials at the Nanolevel. *Science* **2006**, *311* (5761), 622-627.
37. Borisov, S. M.; Mayr, T.; Karasyov, A.; Klimant, I.; Chojnacki, P.; Moser, C.; Nagl, S.; Schaeferling, M.; Stich, M.; Kocincova, A.; Wolfbeis, O., New Plastic Microparticles and Nanoparticles for Fluorescent Sensing and Encoding. In *Fluorescence of Supermolecules, Polymers, and Nanosystems*, Berberan-Santos, M. N., Ed. Springer Berlin Heidelberg: **2008**; Vol. 4, pp 431-463.
38. Tan, E.; Yin, P.; Lang, X.; Zhang, H.; Guo, L., A novel surface-enhanced Raman scattering nanosensor for detecting multiple heavy metal ions based on 2-mercaptoisonicotinic acid functionalized gold nanoparticles. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **2012**, *97*, 1007-1012.
39. (a) Labroo, P.; Cui, Y., Flexible graphene bio-nanosensor for lactate. *Biosensors and Bioelectronics* **2013**, *41* (0), 852-856; (b) Li, Y.; Ma, Q.; Liu, Z.; Wang, X.; Su, X., A novel enzyme-mimic nanosensor based on quantum dot-Au nanoparticle@silica mesoporous microsphere for the detection of glucose. *Analytica Chimica Acta* **2014**, *840* (0), 68-74; (c) Gültekin, A.; Karanfil, G.; Sönmezoğlu, S.; Say, R., Development of

- a highly sensitive MIP based-QCM nanosensor for selective determination of cholic acid level in body fluids. *Materials Science and Engineering: C* **2014**, 42 (0), 436-442.
40. Yola, M. L.; Uzun, L.; Özaltın, N.; Denizli, A., Development of molecular imprinted nanosensor for determination of tobramycin in pharmaceuticals and foods. *Talanta* **2014**, 120 (0), 318-324.
 41. Jianrong, C.; Yuqing, M.; Nongyue, H.; Xiaohua, W.; Sijiao, L., Nanotechnology and biosensors. *Biotechnology Advances* **2004**, 22 (7), 505-518.
 42. Turel, M.; Duerkop, A.; Yegorova, A.; Scripinets, Y.; Lobnik, A.; Samec, N., Detection of nanomolar concentrations of copper(II) with a Tb-quinoline-2-one probe using luminescence quenching or luminescence decay time. *Analytica Chimica Acta* **2009**, 644 (1-2), 53-60.
 43. Jerónimo, P. C. A.; Araújo, A. N.; Conceição B.S.M. Montenegro, M., Optical sensors and biosensors based on sol-gel films. *Talanta* **2007**, 72 (1), 13-27.
 44. Lobnik, A.; Turel, M.; Korent Urek, Š., Optical Chemical Sensors: Design and Applications. In *Advances in Chemical Sensors*, Wang, W., Ed. InTech: **2012**.
 45. Lobnik, A., ABSORPTION-BASED SENSORS. In *Optical Chemical Sensors*, Baldini, F.; Chester, A. N.; Homola, J.; Martellucci, S., Eds. Springer Netherlands: **2006**; Vol. 224, pp 77-98.
 46. Demchenko, A. P., Design and Properties of Fluorescence Reporters. In *Introduction to Fluorescence Sensing*, Demchenko, A., Ed. Springer Netherlands: **2009**; pp 119-196.
 47. (a) Wolfbeis, O. S., Fiber-Optic Chemical Sensors and Biosensors. *Analytical Chemistry* **2008**, 80 (12), 4269-4283; (b) Brecht, A.; Gauglitz, G., Recent developments in optical transducers for chemical or biochemical applications. *Sensors and Actuators B: Chemical* **1997**, 38 (1-3), 1-7.
 48. (a) Medina-Rodríguez, S.; de la Torre-Vega, Á.; Sainz-Gonzalo, F. J.; Marín-Suárez, M.; Elosúa, C.; Arregui, F. J.; Matias, I. R.; Fernández-Sánchez, J. F.; Fernández-Gutiérrez, A., Improved Multifrequency Phase-Modulation Method That Uses Rectangular-Wave Signals to Increase Accuracy in Luminescence Spectroscopy. *Analytical Chemistry* **2014**, 86 (11), 5245-5256; (b) Chu, C.-S.; Lin, T.-H., A new portable optical sensor for dual sensing of temperature and oxygen. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2014**, 202 (0), 508-515; (c) Myers, F. B.; Lee, L. P., Innovations in optical microfluidic technologies for point-of-care diagnostics. *Lab on a Chip* **2008**, 8 (12), 2015-2031; (d) O'Driscoll, S.; MacCraith, B. D.; Burke, C. S., A novel camera phone-based platform for quantitative fluorescence sensing. *Analytical Methods* **2013**, 5 (8), 1904-1908; (e) Aernecke, M. J.; Walt, D. R., Chapter 5 Fiber-optic Sensors for Biological and Chemical Agent Detection. In *Nano and Microsensors for Chemical and Biological Terrorism Surveillance*, The Royal Society of Chemistry: **2008**; pp 98-115; (f) Germain, M. E.; Knapp, M. J., Optical explosives detection: from color changes to fluorescence turn-on. *Chemical Society Reviews* **2009**, 38 (9), 2543-2555.
 49. Chauhan, V. M.; Burnett, G. R.; Aylott, J. W., Dual-fluorophore ratiometric pH nanosensor with tuneable pKa and extended dynamic range. *Analyst* **2011**, 136 (9), 1799-1801.
 50. (a) Martínez-Olmos, A.; Capel-Cuevas, S.; López-Ruiz, N.; Palma, A. J.; de Orbe, I.; Capitán-Vallvey, L. F., Sensor array-based optical portable instrument for determination of pH. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2011**, 156 (2), 840-848; (b) Valero-Navarro, A.; Salinas-Castillo, A.; Fernández-Sánchez, J. F.; Segura-Carretero, A.; Mallavia, R.; Fernández-Gutiérrez, A., The development of a MIP-optosensor for the detection of monoamine naphthalenes in drinking water. *Biosensors and Bioelectronics* **2009**, 24 (7), 2305-2311.
 51. Kirsch, J.; Siltanen, C.; Zhou, Q.; Revzin, A.; Simonian, A., Biosensor technology: recent advances in threat agent detection and medicine. *Chemical Society Reviews* **2013**, 42 (22), 8733-8768.
 52. (a) Byrne, R.; Diamond, D., Chemo/bio-sensor networks. *Nat Mater* **2006**, 5 (6), 421-424; (b) Diamond, D.; Coyle, S.; Scarmagnani, S.; Hayes, J., Wireless Sensor Networks and Chemo-/Biosensing. *Chemical Reviews* **2008**, 108 (2), 652-679.

53. Ergeneman, O.; Chatzipirpiridis, G.; Pokki, J.; Marín Suárez Del Toro, M.; Sotiriou, G. A.; Medina Rodríguez, S.; Fernández Sánchez, J. F.; Fernández Gutiérrez, A.; Pane, S.; Nelson, B. J., In Vitro Oxygen Sensing Using Intraocular Microrobots. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering* **2012**, *59* (11), 3104-3109.
54. Wolfbeis, O. S., Materials for fluorescence-based optical chemical sensors. *Journal of Materials Chemistry* **2005**, *15* (27-28), 2657-2669.
55. (a) Marín-Suarezdel Toro, M.; Fernandez-Sanchez, J. F.; Baranoff, E.; Nazeeruddin, M. K.; Graetzel, M.; Fernandez-Gutierrez, A., Novel luminescent Ir(III) dyes for developing highly sensitive oxygen sensing films. *Talanta* **2010**, *82* (2), 620-626; (b) Marín-Suarez, M.; Medina-Rodríguez, S.; Ergeneman, O.; Pane, S.; Fernandez-Sanchez, J. F.; Nelson, B. J.; Fernandez-Gutierrez, A., Electrophoretic deposition as a new approach to produce optical sensing films adaptable to microdevices. *Nanoscale* **2014**, *6* (1), 263-271.
56. (a) Fernández-Sánchez, J. F.; Cannas, R.; Spichiger, S.; Steiger, R.; Spichiger-Keller, U. E., Optical CO₂-sensing layers for clinical application based on pH-sensitive indicators incorporated into nanoscopic metal-oxide supports. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2007**, *128* (1), 145-153; (b) Fernández-Sánchez, J. F.; Cannas, R.; Spichiger, S.; Steiger, R.; Spichiger-Keller, U. E., Novel nanostructured materials to develop oxygen-sensitive films for optical sensors. *Analytica Chimica Acta* **2006**, *566* (2), 271-282.
57. Borisov, S. M.; Mayr, T.; Mistlberger, G.; Waich, K.; Koren, K.; Chojnacki, P.; Klimant, I., Precipitation as a simple and versatile method for preparation of optical nanochemosensors. *Talanta* **2009**, *79* (5), 1322-1330.
58. Valero-Navarro, A.; Medina-Castillo, A. L.; Fernandez-Sanchez, J. F.; Fernández-Gutiérrez, A., Synthesis of a novel polyurethane-based-magnetic imprinted polymer for the selective optical detection of 1-naphthylamine in drinking water. *Biosensors and Bioelectronics* **2011**, *26* (11), 4520-4525.
59. (a) Díaz, J. E.; Barrero, A.; Márquez, M.; Fernández-Nieves, A.; Loscertales, I. G., Absorption Properties of Microgel-PVP Composite Nanofibers Made by Electrospinning. *Macromolecular Rapid Communications* **2010**, *31* (2), 183-189; (b) Pelfrey, S.; Cantu, T.; Papantonakis, M. R.; Simonson, D. L.; McGill, R. A.; Macosay, J., Microscopic and Spectroscopic Studies of Thermally Enhanced Electrospun PMMA Micro- and Nanofibers. *Polym Chem* **2010**, *1*, 866-869.
60. Salinas-Castillo, A.; Fernández-Sánchez, J. F.; Segura-Carretero, A.; Fernández-Gutiérrez, A., Solid-surface phosphorescence characterization of polycyclic aromatic hydrocarbons and selective determination of benzo(a)pyrene in water samples. *Analytica Chimica Acta* **2005**, *550* (1-2), 53-60.
61. (a) Valero-Navarro, A.; Damiani, P. C.; Fernández-Sánchez, J. F.; Segura-Carretero, A.; Fernández-Gutiérrez, A., Chemometric-assisted MIP-optosensing system for the simultaneous determination of monoamine naphthalenes in drinking waters. *Talanta* **2009**, *78* (1), 57-65; (b) Valero-Navarro, Á.; Gómez-Romero, M.; Fernández-Sánchez, J. F.; Cormack, P. A. G.; Segura-Carretero, A.; Fernández-Gutiérrez, A., Synthesis of caffeic acid molecularly imprinted polymer microspheres and high-performance liquid chromatography evaluation of their sorption properties. *Journal of Chromatography A* **2011**, *1218* (41), 7289-7296; (c) Sainz-Gonzalo, F. J.; Medina-Castillo, A. L.; Fernández-Sánchez, J. F.; Fernández-Gutiérrez, A., Synthesis and characterization of a molecularly imprinted polymer optosensor for TEXs-screening in drinking water. *Biosensors and Bioelectronics* **2011**, *26* (7), 3331-3338; (d) Sánchez-Barragán, I.; Karim, K.; Costa-Fernández, J. M.; Piletsky, S. A.; Sanz-Medel, A., A molecularly imprinted polymer for carbaryl determination in water. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2007**, *123* (2), 798-804; (e) Sánchez-Barragán, I.; Costa-Fernández, J. M.; Pereiro, R.; Sanz-Medel, A.; Salinas, A.; Segura, A.; Fernández-Gutiérrez, A.; Ballesteros, A.; González, J. M., Molecularly Imprinted Polymers Based on Iodinated Monomers for Selective Room-Temperature Phosphorescence Optosensing of Fluoranthene in Water†. *Analytical Chemistry* **2005**, *77* (21), 7005-7011.
62. (a) Carofiglio, T.; Fregonese, C.; Mohr, G. J.; Rastrelli, F.; Tonellato, U., Optical sensor arrays: one-pot, multiparallel synthesis and cellulose immobilization of pH and metal ion sensitive azo-dyes. *Tetrahedron* **2006**, *62* (7), 1502-1507; (b) Silva, L. S.; Lima, L. C. B.; Silva, F. C.; Matos, J. M. E.; Santos, M. R. M. C.; Santos

- Júnior, L. S.; Sousa, K. S.; da Silva Filho, E. C., Dye anionic sorption in aqueous solution onto a cellulose surface chemically modified with aminoethanethiol. *Chemical Engineering Journal* **2013**, 218 (0), 89-98.
63. (a) Gurgel, L. V. A.; Júnior, O. K.; Gil, R. P. d. F.; Gil, L. F., Adsorption of Cu(II), Cd(II), and Pb(II) from aqueous single metal solutions by cellulose and mercerized cellulose chemically modified with succinic anhydride. *Bioresource Technology* **2008**, 99 (8), 3077-3083; (b) Ibrahim, A. A.; Adel, A. M.; El-Wahab, Z. H. A.; Al-Shemy, M. T., Utilization of carboxymethyl cellulose based on bean hulls as chelating agent. Synthesis, characterization and biological activity. *Carbohydrate Polymers* **2011**, 83 (1), 94-115.
64. (a) Rauf, S.; Ihsan, A.; Akhtar, K.; Ghauri, M. A.; Rahman, M.; Anwar, M. A.; Khalid, A. M., Glucose oxidase immobilization on a novel cellulose acetate-polymethylmethacrylate membrane. *Journal of Biotechnology* **2006**, 121 (3), 351-360; (b) Singh, K.; Kayastha, A. M., Optimal immobilization of α -amylase from wheat (*Triticum aestivum*) onto DEAE-cellulose using response surface methodology and its characterization. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **2014**, 104 (0), 75-81; (c) Huang, X.-J.; Chen, P.-C.; Huang, F.; Ou, Y.; Chen, M.-R.; Xu, Z.-K., Immobilization of *Candida rugosa* lipase on electrospun cellulose nanofiber membrane. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **2011**, 70 (3-4), 95-100; (d) Labus, K.; Turek, A.; Liesiene, J.; Bryjak, J., Efficient *Agaricus bisporus* tyrosinase immobilization on cellulose-based carriers. *Biochemical Engineering Journal* **2011**, 56 (3), 232-240.
65. Zhang, Z.; Decker, E. A.; McClements, D. J., Encapsulation, protection, and release of polyunsaturated lipids using biopolymer-based hydrogel particles. *Food Research International* **2014**, 64 (0), 520-526.
66. (a) Marín-Suárez, M.; Curchod, B. F. E.; Tavernelli, I.; Rothlisberger, U.; Scopelliti, R.; Jung, I.; Di Censo, D.; Grätzel, M.; Fernández-Sánchez, J. F.; Fernández-Gutiérrez, A.; Nazeeruddin, M. K.; Baranoff, E., Nanocomposites Containing Neutral Blue Emitting Cyclometalated Iridium(III) Emitters for Oxygen Sensing. *Chemistry of Materials* **2012**, 24 (12), 2330-2338; (b) Medina-Rodríguez, S.; Marín-Suarez, M.; Fernandez-Sanchez, J. F.; Torre-Vega, A. d. I.; Baranoff, E.; Fernandez-Gutierrez, A., High performance optical sensing nanocomposites for low and ultra-low oxygen concentrations using phase-shift measurements. *Analyst* **2013**, 138 (16), 4607-4617; (c) Steiger, R.; Beer, R.; Fernandez-Sanchez, J. F.; Spichiger-Keller, U. E., Large area, nanoparticulate metal oxide coatings for consumer nanotechnologies. *Nanoscience and Technology, Pts 1 and 2* **2007**, 121-123, 1193-1197.
67. Fernández-Sánchez, J. F.; Roth, T.; Cannas, R.; Nazeeruddin, M. K.; Spichiger, S.; Graetzel, M.; Spichiger-Keller, U. E., Novel oxygen sensitive complexes for optical oxygen sensing. *Talanta* **2007**, 71 (1), 242-250.
68. Fernández-Sánchez, J. F.; Nezel, T.; Steiger, R.; Spichiger-Keller, U. E., Novel optical NO₂-selective sensor based on phthalocyaninato-iron(II) incorporated into a nanostructured matrix. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2006**, 113 (2), 630-638.
69. Henry, O. F.; Cullen, D.; Piletsky, S., Optical interrogation of molecularly imprinted polymers and development of MIP sensors: a review. *Anal Bioanal Chem* **2005**, 382 (4), 947-956.
70. (a) Fischer, E., Einfluss der Configuration auf die Wirkung der Enzyme. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft* **1894**, 27 (3), 2985-2993; (b) Fischer, E., Ueber die optischen Isomeren des Traubenzuckers, der Gluconsäure und der Zuckersäure. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft* **1890**, 23 (2), 2611-2624.
71. (a) Wulff, G.; Sarhan, A., Über die Anwendung von enzymanalog gebauten Polymeren zur Racemattrennung. *Angewandte Chemie* **1972**, 84 (8), 364-364; (b) Wulff, G.; Sarhan, A.; Zabrocki, K., Enzyme-analogue built polymers and their use for the resolution of racemates. *Tetrahedron Letters* **1973**, 14 (44), 4329-4332.
72. Chen, Y.; Chen, L.; Bi, R.; Xu, L.; Liu, Y., A potentiometric chiral sensor for L-Phenylalanine based on crosslinked polymethylacrylic acid-polycarbazole hybrid molecularly imprinted polymer. *Analytica Chimica Acta* **2012**, 754 (0), 83-90.

73. Sellergren, B.; Lepistoe, M.; Mosbach, K., Highly enantioselective and substrate-selective polymers obtained by molecular imprinting utilizing noncovalent interactions. NMR and chromatographic studies on the nature of recognition. *Journal of the American Chemical Society* **1988**, *110* (17), 5853-5860.
74. (a) Par, M.; Gamulin, O.; Marovic, D.; Klaric, E.; Tarle, Z., Effect of temperature on post-cure polymerization of bulk-fill composites. *Journal of Dentistry* **2014**, *42* (10), 1255-1260; (b) Tsuchiya, Y.; Nomaguchi, T.; Endo, K., Bulk polymerization of vinyl chloride with half-titanocene/MAO catalyst. *Polymer* **2008**, *49* (5), 1180-1184.
75. Zhang, W.; Chen, Z., Preparation of micropipette tip-based molecularly imprinted monolith for selective micro-solid phase extraction of berberine in plasma and urine samples. *Talanta* **2013**, *103* (0), 103-109.
76. Medina-Castillo, A. L.; Fernandez-Sanchez, J. F.; Segura-Carretero, A.; Fernandez-Gutierrez, A., Micrometer and Submicrometer Particles Prepared by Precipitation Polymerization: Thermodynamic Model and Experimental Evidence of the Relation between Flory's Parameter and Particle Size. *Macromolecules* **2010**, *43* (13), 5804-5813.
77. Mayes, A. G.; Mosbach, K., Molecularly Imprinted Polymer Beads: Suspension Polymerization Using a Liquid Perfluorocarbon as the Dispersing Phase. *Analytical Chemistry* **1996**, *68* (21), 3769-3774.
78. (a) Ciardelli, G.; Borrelli, C.; Silvestri, D.; Cristallini, C.; Barbani, N.; Giusti, P., Supported imprinted nanospheres for the selective recognition of cholesterol. *Biosensors and Bioelectronics* **2006**, *21* (12), 2329-2338; (b) Shen, X.; Ye, L., Interfacial molecular imprinting in nanoparticle-stabilized emulsions. *Macromolecules* **2011**, *44* (14), 5631-5637.
79. (a) Zhu, L.; Yang, X.; Cao, Y., Preparation of Surface-Imprinted Polymer Magnetic Nanoparticles with Miniemulsion Polymerization for Recognition of Salicylic Acid. *Analytical Letters* **2012**, *46* (6), 982-998; (b) Mistlberger, G.; Medina-Castillo, A.; Borisov, S.; Mayr, T.; Fernández-Gutiérrez, A.; Fernandez-Sanchez, J.; Klimant, I., Mini-emulsion solvent evaporation: a simple and versatile way to magnetic nanosensors. *Microchim Acta* **2011**, *172* (3-4), 299-308.
80. Meng, M.; Feng, Y.; Guan, W.; Liu, Y.; Xi, Y.; Yan, Y., Selective separation of salicylic acid from aqueous solutions using molecularly imprinted nano-polymer on wollastonite synthesized by oil-in-water microemulsion method. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* **2014**, *20* (6), 3975-3983.
81. (a) Sulitzky, C.; Rückert, B.; Hall, A. J.; Lanza, F.; Unger, K.; Sellergren, B., Grafting of Molecularly Imprinted Polymer Films on Silica Supports Containing Surface-Bound Free Radical Initiators. *Macromolecules* **2001**, *35* (1), 79-91; (b) Titirici, M.-M.; Sellergren, B., Thin Molecularly Imprinted Polymer Films via Reversible Addition-Fragmentation Chain Transfer Polymerization. *Chemistry of Materials* **2006**, *18* (7), 1773-1779; (c) Sellergren, B.; Rückert, B.; Hall, A. J., Layer-by-Layer Grafting of Molecularly Imprinted Polymers via Iniferter Modified Supports. *Advanced Materials* **2002**, *14* (17), 1204-1208; (d) Lee, H. Y.; S. Kim, B., Grafting of molecularly imprinted polymers on iniferter-modified carbon nanotube. *Biosensors and Bioelectronics* **2009**, *25* (3), 587-591.
82. (a) Titirici, M. M.; Hall, A. J.; Sellergren, B., Hierarchical Imprinting Using Crude Solid Phase Peptide Synthesis Products as Templates. *Chemistry of Materials* **2003**, *15* (4), 822-824; (b) Titirici, M.; Sellergren, B., Peptide recognition via hierarchical imprinting. *Anal Bioanal Chem* **2004**, *378* (8), 1913-1921.
83. (a) Yin, Y.; Xu, S.; Chang, D.; Zheng, H.; Li, J.; Liu, X.; Xu, P.; Xiong, F., One-pot synthesis of biopolymeric hollow nanospheres by photocrosslinking. *Chemical Communications* **2010**, *46* (43), 8222-8224; (b) Long, Y.-Z.; Yu, M.; Sun, B.; Gu, C.-Z.; Fan, Z., Recent advances in large-scale assembly of semiconducting inorganic nanowires and nanofibers for electronics, sensors and photovoltaics. *Chemical Society Reviews* **2012**, *41* (12), 4560-4580; (c) Fu, G.-D.; Li, G. L.; Neoh, K. G.; Kang, E. T., Hollow polymeric nanostructures—Synthesis, morphology and function. *Progress in Polymer Science* **2011**, *36* (1), 127-167; (d) Yallapu, M.; Foy, S.; Jain, T.; Labhasetwar, V., PEG-Functionalized Magnetic Nanoparticles for Drug Delivery and Magnetic Resonance Imaging Applications. *Pharm Res* **2010**, *27* (11), 2283-2295; (e) Dong,

- H.; Hu, W., Organic Nanomaterials. In *Springer Handbook of Nanomaterials*, Vajtai, R., Ed. Springer Berlin Heidelberg: **2013**; pp 905-940.
84. (a) Chamtour, M.; Dhawan, A.; Besbes, M.; Moreau, J.; Ghalila, H.; Vo-Dinh, T.; Canva, M., Enhanced SPR Sensitivity with Nano-Micro-Ribbon Grating—an Exhaustive Simulation Mapping. *Plasmonics* **2014**, *9* (1), 79-92; (b) Souza, C. G. S.; Beck, W., Jr.; Varanda, L. C., Multifunctional luminomagnetic FePt@Fe₃O₄/SiO₂/Rhodamine B/SiO₂ nanoparticles with high magnetic emanation for biomedical applications. *J Nanopart Res* **2013**, *15* (4), 1-11; (c) Letfullin, R.; George, T., Plasmonic Nanomaterials for Nanomedicine. In *Springer Handbook of Nanomaterials*, Vajtai, R., Ed. Springer Berlin Heidelberg: **2013**; pp 1063-1098; (d) Adeli, M.; Kalantari, M.; Parsamanesh, M.; Sadeghi, E.; Mahmoudi, M., Synthesis of new hybrid nanomaterials: promising systems for cancer therapy. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* **2011**, *7* (6), 806-817; (e) Covaliu, C. I.; Jitaru, I.; Paraschiv, G.; Vasile, E.; Biriş, S.-Ş.; Diamandescu, L.; Ionita, V.; Iovu, H., Core-shell hybrid nanomaterials based on CoFe₂O₄ particles coated with PVP or PEG biopolymers for applications in biomedicine. *Powder Technology* **2013**, *237* (0), 415-426; (f) Karimi, Z.; Karimi, L.; Shokrollahi, H., Nano-magnetic particles used in biomedicine: Core and coating materials. *Materials Science and Engineering: C* **2013**, *33* (5), 2465-2475; (g) Krishna, K. S.; Li, Y.; Li, S.; Kumar, C. S. S. R., Lab-on-a-chip synthesis of inorganic nanomaterials and quantum dots for biomedical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2013**, *65* (11-12), 1470-1495.
85. (a) Zhu, Z.; Sun, X.; Wang, Y.; Zeng, Y.; Sun, W.; Huang, X., Electrochemical horseradish peroxidase biosensor based on dextran-ionic liquid-V₂O₅ nanobelt composite material modified carbon ionic liquid electrode. *Materials Chemistry and Physics* **2010**, *124* (1), 488-492; (b) Khoshnevisan, K.; Bordbar, A.-K.; Zare, D.; Davoodi, D.; Noruzi, M.; Barkhi, M.; Tabatabaie, M., Immobilization of cellulase enzyme on superparamagnetic nanoparticles and determination of its activity and stability. *Chemical Engineering Journal* **2011**, *171* (2), 669-673; (c) Ghosh, S.; Chaganti, S. R.; Prakasham, R. S., Polyaniline nanofiber as a novel immobilization matrix for the anti-leukemia enzyme L-asparaginase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **2012**, *74* (1-2), 132-137; (d) Wang, P., Nanoscale biocatalyst systems. *Current Opinion in Biotechnology* **2006**, *17* (6), 574-579; (e) Pavlidis, I. V.; Patila, M.; Bornscheuer, U. T.; Gournis, D.; Stamatidis, H., Graphene-based nanobiocatalytic systems: recent advances and future prospects. *Trends in Biotechnology* **2014**, *32* (6), 312-320; (f) El-Boubbou, K.; Landry, C. C., Chapter 4 - Nanoparticles in Biocatalysis. In *New and Future Developments in Catalysis*, Suib, S. L., Ed. Elsevier: Amsterdam, **2013**; pp 95-123.
86. (a) Pierobon, M.; Jornet, J.; Akkari, N.; Almasri, S.; Akyildiz, I., A routing framework for energy harvesting wireless nanosensor networks in the Terahertz Band. *Wireless Netw* **2014**, *20* (5), 1169-1183; (b) Reddy, A. M.; Ramaprabhu, S., Nanostructured Materials for Energy-Related Applications. In *Springer Handbook of Nanomaterials*, Vajtai, R., Ed. Springer Berlin Heidelberg: **2013**; pp 1013-1038; (c) Kim, B. K.; Chabot, V.; Yu, A., Carbon nanomaterials supported Ni(OH)₂/NiO hybrid flower structure for supercapacitor. *Electrochimica Acta* **2013**, *109* (0), 370-380.
87. (a) Zhang, X.; Han, X.; Wu, F.; Jasensky, J.; Chen, Z., Nano-bio interfaces probed by advanced optical spectroscopy: From model system studies to optical biosensors. *Chin. Sci. Bull.* **2013**, *58* (21), 2537-2556; (b) Urwyler, P.; Köser, J.; Schiff, H.; Gobrecht, J.; Müller, B., Nano-Mechanical Transduction of Polymer Micro-Cantilevers to Detect Bio-Molecular Interactions. *Biointerphases* **2012**, *7* (1-4), 1-8; (c) Wang, Y.; Qu, K.; Tang, L.; Li, Z.; Moore, E.; Zeng, X.; Liu, Y.; Li, J., Nanomaterials in carbohydrate biosensors. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2014**, *58* (0), 54-70.
88. Gaster, R.; Hall, D.; Wang, S., Magneto-Nanosensor Diagnostic Chips. In *Point-of-Care Diagnostics on a Chip*, Issadore, D.; Westervelt, R. M., Eds. Springer Berlin Heidelberg: **2013**; pp 153-176.
89. (a) Park, C.-H.; Kim, C.-H.; Tijng, L.; Lee, D.-H.; Yu, M.-H.; Pant, H.; Kim, Y.; Kim, C., Preparation and characterization of (polyurethane/nylon-6) nanofiber/ (silicone) film composites via electrospinning and dip-coating. *Fibers Polym* **2012**, *13* (3), 339-345; (b) Wu, H.; Fan, J.; Chu, C.-C.; Wu, J., Electrospinning of

- small diameter 3-D nanofibrous tubular scaffolds with controllable nanofiber orientations for vascular grafts. *J Mater Sci: Mater Med* **2010**, *21* (12), 3207-3215.
90. (a) Lin, J., Recent development and applications of optical and fiber-optic pH sensors. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2000**, *19* (9), 541-552; (b) Dugas, V.; Elaissari, A.; Chevalier, Y., Surface Sensitization Techniques and Recognition Receptors Immobilization on Biosensors and Microarrays. In *Recognition Receptors in Biosensors*, Zourob, M., Ed. Springer New York: **2010**; pp 47-134; (c) Oehme, I.; Prattes, S.; Wolfbeis, O. S.; Mohr, G. J., The effect of polymeric supports and methods of immobilization on the performance of an optical copper(II)-sensitive membrane based on the colourimetric reagent Zincon. *Talanta* **1998**, *47* (3), 595-604.
91. Ammam, M., Electrochemical and electrophoretic deposition of enzymes: Principles, differences and application in miniaturized biosensor and biofuel cell electrodes. *Biosensors and Bioelectronics* **2014**, *58* (0), 121-131.
92. Bidmanova, S.; Hlavacek, A.; Damborsky, J.; Prokop, Z., Conjugation of 5(6)-carboxyfluorescein and 5(6)-carboxynaphthofluorescein with bovine serum albumin and their immobilization for optical pH sensing. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2012**, *161* (1), 93-99.
93. Reisfeld, R.; Saraidarov, T., Innovative materials based on sol-gel technology. *Optical Materials* **2006**, *28* (1-2), 64-70.
94. (a) Tan, S.-Z.; Hu, Y.-J.; Chen, J.-W.; Shen, G.-L.; Yu, R.-Q., An optical sensor based on covalent immobilization of 1-aminopyrene using Au nanoparticles as bridges and carriers. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2007**, *124* (1), 68-73; (b) Mohr, G. J.; Wolfbeis, O. S., Optical sensors for a wide pH range based on azo dyes immobilized on a novel support. *Analytica Chimica Acta* **1994**, *292* (1-2), 41-48; (c) Kermis, H. R.; Kostov, Y.; Rao, G., Rapid method for the preparation of a robust optical pH sensor. *Analyst* **2003**, *128* (9), 1181-1186.
95. Rook, J. J., Formation of haloforms during chlorination of natural waters. *J. Water Treat. Exam.* **1974**, *23*, 234-243.
96. (a) Richardson, S. D.; Plewa, M. J.; Wagner, E. D.; Schoeny, R.; DeMarini, D. M., Occurrence, genotoxicity, and carcinogenicity of regulated and emerging disinfection by-products in drinking water: A review and roadmap for research. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* **2007**, *636* (1-3), 178-242; (b) Myllykangas, T.; Nissinen, T. K.; Mäki-Paakkanen, J.; Hirvonen, A.; Vartiainen, T., Bromide affecting drinking water mutagenicity. *Chemosphere* **2003**, *53* (7), 745-756.
97. (a) Richardson, S. D., Disinfection by-products and other emerging contaminants in drinking water. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2003**, *22* (10), 666-684; (b) Sadiq, R.; Rodriguez, M. J., Empirical Models to Predict Disinfection By-products (DBPs) in Drinking Water. In *Encyclopedia of Environmental Health*, Nriagu, J. O., Ed. Elsevier: Burlington, **2011**; pp 282-295; (c) Richardson, S. D.; Thruston, A. D.; Rav-Acha, C.; Groisman, L.; Popilevsky, I.; Juraev, O.; Glezer, V.; McKague, A. B.; Plewa, M. J.; Wagner, E. D., Tribromopyrrole, Brominated Acids, and Other Disinfection Byproducts Produced by Disinfection of Drinking Water Rich in Bromide. *Environmental Science & Technology* **2003**, *37* (17), 3782-3793.
98. Hua, G.; Reckhow, D. A.; Kim, J., Effect of Bromide and Iodide Ions on the Formation and Speciation of Disinfection Byproducts during Chlorination. *Environmental Science & Technology* **2006**, *40* (9), 3050-3056.
99. (a) Agus, E.; Voutchkov, N.; Sedlak, D. L., Disinfection by-products and their potential impact on the quality of water produced by desalination systems: A literature review. *Desalination* **2009**, *237* (1-3), 214-237; (b) Valero, F.; Arbós, R., Desalination of brackish river water using Electrodialysis Reversal (EDR): Control of the THMs formation in the Barcelona (NE Spain) area. *Desalination* **2010**, *253* (1-3), 170-174.
100. Magazinovic, R. S.; Nicholson, B. C.; Mulcahy, D. E.; Davey, D. E., Bromide levels in natural waters: its relationship to levels of both chloride and total dissolved solids and the implications for water treatment. *Chemosphere* **2004**, *57* (4), 329-335.

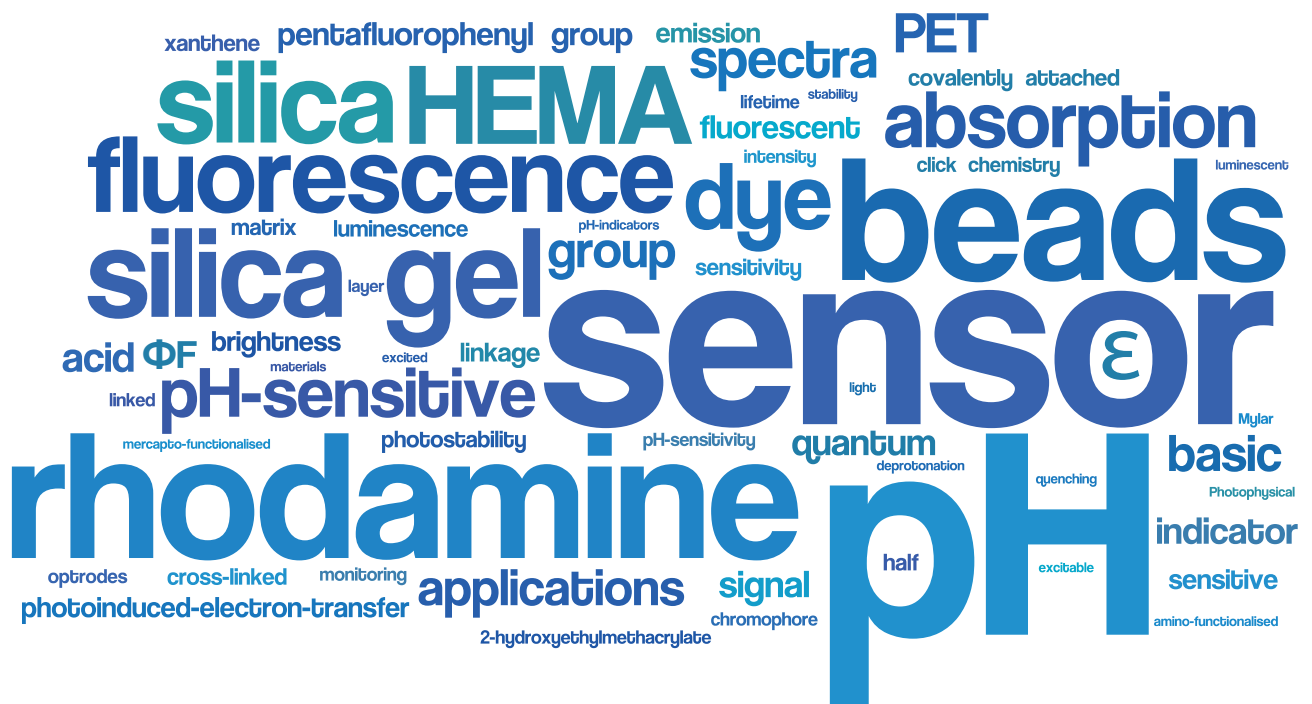
101. Suzuki, M.; Eda, Y.; Ohsawa, S.; Kanesaki, Y.; Yoshikawa, H.; Tanaka, K.; Muramatsu, Y.; Yoshikawa, J.; Sato, I.; Fujii, T.; Amachi, S., Iodide Oxidation by a Novel Multicopper Oxidase from the Alphaproteobacterium Strain Q-1. *Applied and Environmental Microbiology* **2012**, *78* (11), 3941-3949.
102. Myllykangas, T.; Nissinen, T. K.; Hirvonen, A.; Rantakokko, P.; Vartiainen, T., The Evaluation Of Ozonation and Chlorination On Disinfection By-Product Formation for a High-Bromide Water. *Ozone: Science & Engineering* **2005**, *27* (1), 19-26.
103. (a) von Gunten, U., Ozonation of drinking water: Part II. Disinfection and by-product formation in presence of bromide, iodide or chlorine. *Water Research* **2003**, *37* (7), 1469-1487; (b) Arvai, A.; Jasim, S.; Biswas, N., Bromate Formation in Ozone and Advanced Oxidation Processes. *Ozone: Science & Engineering* **2012**, *34* (5), 325-333.
104. Garcia-Villanova, R. J.; Oliveira Dantas Leite, M. V.; Hernández Hierro, J. M.; de Castro Alfageme, S.; García Hernández, C., Occurrence of bromate, chlorite and chlorate in drinking waters disinfected with hypochlorite reagents. Tracing their origins. *Science of The Total Environment* **2010**, *408* (12), 2616-2620.
105. Zhai, H.; Zhang, X., Formation and Decomposition of New and Unknown Polar Brominated Disinfection Byproducts during Chlorination. *Environmental Science & Technology* **2011**, *45* (6), 2194-2201.
106. Smith, E. M.; Plewa, M. J.; Lindell, C. L.; Richardson, S. D.; Mitch, W. A., Comparison of Byproduct Formation in Waters Treated with Chlorine and Iodine: Relevance to Point-of-Use Treatment. *Environmental Science & Technology* **2010**, *44* (22), 8446-8452.
107. Bichsel, Y.; von Gunten, U., Formation of Iodo-Trihalomethanes during Disinfection and Oxidation of Iodide-Containing Waters. *Environmental Science & Technology* **2000**, *34* (13), 2784-2791.
108. Bichsel, Y.; von Gunten, U., Oxidation of Iodide and Hypoiodous Acid in the Disinfection of Natural Waters. *Environmental Science & Technology* **1999**, *33* (22), 4040-4045.
109. Woo, Y.-T.; Lai, D.; McLain, J. L.; Manibusan, M. K.; Dellarco, V., Use of mechanism-based structure-activity relationships analysis in carcinogenic potential ranking for drinking water disinfection by-products. *Environmental Health Perspectives* **2002**, *110* (Suppl 1), 75-87.
110. Krasner, S. W.; Weinberg, H. S.; Richardson, S. D.; Pastor, S. J.; Chinn, R.; Scrimanti, M. J.; Onstad, G. D.; Thruston, A. D., Occurrence of a New Generation of Disinfection Byproducts†. *Environmental Science & Technology* **2006**, *40* (23), 7175-7185.
111. (a) Plewa, M. J.; Wagner, E. D.; Richardson, S. D.; Thruston, A. D.; Woo, Y.-T.; McKague, A. B., Chemical and Biological Characterization of Newly Discovered Iodoacid Drinking Water Disinfection Byproducts. *Environmental Science & Technology* **2004**, *38* (18), 4713-4722; (b) Richardson, S. D.; Fasano, F.; Ellington, J. J.; Crumley, F. G.; Buettner, K. M.; Evans, J. J.; Blount, B. C.; Silva, L. K.; Waite, T. J.; Luther, G. W.; McKague, A. B.; Miltner, R. J.; Wagner, E. D.; Plewa, M. J., Occurrence and Mammalian Cell Toxicity of Iodinated Disinfection Byproducts in Drinking Water. *Environmental Science & Technology* **2008**, *42* (22), 8330-8338.
112. (a) Mohapatra, M.; Anand, S.; Mishra, B. K.; Giles, D. E.; Singh, P., Review of fluoride removal from drinking water. *Journal of Environmental Management* **2009**, *91* (1), 67-77; (b) Watson, K.; Farré, M. J.; Knight, N., Strategies for the removal of halides from drinking water sources, and their applicability in disinfection by-product minimisation: A critical review. *Journal of Environmental Management* **2012**, *110* (0), 276-298.
113. Kimbrough, D. E.; Suffet, I. H., Electrochemical removal of bromide and reduction of THM formation potential in drinking water. *Water Research* **2002**, *36* (19), 4902-4906.
114. (a) Ying, T.-Y.; Yang, K.-L.; Yiaccoumi, S.; Tsouris, C., Electrosorption of Ions from Aqueous Solutions by Nanostructured Carbon Aerogel. *Journal of Colloid and Interface Science* **2002**, *250* (1), 18-27; (b) Xu, P.; Drewes, J. E.; Heil, D.; Wang, G., Treatment of brackish produced water using carbon aerogel-based capacitive deionization technology. *Water Research* **2008**, *42* (10-11), 2605-2617; (c) Oren, Y., Capacitive deionization (CDI) for desalination and water treatment — past, present and future (a review). *Desalination* **2008**, *228* (1-3), 10-29.

115. (a) Zhao, L.; Ho, W. S. W., Novel reverse osmosis membranes incorporated with a hydrophilic additive for seawater desalination. *Journal of Membrane Science* **2014**, 455 (0), 44-54; (b) Zhao, L.; Chang, P. C. Y.; Ho, W. S. W., High-flux reverse osmosis membranes incorporated with hydrophilic additives for brackish water desalination. *Desalination* **2013**, 308 (0), 225-232.
116. (a) Chellam, S., Effects of Nanofiltration on Trihalomethane and Haloacetic Acid Precursor Removal and Speciation in Waters Containing Low Concentrations of Bromide Ion. *Environmental Science & Technology* **2000**, 34 (9), 1813-1820; (b) Harrison, C.; Le Gouellec, Y.; Cheng, R.; Childress, A., Bench-Scale Testing of Nanofiltration for Seawater Desalination. *Journal of Environmental Engineering* **2007**, 133 (11), 1004-1014.
117. (a) Deng, D.; Aouad, W.; Braff, W. A.; Schlumpberger, S.; Suss, M. E.; Bazant, M. Z., Water purification by shock electrodialysis: Deionization, filtration, separation, and disinfection. *Desalination* **2015**, 357 (0), 77-83; (b) Wiśniewski, J. A.; Kabsch-Korbutowicz, M.; Łakomska, S., Ion-exchange membrane processes for Br⁻ and BrO₃⁻ ion removal from water and for recovery of salt from waste solution. *Desalination* **2014**, 342 (0), 175-182.
118. Kochkodan, V.; Hilal, N., A comprehensive review on surface modified polymer membranes for biofouling mitigation. *Desalination* **2015**, 356 (0), 187-207.
119. (a) Liang, L.; Wang, Y.; Wei, M.; Cheng, J., Bromide ion removal from contaminated water by calcined and uncalcined MgAl-CO₃ layered double hydroxides. *Journal of Hazardous Materials* **2008**, 152 (3), 1130-1137; (b) Liang, L.; Li, L., Adsorption behavior of calcined layered double hydroxides towards removal of iodide contaminants. *J Radioanal Nucl Chem* **2007**, 273 (1), 221-226; (c) Chubar, N., New inorganic (an)ion exchangers based on Mg-Al hydrous oxides: (Alkoxide-free) sol-gel synthesis and characterisation. *Journal of Colloid and Interface Science* **2011**, 357 (1), 198-209; (d) Chubar, N.; Kanibolotskiy, V.; Strelko, V.; Kouts, V.; Shaposhnikova, T., Adsorption of anions onto sol-gel generated double hydrous oxides. In *Soil and Water Pollution Monitoring, Protection and Remediation*, Twardowska, I.; Allen, H.; Häggblom, M.; Stefaniak, S., Eds. Springer Netherlands: **2006**; Vol. 69, pp 323-338.
120. (a) Ikari, M.; Matsui, Y.; Suzuki, Y.; Matsushita, T.; Shirasaki, N., Removal of iodide from water by chlorination and subsequent adsorption on powdered activated carbon. *Water Research* **2015**, 68 (0), 227-237; (b) Mianowski, A.; Owczarek, M.; Marecka, A., Surface Area of Activated Carbon Determined by the Iodine Adsorption Number. *Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization, and Environmental Effects* **2007**, 29 (9), 839-850.
121. (a) Sánchez-Polo, M.; Rivera-Utrilla, J.; Salhi, E.; von Gunten, U., Removal of bromide and iodide anions from drinking water by silver-activated carbon aerogels. *Journal of Colloid and Interface Science* **2006**, 300 (1), 437-441; (b) Sánchez-Polo, M.; Rivera-Utrilla, J.; Méndez-Díaz, J.; López-Peñalver, J., Metal-Doped Carbon Aerogels. New Materials for Water Treatments. *Industrial & Engineering Chemistry Research* **2008**, 47 (16), 6001-6005.
122. (a) Ding, L.; Deng, H.; Wu, C.; Han, X., Affecting factors, equilibrium, kinetics and thermodynamics of bromide removal from aqueous solutions by MIEX resin. *Chemical Engineering Journal* **2012**, 181-182 (0), 360-370; (b) Hsu, S.; Singer, P. C., Removal of bromide and natural organic matter by anion exchange. *Water Research* **2010**, 44 (7), 2133-2140.
123. (a) Ge, F.; Zhu, L., Effects of coexisting anions on removal of bromide in drinking water by coagulation. *Journal of Hazardous Materials* **2008**, 151 (2-3), 676-681; (b) Ge, F.; Shu, H.; Dai, Y., Removal of bromide by aluminium chloride coagulant in the presence of humic acid. *Journal of Hazardous Materials* **2007**, 147 (1-2), 457-462.

Parte Experimental

Primer Bloque

Capítulo 1



Capítulo 1

New fluorescent pH sensors based on covalently linkable PET rhodamines

In collaboration with:

Institute of Analytical Chemistry and Food Chemistry, Graz University of Technology, Stremayrgasse 9, A-8010 Graz, Austria.

Department of Analytical Chemistry, University of Granada, Avd. Fuentenueva s/n, E-18071 Granada, Spain.

Institute for Chemistry and Technology of Materials, Graz University of Technology, Stremayrgasse 9, A-8010 Graz, Austria.

New fluorescent pH sensors based on covalently linkable PET rhodamines

Abstract

A new class of rhodamines for the application as indicator dyes in fluorescent pH sensors is presented. Their pH-sensitivity derives from photoinduced electron transfer between non-protonated amino groups and the excited chromophore which results in effective fluorescence quenching at increasing pH. The new indicator class carries a pentafluorophenyl group at the 9-position of the xanthen core where other rhodamines bear 2-carboxyphenyl substituents instead. The pentafluorophenyl group is used for covalent coupling to sensor matrices by "click" reaction with mercapto groups. Photophysical properties are similar to "classical" rhodamines carrying 2'-carboxy groups. pH sensors have been prepared with two different matrix materials, silica gel and poly(2-hydroxyethylmethacrylate). Both sensors show high luminescence brightness (absolute fluorescence quantum yield $\Phi_F \approx 0.6$) and high pH-sensitivity at pH 5–7 which makes them suitable for monitoring biotechnological samples. To underline practical applicability, a dually lifetime referenced sensor containing Cr(III)-doped Al_2O_3 as reference material is presented.

Keywords: pH sensor, Fluorescence, Rhodamine, Photoinduced electron transfer, Covalent dye coupling, "Click" chemistry.

Highlights

- New rhodamine pH-indicators employing photoinduced electron transfer are prepared.
 - Indicators are covalently immobilised to the sensor support.
 - Obtained pH optrodes feature high brightness, excellent sensitivity and good operation stability.
 - Dynamic range (pH 5–7) is particularly useful for biotechnological applications.
-

1. Introduction

pH is a key parameter for a wide range of applications in the medical field, in environmental and life sciences or for regulation and routine monitoring in industrial processes and in sewage purification plants, to mention only a few areas. Although electrochemical pH sensors are well-established and can be used as reliable tools for a large number of analytical

tasks, optical pH sensors offer unmatched advantages in many other challenging applications, in particular for high-throughput screening, for applications where minimal contact to the sample is preferable, where a high degree of miniaturisation is required or in systems that do not allow the application of potentiometric sensors due to a strong electromagnetic field.

A number of fluorescent pH sensors have already been established in which derivatives of 8-hydroxypyrene-1,3,6-trisulfonate (HPTS)¹, fluoresceins² and benzo[g]xanthene dyes³ have been the most common pH-sensitive indicator dyes. Most of these indicators, however, still are subject to limitations. Fluoresceins are commonly known for their limited photostability. HPTS derivatives are excitable at relatively short (<500 nm) wavelengths which results in high levels of autofluorescence and scattering background. Benzo[g]xanthene dyes are long-wave excitable, but offer only limited brightness (defined as the product of molar absorption coefficient ϵ and fluorescence quantum yield^{3a}, Φ_F) $\leq 12 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, which is at least 5 times lower than for the dyes presented in this work, and are prone to photobleaching⁴.

Rhodamines are xanthene dyes featuring outstanding brightness (high ϵ about $1 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ and Φ_F of 0.7–1 for most derivatives), generally good solubility in water and good photostability⁵. These properties have enabled their application in cell imaging⁶ and single molecule imaging⁷, for the characterisation of micelles⁸ and polymer beads⁹, as standards for fluorescence quantum yield¹⁰ or as molecular switches^{7b, 11} and fluorescence thermometers¹², to state only a few. Numerous rhodamine-based fluorescent probes for cations—most importantly Hg(II)^{6b, 13}, Cu(II)¹⁴, Fe(III)¹⁵, Pb(II)¹⁶ – and thiols¹⁷ have been presented. On the other hand pH-sensitive systems relying on rhodamines as pH probes¹⁸ are less common. Since most of these systems take advantage of the cyclisation equilibrium in rhodamines leading to non-fluorescent spiro-lactams we believe that alternative concepts for designing pH indicators on the basis of rhodamine dyes are of high interest.

Here we present a new class of amino-functional rhodamines the pH-sensitivity of which originates from the intramolecular photoinduced electron transfer process (PET)¹⁹ between non-protonated amino groups and the excited chromophore (Figure 1). To the best of our knowledge, only very few examples for pH-sensitive PET rhodamines²⁰ can be found in the literature and those focus on application as probes in solution, not in a solid sensor matrix. The new dye class is accessible by a straightforward one-step synthesis. It carries a pentafluorophenyl group in the 9-position of the xanthene core which is employed for simple and effective covalent coupling by “click” reaction with mercapto groups. Covalent indicator linkage can be highly beneficial for pH optrodes since it suppresses migration and aggregation processes. Nucleophilic substitution in pentafluorophenyl groups has recently been presented as a versatile tool for grafting²¹. The suitability of the new fluorinated PET-rhodamines as indicators in pH sensors will be demonstrated.

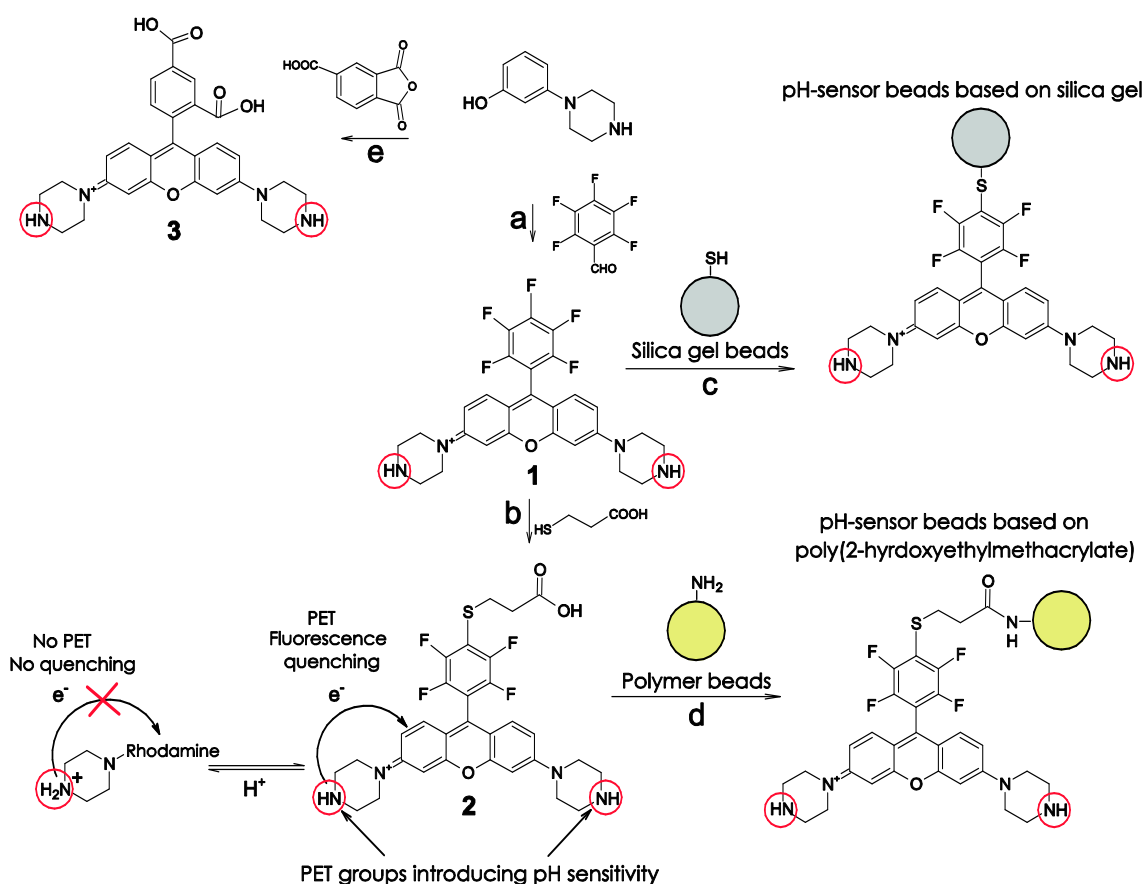


Figure 1. Preparation of the pH-indicators 1–3 and the two types of pH-sensor beads. Reagents and conditions: (a) pentafluorobenzaldehyde, CH_3SO_3H , 210 °C (28%); (b) 3-mercaptopropionic acid, Et_3N , N,N' -dimethylacetamide, 50 °C (39%); (c) mercapto-functionalised silica gel beads, Et_3N , N,N' -dimethylacetamide, 60 °C; (d) amino-functionalised poly(HEMA) beads, DCC, NHS, DMAP, N,N' -dimethylformamide; and (e) trimellitic anhydride, CH_3SO_3H , 165 °C (21%).

2. Experimental

2.1. Materials and methods

3-(1-Piperazinyl)phenol, pentafluorobenzaldehyde, methanesulfonic acid and (3-mercaptopropyl)trimethoxysilane were purchased from ABCR (www.abcr.de). Urea was from Acros (www.acros.com). All other reagents were obtained from Aldrich (www.sigmaaldrich.com). All reagents were of synthesis grade. Deuterated solvents were purchased from eurisotop (www.eurisotop.com). Anhydrous pyridine and N,N -dimethylformamide were bought from Aldrich. All other solvents (synthesis grade, HPLC gradient grade), as well as potassium persulfate, sodium chloride and buffer salts, were supplied by Carl Roth (www.carlroth.de). Hydroxyethylmethacrylate and ethylene glycol dimethacrylate were filtered over aluminium oxide prior to use. Water used for HPLC chromatography was deionised using a Barnstedt

NANOpure system. Dowex® 1–8 cation exchange resin was freshly charged with chloride prior to use.

Absorption measurements were performed on a Cary 50 UV–vis spectrophotometer from Varian (www.varianinc.com). Fluorescence spectra were recorded on a Hitachi F-7000 spectrofluorimeter (www.hitachi.com). Relative fluorescence quantum yields Φ_F were determined using rhodamine 101 ($\Phi_F=0.96^{22}$; Fluka, www.sigmaaldrich.com) as a standard. Absolute fluorescence quantum yields were determined on a Fluorolog 3 spectrofluorimeter equipped with an integrating sphere (Horiba Scientific, www.horiba.com). $^1\text{H-NMR}$ spectra were recorded on a 300 MHz instrument (Bruker) with TMS as a standard. $^{19}\text{F-NMR}$ spectra were taken on a Mercury Inova 300 instrument (Bruker) at a frequency of 282.47 MHz. MALDI-TOF masses were determined on a Micromass ToFSpec 2E in reflectron mode at an accelerating voltage of +20 kV. pH calibration curves and sensor response curves were obtained by passing buffer solutions (1 ml min^{-1}) by a sensor foil placed in a home-made flow-through cell. Cell temperature was kept constant at 25 °C. The luminescent signal was interrogated with a two-phase lock-in amplifier (SR830, Stanford Research Inc., www.thinksrs.com) equipped with a green LED (λ_{max} 525 nm) from Roithner (www.roithner-laser.com), a XR3080 bandpass filter (500–540 nm; Horiba, www.horiba.com) at the excitation side and a long-pass filter (Schott, www.schott.com; OG 580 (>580 nm), unless otherwise stated) before the PMT tube (H5701-02, Hamamatsu, www.sales.hamamatsu.com). The modulation frequency of 160 Hz was used, unless otherwise stated. The pH of the phosphate and acetate buffer solutions was controlled by a digital pH metre (InoLab pH/ion, WTW GmbH & Co. KG, www.wtw.com) calibrated at 25 °C with standard buffers of pH 7.0 and 4.0 (WTW GmbH & Co. KG, www.wtw.com). The buffers were adjusted to constant ionic strength using sodium chloride as a background electrolyte. LCMS measurements were performed on a Shimadzu LCMS system equipped with a LSMS-2020 mass detector and a SPD-M20A diode array detector (www.shimadzu.de).

2.2. Preparation of dyes and sensors

N,N'-di(3-azapentane-1,5-diyl)-2',3',4',5',6'-pentafluororhodamine acetate (**1**)

A mixture of 3-(1-piperazinyl)phenol (2.7 g, 15.15 mmol), pentafluorobenzaldehyde (1.5 g, 7.65 mmol) and methanesulfonic acid (20 ml) was heated to 210 °C under vigorous stirring. Temperature was maintained for 4.5 h, pentafluorobenzaldehyde (500 mg, 2.5 mmol) was added in two equal portions during the first 2.5 h. The deep red mixture was allowed to cool to RT and was added dropwise into THF (250 ml). The sticky solid formed was redissolved in MeOH (50 ml) and again precipitated with THF (250 ml). The procedure was repeated six times until a black powder was obtained. The powder was dissolved in H_2O (100 ml) and passed over Dowex® 1–8 cation exchange resin (Carl Roth) charged with chloride. The deep red solution was dried to yield 3.8 g of crude product. Purification was performed by HPLC chromatography on an Agilent 1100 station (www.chem.agilent.com) employing a Nucleodor 100–5 μm C18ec reversed phase column (Macherey Nagel; 200×15 mm) and MeOH/0.1% aqueous acetic acid (gradient is stated

in Table 1) as the mobile phase. Upon purification, 37 mg crude product yielded 12 mg pure **1**. Owing to the limited size of the available HPLC facility, not all crude **1** was purified. If up-scaling is performed, 1.23 g (2.14 mmol, 28%) of pure **1** can be isolated. ^1H NMR (300 MHz, CD_3OD containing 0.1% HOAc and 0.1% CF_3COOH , TMS): $\delta=7.65$ ppm (2H, d, Ar-H(positions 1,8), $J_{\text{ArH}12,78}=9.6$ Hz); $\delta=7.46$ (2H, dd, Ar-H(2,7), $J_{\text{ArH}24,57}=2.5$ Hz); $\delta=7.42$ (2H, d, Ar-H(4,5)); $\delta=4.13$ (8H, t, ArNCH_2 , $J=5.2$ Hz); $\delta=3.48$ (8H, t, HNCH_2); $\delta=1.99$ (3H, s, $\text{H}_{\text{acetate}}$). ^{19}F -NMR (282.5 MHz, D_2O): $\delta=-139$ ppm (2F, d, $J=20$ Hz); $\delta=-150$ (1F, t, $J=21$ Hz); $\delta=-160$ (2F, dt, $J_1=6$ Hz, $J_2=21$ Hz). MALDI-TOF: m/z [MH^+] 515.1847 found, 515.1870 calcd.

Table 1. HPLC gradient used for the purification of **1**.

Time/min	Ratio MeOH/%	Ratio 0.1% aqueous HOAc/%	Flow rate/ml · min ⁻¹
0	0	100	4
10	30	70	4
11	100	0	4
16	100	0	4
17	0	100	4
22	0	100	4

N,N'-di(3-azapentane-1,5-diyl)-4'-(2-carboxyethylmercapto)-2',3',5',6'-tetrafluororhodamine acetate (**2**)

Crude **1** (328 mg, containing 157 mg, 278 μmol of pure **1**¹), *N,N*-dimethylacetamide (8 ml) and triethylamine (248 μl , 1.78 μmol) were heated to 50 °C and 3-mercaptopropionic acid (34.4 μl , 390 μmol) was added dropwise. Temperature was maintained for 3 h and the mixture was washed with hexane until a solid residue was obtained (4×100 ml). The residue was dissolved in MeOH/1 M aqueous HCl 1:1 (3×10 ml) and precipitated with THF (3×150 ml). Crude **2** was obtained as a black powder (130 mg). Purification was performed similarly to **1** (different gradient is stated in Table 2) and yielded 19 mg of pure **2** (35 mg crude product; 71 mg (0.11 mmol, 39%) if up-scaled). ^1H NMR (300 MHz, CD_3OD containing 0.1% CF_3COOH , TMS): $\delta=7.55$ ppm (2H, d, Ar-H(positions 1,8), $J_{\text{ArH}12,78}=9.6$ Hz); $\delta=7.32$ (2H, dd, Ar-H(2,7), $J_{\text{ArH}24,57}=2.3$ Hz); $\delta=7.26$ (2H, d, Ar-H(4,5)); $\delta=4.06$ (8H, t, ArNCH_2 , $J=4.9$ Hz); $\delta=3.48$ (8H, t, HNCH_2); $\delta=3.32$ (2H, t, ArSCH_2 , $J=6.7$ Hz); $\delta=2.76$ (2H, t, CH_2COOH); $\delta=2.06$ (4.7H, s, $\text{H}_{\text{acetate}}$). ^{19}F -NMR (282.5 MHz, D_2O): $\delta=-132$ ppm (2F, q, $J=11$ Hz); $\delta=-139$ (2F, q, $J=11$ Hz). MALDI-TOF: m/z [MH^+] 601.1923 found, 601.1896 calcd.

¹ Crude **1** was used for the synthesis of **2**. The assay of **1** in the crude product can be easily calculated. The total rhodamine content is equal to the ratio of the molar absorption coefficients of crude and pure product (which is $4.3 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1} / 8.9 \times 10^4 = 0.48$). Figure ASI 13 shows that there are no other rhodamines contained in the crude product (no impurities absorbing at 540 nm). Therefore, the assay of **1** in the crude product is 48% (w/w). For calculation, chloride was the assumed counter ion for crude **1**, while pure **1** is the acetate salt.

Table 2. HPLC gradient used for the purification of **2**.

Time/min	Ratio MeOH/%	Ratio 0.1% aqueous HOAc/%	Flow rate/ml · min ⁻¹
0	10	90	16
30	25	75	16
32	100	0	16
40	100	0	16

N,N'-di(3-azapentane-1,5-diyl)-2',4'-dicarboxyrhodamine acetate (**3**)

Trimellitic anhydride (1.62 g, 8.42 mmol), 3-(1-piperazinyl)phenol (3 g, 16.83 mmol) and methanesulfonic acid (25 ml) were heated to 165 °C. Temperature was maintained for 3.5 h, the deep red mixture was allowed to cool to RT and was added dropwise into THF (100 ml). The sticky black precipitate was redissolved in MeOH and precipitated by adding THF. The procedure was repeated six times to yield crude **3** (1.8 g) as a black powder. Purification was performed similarly to **1** (different gradient is stated in Table 3) and yielded 14 mg of pure **3** (44 mg crude product; 890 mg (1.74 mmol, 21%) if up-scaled). Both the 4'-carboxy and the 5'-carboxy regioisomer could be isolated in pure form and identified by NMR spectroscopy (See Figure ASI 9 and Figure ASI 10 in Appendix A). Although the 5'-carboxy isomer was formed in comparable amounts (Figure ASI 18) and is equally suitable for the present application, only pure 4'-carboxy isomer was used for characterisation. ¹H NMR (300 MHz, D₂O, TMS): δ=8.32 ppm (1H, s, Ar-H(position 3')); δ=8.00 ppm (1H, d, Ar-H(5'), *J*_{ArH5'6'}=7.5 Hz); δ=7.27 (3H, d, Ar-H(6',1,8), *J*_{ArH12,78}=9.3 Hz); δ=7.06 (2H, d, Ar-H(2,7)); δ=6.97 (2H, s, Ar-H(4,5)); δ=3.85 (8H, broad s, ArNCH₂); δ=3.35 (8H, broad s, HNCH₂); δ=1.90 (3H, s, H_{acetate}). MALDI-TOF: m/z [MH⁺] 513.2101 found, 513.2138 calcd.

Table 3. HPLC gradient used for the purification of **3**.

Time/min	Ratio MeOH/%	Ratio 0.1% aqueous HOAc/%	Flow rate/ml · min ⁻¹
0	0	100	4
12	30	70	4
12.5	100	0	4
16.5	100	0	4
17	0	100	4
21	0	100	4

2.3. Mercapto-functionalised silica gel beads

Li Chrospher 60 silica gel beads (Merck, average size 5 μm ; 1 g) were dispersed in EtOH/H₂O 19:1 (40 ml) in a polypropylene vessel. (3-Mercaptopropyl)trimethoxysilane (26.8 μl , 0.144 mmol) and acetic acid (2 ml) were added and the mixture was stirred overnight at RT. The beads were separated by centrifugation (2450 g), washed with EtOH (6 \times 50 ml) and dried (60 $^{\circ}\text{C}$, 1 bar).

2.4. Amino-functionalised poly(hydroxyethylmethacrylate) (poly(HEMA)) beads

Poly(HEMA) beads were prepared adapting a method reported in the literature²³. Poly(vinyl alcohol) (86,000 g mol⁻¹, 99% hydrolysed) (3 g) was dissolved in refluxing H₂O (300 ml). The mixture was allowed to cool to 40 $^{\circ}\text{C}$ and flushed with nitrogen for 30 min. 2-Hydroxyethylmethacrylate (3.26 ml, 27.3 mmol), ethylene glycol dimethacrylate (0.36 ml, 1.91 mmol), 2-aminoethylmethacrylate hydrochloride (80 mg, 0.48 mmol) and potassium persulfate (3 mg, 0.01 mmol) were added, the mixture was heated to 70 $^{\circ}\text{C}$ and stirred under a gentle nitrogen stream for 18 h. The precipitated beads were separated by centrifugation (2450 g), washed with H₂O (4 \times 100 ml) and EtOH (3 \times 100 ml) and freeze-dried (1 mbar, -90 $^{\circ}\text{C}$, 18 h) to yield 1.6 g of a white powder.

2.5. pH-sensitive silica gel beads

A mixture of mercapto-functionalised silica gel beads (250 mg), rhodamine dye **1** (1 mg, 1.74 μmol), triethylamine (2.7 μl , 0.019 mmol) and *N,N*-dimethylacetamide (1 ml) was heated to 60 $^{\circ}\text{C}$ under vigorous stirring for 6 h. The beads were separated by centrifugation (2450 g), washed with 10 mM HCl (6 \times 5 ml), EtOH (2 \times 5 ml) and H₂O (6 \times 5 ml) and dried (60 $^{\circ}\text{C}$, 1 bar).

2.6. pH-sensitive poly(HEMA) beads

2 (1 mg, 1.5 μmol) was dissolved in anhydrous *N,N*-dimethylformamide (DMF; 0.5 ml) and dicyclohexylcarbodiimide (DCC; 1.37 mg, 6.6 μmol) was added. The solution was stirred at RT for 15 min and *N*-hydroxysuccinimide (NHS; 1 mg, 8.7 μmol) was added. After 45 min, a dispersion of amino-functionalised poly(HEMA) beads (100 mg) in anhydrous pyridine (1 ml) and a catalytic amount of 4-(dimethylamino)pyridine (DMAP) were added. The mixture was stirred overnight. The beads were separated by centrifugation (2450 g), washed with DMF (2 \times 5 ml), CH₂Cl₂ (2 \times 5 ml), EtOH (3 \times 5 ml), 10 mM HCl (5 \times 5 ml) and H₂O (3 \times 5 ml) and freeze-dried (1 mbar, -90 $^{\circ}\text{C}$, 18 h).

2.7. Preparation of Cr(III)-doped Al₂O₃ (ruby)

Al(NO₃)₃·9H₂O (16.54 g, 44 mmol), Cr(NO₃)₃·9H₂O (0.36 g, 0.90 mmol) and urea (18 g, 0.3 mol) were dissolved in H₂O (100 ml). The mixture was concentrated until a turquoise gel was obtained. The gel was heated to 500 °C and kept at this temperature for 10 min. After cooling to RT, the green solid was ground in a mortar and sintered for 24 h at 1100 °C in air. The pale pink powder obtained was ground in a ball mill to yield 1.9 g of fine Cr-doped Al₂O₃.

2.8. Preparation of the sensor foils

pH-sensitive silica gel beads in D4 hydrogel: A “cocktail” containing silica gel beads (28 mg), hydrogel D4 (41 mg) and EtOH/H₂O 9:1 (500 µl) was knife-coated on a dust-free Mylar support to obtain a sensing layer of about 12.5 µm thickness after solvent evaporation.

pH-sensitive cross-linked poly(HEMA) beads in linear poly(HEMA): Linear poly(HEMA) (MW=150,000 g mol⁻¹) was dissolved in EtOH:H₂O (9:1 V/V), insoluble residues were separated by centrifugation and discarded. Cross-linked poly(HEMA) beads (10 mg) were added to the obtained solution (29 mg polymer in 500 µl) and the “cocktail” was knife-coated on a dust-free Mylar support to give a sensing layer of about 7 µm thickness after solvent evaporation.

3. Results and discussion

Structures and syntheses of the new pH indicators and sensors are shown in Figure 1. They are based on **1** which, unlike other rhodamines, does not carry a 2'-carboxy group. For comparison, compound **3** bearing a 2'-carboxy group is also investigated. pH-sensitive rhodamines have been covalently coupled to two different sensor matrices, i.e. silica gel beads and cross-linked poly(2-hydroxyethylmethacrylate) (poly(HEMA)) beads. Polymer hydrogels like poly(HEMA) are the most common matrices in pH sensors. Silica gel represents an interesting alternative material with very different properties. **1** was linked by direct reaction with mercapto-functionalised silica gel beads, while another route involving **2** was employed for the attachment to amino-functionalised poly(HEMA) beads.

3.1. Photophysical properties

The photophysical properties of the synthesised rhodamines and commercially available rhodamine B are displayed in Table 4. The electron-withdrawing highly fluorinated phenyl substituent causes a bathochromic shift of ≈30 nm for both acidic and basic form in compounds **1** and **2** in comparison to **3**. They are therefore excitable at >70 nm longer wavelength than such widely used pH indicators as fluorescein or pyrene derivatives. Luminescence brightness is often expressed as the product of molar absorption coefficient ε and fluorescence quantum yield Φ_F.

Both are comparable to the high values known for rhodamines. A somewhat lower Φ_F was found for **1**, while **2** shows almost equal Φ_F to **3** and rhodamine B. Note that mercapto-substituted **2** rather represents the rhodamine structures present in the sensors and is therefore more valid for comparison. Similar Φ_F around 0.6 were found for the presented sensor materials (Table 5). ϵ are even higher for **1** and **2** than for **3**. Consequently, luminescence brightness of a mercapto-substituted pentafluorophenyl-rhodamine such as **2** is as high as in the case of rhodamines carrying a 2'-carboxy group. Note that in Table 4, lower ϵ are accompanied by broader absorption peaks (higher half-widths at half maximum, HWHM) so that the integral absorptions of all rhodamines are similar.

Table 4. Photophysical properties of **1–3** and rhodamine B: absorption maximum (λ_{\max} abs) and corresponding molar absorption coefficient (ϵ); half-width at half maximum in absorption (HWHM); fluorescence emission maximum (λ_{\max} em); relative fluorescence quantum yield (Φ_F). Values were determined in aqueous buffer solution, unless otherwise stated. Organic solvents were acidified with CF_3COOH (0.1% V/V) and made basic with Et_3N (0.1% V/V).

Compound	λ_{\max} abs ($\epsilon \cdot 10^{-4}$)/nm ($\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$) acidic/basic	HWHM/nm acidic/basic	λ_{\max} em/nm acidic	Φ_F acidic/basic
1	560(8.82)/584(7.62)	40/57	588	0.40/<0.01
2	561(10.2)/583(8.17)	39/54	591	0.67/0.02
3	533(8.46)/554(8.38)	42/43	562	0.69/<0.01
Rhodamine B ^a	543(10.6)	35	565	0.70

^a All values in EtOH, without any acid or base added.

Table 5. Photophysical properties of the sensing materials. The sensor foils were treated with acidic/basic buffer solution, pH 4/9. Prior to measuring Φ_F , the foils were acidified with HCl vapour.

Sensor	λ_{\max} exc/nm acidic/basic	λ_{\max} em/nm acidic/basic	Φ_F acidic
Silica gel beads in D4 hydrogel	572/583	598/609	0.65
Cross-linked poly(HEMA) beads in linear poly(HEMA)	576/592	601/612	0.61

3.2. pH-sensitive properties in aqueous solution

Absorption and fluorescence spectra of **2** together with pH calibration curves of **1–3** are shown in Figure 2. pH sensitivity is caused by a strong decrease in emission intensity due to photoinduced electron transfer (PET). The sensitive range is around pH=7 so that all dyes are potentially useful for fluorescence imaging in physiological samples. Fluorescence is essentially

turned off as deprotonation of the piperazonium groups occurs. A hypsochromic shift of about 20 nm is observed for the absorption spectra of **1–3** upon protonation (Table 4). This effect is not related to PET. It can be attributed to the electron-withdrawing effect of the positively charged piperazonium groups located in proximity of the rhodamine core. Note that fluorescence spectra are not bathochromically shifted with increasing pH. This indicates that the highly fluorescent acidic form is in equilibrium with a non-fluorescent basic one quenched by PET.

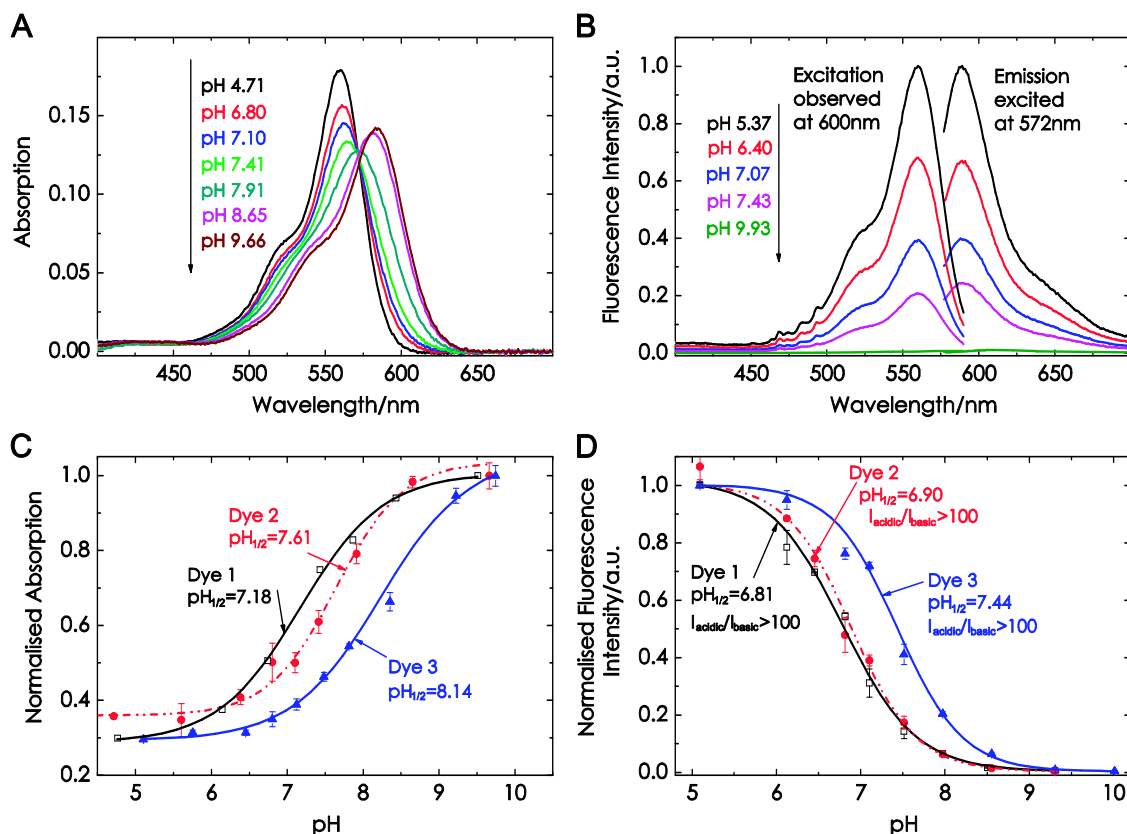


Figure 2. pH-sensitive properties of **1–3** in aqueous buffer solution (ionic strength 100 mM). Absorption spectra (A) and fluorescence spectra (B) of **2**, dye concentration was 2 μM while recording absorption and 0.05 μM while recording fluorescence spectra. Spectra of **1** and **3** are similar and can be found in the electronic supplementary information. (C) pH calibration curves of **1** (squares), **2** (circles) and **3** (triangles) based on absorption, observed in the absorption maximum of the basic form. (D) Corresponding curves based on fluorescence emission, observed in the emission maximum of the acidic form. $pH_{1/2}$ is the pH at which half of the overall pH-dependent signal change is observed.

The sensitive range of **1** and **2** (Figure 2) is found at lower pH than the one of **3**, which illustrates the incomplete decoupling between the piperazinyl groups and the chromophore. The acidic form of **1** and **2** is more strongly destabilised by the vicinity of the rhodamine core that carries a strongly electron-withdrawing fluorinated substituent. Absorption calibration shows response at considerably higher pH than fluorescence calibration. This can be attributed to the fact that shifts in absorption are related to the deprotonation of both piperazonium groups, whereas the deprotonation of the first group may already cause highly efficient PET.

Figure 3 emphasises that **1** does not undergo lactonisation under conditions where **3** is almost completely present in the lactone form. Lactame formation, a very similar process, has been taken advantage of to introduce pH sensitivity into rhodamines^{18a-f}. In the present system,

however, preliminary experiments showed that lactonisation causes almost complete decolouring of PET rhodamine **3** as soon as it is linked to a sensor matrix. Therefore, the sensors presented in this work rely exclusively on the PET mechanism and employ dyes that do not undergo lactonisation.

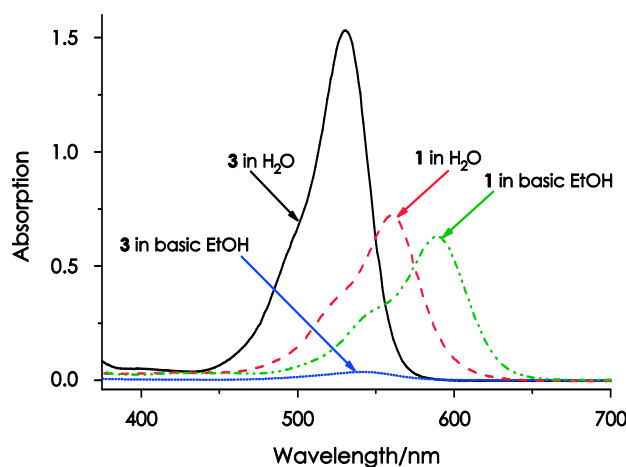


Figure 3. Lactonisation of **3**, visualised by absorption spectra in H₂O and basic EtOH (containing Et₃N, 0.1% V/V). Due to lactonisation, virtually no absorption is observed in basic EtOH. On the other hand, **1** shows a shift but no attenuation of absorption in basic EtOH compared to H₂O. The slight decrease in the absorption maximum is due to peak broadening, not lactonisation.

3.3. Sensors with covalent dye linkage

Covalent attachment of pH-sensitive rhodamine to both silica gel and cross-linked poly(2-hydroxyethylmethacrylate) (poly(HEMA)) beads was successful, yielding pH sensor beads. For characterisation, the beads were dispersed in polyurethane hydrogel D4[®] (for the silica gel beads) or in linear poly(HEMA) (for the cross-linked poly(HEMA) beads) to yield planar optodes. Bright orange fluorescence of the obtained sensors is clearly visible for the acidic form (Figure 4) and absolute fluorescence quantum yields were found to be rather high (Table 5). Both sensor types exhibit excellent sensitivity and are most useful for measuring pH 5–7 which fits the pH range of interest in many biotechnological applications. The sensors respond at lower pH than the aqueous solutions of **1** and **2**. That is most likely due to the less polar environment in the sensor which destabilises the highly charged acidic form. Förster resonance energy transfer from the acidic to the basic form may also contribute to this effect, since the dye concentration is significantly higher in the sensors than in solution. Despite the high charge of the indicator dye, the sensors show small to moderate cross-sensitivity to ionic strength (Figure 5). That is particularly true if the ionic strength (IS) is ≥ 100 mM, which is the case in the majority of biotechnological applications. For the silica gel sensors, errors are ≤ 0.1 pH-units if IS=100–200 mM and ≤ 0.2 pH-units if IS=100–500 mM. They are smaller for the sensor based on poly(HEMA) beads (≤ 0.05 pH-units if IS=100–200 mM and ≤ 0.1 pH-units if IS=100–500 mM), which is expected since poly(HEMA) is a less charged matrix than silica gel^[2c, 24]. The response times are fairly fast ($\tau_{90} < 2$ min for the sensor based on silica gel beads; $\tau_{90} = 2$ –3 min for the sensor based on poly(HEMA)). Reversibility and repeatability of the sensors are very good, as demonstrated in Figure 7B and Appendix A in the additional supporting information.

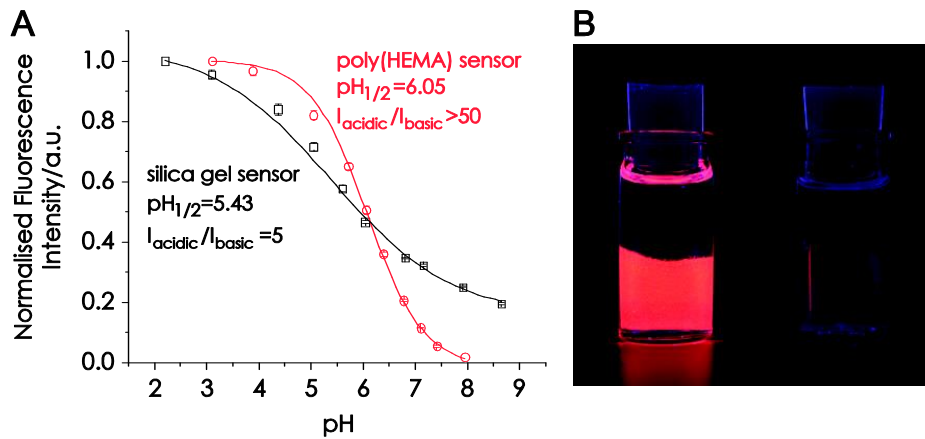


Figure 4. (A) pH Calibration curves (ionic strength 100 mM) for the sensor foils based on silica gel beads in D4[®] hydrogel and cross-linked poly(HEMA) beads in linear poly(HEMA), both carrying covalently linked PET rhodamine. $pH_{1/2}$ is the pH at which half of the overall pH-dependent signal change is observed. (B) Photographic image of the poly(HEMA) sensor foils in acidic (pH 4) and basic (pH 9) buffer.

Detailed calibration curves are shown in Figure 4. The silica gel sensor beads are applicable over a broad range (pH 3–8). Measuring at $pH > 8$ (which is essentially outside the sensitive range) is not recommended and leads to irreversible signal decrease. That is probably caused by hydrolytic cleavage of the Si-O bonds that attach the indicator to the silica gel surface. At $pH \leq 7.5$, no signal decrease was observed over many hours. Notably, pH response is broader and quenching at basic pH is less effective than in solution or in the poly(HEMA) beads. This may be related to stabilisation of the cationic acidic form by the negatively charged silica gel surface. Other effects may also contribute to the observed phenomenon. In fact, Gao et al.²⁵ demonstrated that fluorescence of a rhodamine dye bound to a silica gel surface can be enhanced at increasing pH.

The sensor based on poly(HEMA) beads shows very strong quenching at basic pH and a sharper response at pH 5–7, thus offering excellent sensitivity in this range. It is highly suitable for probing biotechnological samples.

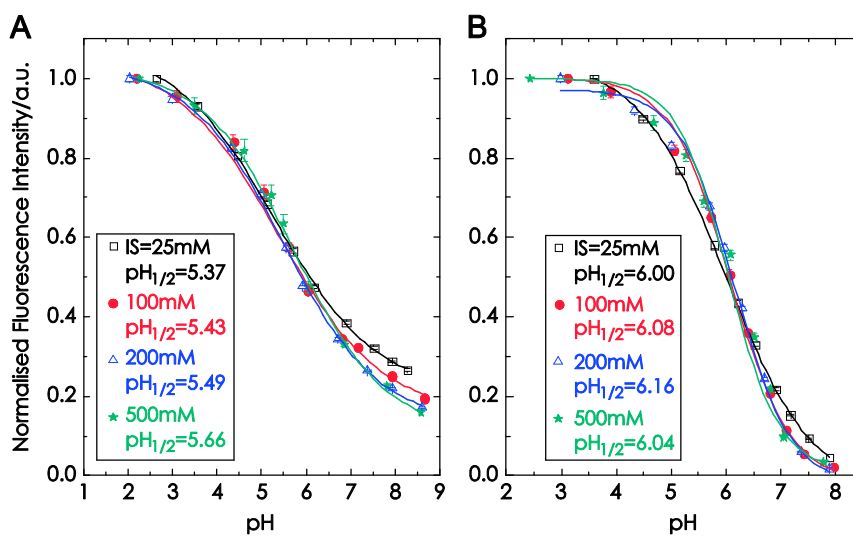


Figure 5. Calibration curves of the sensor based on silica gel beads (A) and on poly(HEMA) beads (B), measured at different ionic strengths (IS), and corresponding $pH_{1/2}$ values (pH value at which half of the overall pH-dependent signal change is observed).

3.4. Photostability

We expected the electron-withdrawing pentafluorophenyl group to suppress photooxidation and therefore improve the photostability of the rhodamines **1** and **2**, compared to **3**. However, the opposite effect was found for **1–3** in aqueous solution (Figure 6) where **1** and **2** showed measureable photodegradation when illuminated with a high-power 525 nm LED (3 W). This suggests a non-oxidative mechanism as main photodegradation pathway. Therefore, worse photostability can be a drawback in the current system based on pentafluorophenylrhodamines, compared to the “classical” rhodamines carrying 2'-carboxyphenyl substituents. However, the sensors based on **1** and **2** are still very robust under the employed measurement conditions. In fact, continuous illumination with a standard 5 mm, 525 nm LED over >5 h caused no changes in the fluorescence signal. Note that for practical applications, continuous illumination is often not necessary so that measurement can be carried out for a much longer time before recalibration is required. Indeed, if long-time application and high light densities are required, the photostability of the sensors might become an issue.

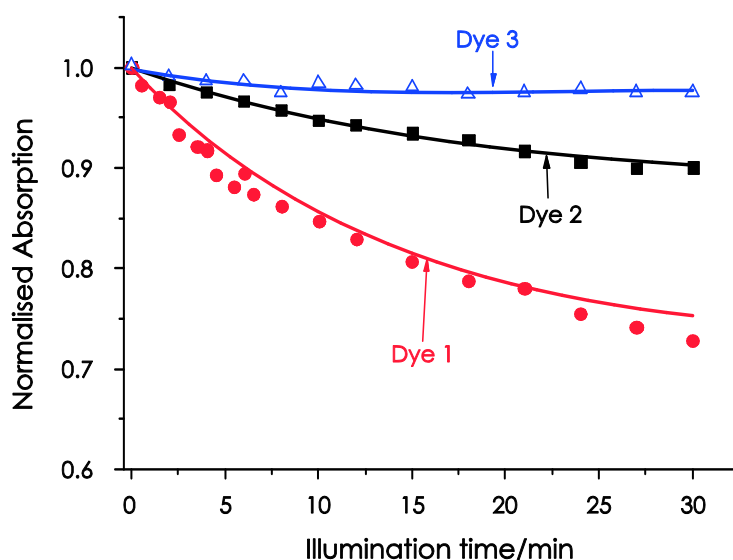


Figure 6. Photodegradation profiles (approximated with monoexponential decay) of **1–3** in aqueous buffer solution (100 mM; pH=7.5) when illuminated with a 525 nm high-power LED (3 W). The solutions (3 ml) were placed in a glass cuvette and irradiated in a fixed position with respect to the light source. The photodegradation profiles were obtained by monitoring the absorption spectra in the absorption maximum of each dye. Dye concentration was adjusted so that $A_{525}=0.4$ for all dyes.

3.5. Dually lifetime referenced pH sensor

For practical applications, an optical sensor based on fluorescence intensity requires referencing. One possibility is the combination with a luminescent reference material and interrogation by phase fluorimetry (dual lifetime referencing, DLR)²⁶. The observed phase shift is then a function of the ratio between luminescence intensity of the fluorescent indicator and the luminescent reference material. Cr(III)-doped Al₂O₃ (ruby) was chosen as a reference material

because it is spectrally compatible with the sensor particles and the light source (525 nm LED; Figure 7A) and features good chemical stability and photostability. A typical measurement with pH-sensitive silica particles as sensitive material is shown in Figure 7B. The referenced sensor shows excellent response and reversibility.

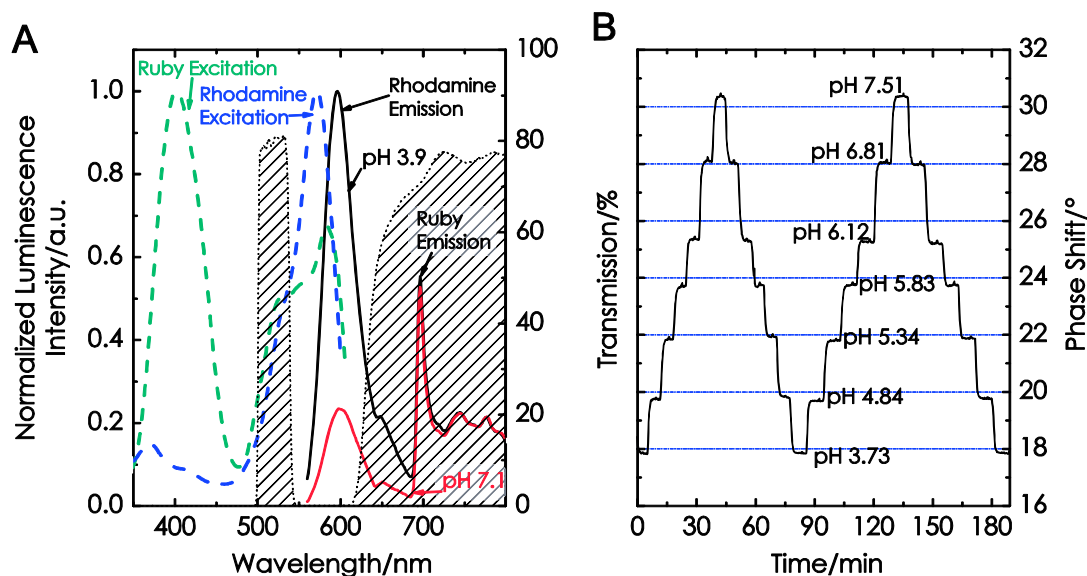


Figure 7. Properties of the DLR pH sensor (pH-sensitive silica gel beads:ruby 1:6 w/w in a 10 μm thick D4 hydrogel layer): (A) normalised luminescence excitation (dashed lines) of the rhodamine linked to silica gel particles and of ruby; luminescence emission (solid lines) of the DLR sensor at two different pH (both spectra were normalised dividing by the largest intensity count measured at pH 3.9), recorded with a spectrofluorimeter ($\lambda_{\text{exc}}=525$ nm). The transmission of the excitation filter (500–540 nm) and emission filter (>630 nm) are visualised by striped areas. (B) pH-response curve recorded by phase modulation fluorimetry (modulation frequency 550 Hz).

4. Conclusion

A new class of pH-sensitive rhodamines has been presented. Their pH-sensitivity originates from photoinduced electron transfer (PET) from non-protonated amino groups to the excited chromophore. In respect to synthetic accessibility and performance as pH-indicators, they represent a promising alternative to the pH-sensitive rhodamines employing lactame-formation which have been extensively studied^{18b-f}. The new dyes are suitable for pH monitoring not only in the dissolved state, but also as indicators in pH sensors. In contrast to the rhodamine bearing a 2,4-dicarboxyphenyl group (dye **3**), the new indicators carry a pentafluorophenyl group which enables facile and effective grafting via “click” chemistry. Furthermore, the sensitive properties of the new indicators are not affected by pH-dependent lactonisation, while almost complete lactonisation in the same environment was detected for **3**. Sensors with covalent indicator linkage have been successfully prepared based on two matrix materials, silica gel and poly(2-hydroxyethylmethacrylate). Both sensors feature bright fluorescence ($\Phi_F \approx 0.6$) and their sensitive range perfectly matches the pH range of interest for many biotechnological applications (i.e. pH 5–7). They also show good response times, repeatability and long-term stability. For practical applications, a dually lifetime referenced sensor has been presented. Cross-sensitivity to ionic

strength causes small to moderate errors (generally 0–0.1, at most 0.2 pH units), provided that the ionic strength is 100–500 mM, which is the case in most biotechnological applications. Although photostability is impaired by the pentafluorophenyl group, it does not compromise the applicability of the sensors under the tested conditions which can be used for a long time without a measurable signal decrease.

Acknowledgement

Financial support from the Austrian Science Fund FWF (Project no. P 21192-N17) and from the Spanish Ministry of Education (Joint Project no. AT2009-0019) is gratefully acknowledged. The authors thank the Institute of Organic Chemistry, Graz University of Technology, particularly Jana Rentner, MSc for kind support in performing LC-MS. Furthermore, we thank Johann Pichler, Institute of Inorganic Chemistry, Graz University of Technology, for acquiring ^{19}F -NMR spectra, as well as Sarah Schiller and Stefan Schobesberger.

References

1. (a) Schulman, S. G.; Shangxian, C.; Bai, F.; Leiner, M. J. P.; Weis, L.; Wolfbeis, O. S., Dependence of the fluorescence of immobilized 1-hydroxypyrene-3,6,8-trisulfonate on solution pH: Extension of the range of applicability of a pH fluorosensor. *Analytica Chimica Acta* **1995**, *304* (2), 165-170; (b) Kermis, H. R.; Kostov, Y.; Rao, G., Rapid method for the preparation of a robust optical pH sensor. *Analyst* **2003**, *128* (9), 1181-1186; (c) Hakonen, A.; Hulth, S., A high-precision ratiometric fluorosensor for pH: Implementing time-dependent non-linear calibration protocols for drift compensation. *Analytica Chimica Acta* **2008**, *606* (1), 63-71.
2. (a) Chan, Y.-H.; Wu, C.; Ye, F.; Jin, Y.; Smith, P. B.; Chiu, D. T., Development of Ultrabright Semiconducting Polymer Dots for Ratiometric pH Sensing. *Analytical Chemistry* **2011**, *83* (4), 1448-1455; (b) Shi, W.; He, S.; Wei, M.; Evans, D. G.; Duan, X., Optical pH Sensor with Rapid Response Based on a Fluorescein-Intercalated Layered Double Hydroxide. *Advanced Functional Materials* **2010**, *20* (22), 3856-3863; (c) Weidgans, B. M.; Krause, C.; Klimant, I.; Wolfbeis, O. S., Fluorescent pH sensors with negligible sensitivity to ionic strength. *Analyst* **2004**, *129* (7), 645-650; (d) Medina-Castillo, A. L.; Fernández-Sánchez, J. F.; Segura-Carretero, A.; Fernández-Gutiérrez, A., Design and synthesis by ATRP of novel, water-insoluble, lineal copolymers and their application in the development of fluorescent and pH-sensing nanofibres made by electrospinning. *Journal of Materials Chemistry* **2011**, *21* (18), 6742-6750.
3. (a) Whitaker, J. E.; Haugland, R. P.; Prendergast, F. G., Spectral and photophysical studies of benzo[c]xanthene dyes: Dual emission pH sensors. *Analytical Biochemistry* **1991**, *194* (2), 330-344; (b) Zhang, F.; Ali, Z.; Amin, F.; Feltz, A.; Oheim, M.; Parak, W. J., Ion and pH Sensing with Colloidal Nanoparticles: Influence of Surface Charge on Sensing and Colloidal Properties. *ChemPhysChem* **2010**, *11* (3), 730-735; (c) Aslan, K.; Lakowicz, J.; Szymanski, H.; Geddes, C., Enhanced Ratiometric pH Sensing Using SNAFL-2 on Silver Island Films: Metal-enhanced Fluorescence Sensing. *J Fluoresc* **2005**, *15* (1), 37-40.
4. Borisov, S. M.; Gatterer, K.; Klimant, I., Red light-excitable dual lifetime referenced optical pH sensors with intrinsic temperature compensation. *Analyst* **2010**, *135* (7), 1711-1717.
5. Beija, M.; Afonso, C. A. M.; Martinho, J. M. G., Synthesis and applications of Rhodamine derivatives as fluorescent probes. *Chemical Society Reviews* **2009**, *38* (8), 2410-2433.

6. (a) Yang, H.; Zhuang, Y.; Hu, H.; Du, X.; Zhang, C.; Shi, X.; Wu, H.; Yang, S., Silica-Coated Manganese Oxide Nanoparticles as a Platform for Targeted Magnetic Resonance and Fluorescence Imaging of Cancer Cells. *Advanced Functional Materials* **2010**, *20* (11), 1733-1741; (b) Wang, H.; Li, Y.; Xu, S.; Li, Y.; Zhou, C.; Fei, X.; Sun, L.; Zhang, C.; Li, Y.; Yang, Q.; Xu, X., Rhodamine-based highly sensitive colorimetric off-on fluorescent chemosensor for Hg²⁺ in aqueous solution and for live cell imaging. *Organic & Biomolecular Chemistry* **2011**, *9* (8), 2850-2855.
7. (a) Li, L.; Tian, X.; Zou, G.; Shi, Z.; Zhang, X.; Jin, W., Quantitative Counting of Single Fluorescent Molecules by Combined Electrochemical Adsorption Accumulation and Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy. *Analytical Chemistry* **2008**, *80* (11), 3999-4006; (b) Bossi, M.; Fölling, J.; Belov, V. N.; Boyarskiy, V. P.; Medda, R.; Egner, A.; Eggeling, C.; Schönle, A.; Hell, S. W., Multicolor Far-Field Fluorescence Nanoscopy through Isolated Detection of Distinct Molecular Species. *Nano Letters* **2008**, *8* (8), 2463-2468.
8. Quitevis, E. L.; Marcus, A. H.; Fayer, M. D., Dynamics of ionic lipophilic probes in micelles: picosecond fluorescence depolarization measurements. *The Journal of Physical Chemistry* **1993**, *97* (21), 5762-5769.
9. Prazeres, T. J. V.; Fedorov, A.; Martinho, J. M. G., Dynamics of Oligonucleotides Adsorbed on Thermosensitive Core-Shell Latex Particles. *The Journal of Physical Chemistry B* **2004**, *108* (26), 9032-9041.
10. Crosby, G. A.; Demas, J. N., Measurement of photoluminescence quantum yields. Review. *The Journal of Physical Chemistry* **1971**, *75* (8), 991-1024.
11. Bossi, M.; Belov, V.; Polyakova, S.; Hell, S. W., Reversible Red Fluorescent Molecular Switches. *Angewandte Chemie International Edition* **2006**, *45* (44), 7462-7465.
12. Shiraiishi, Y.; Miyamoto, R.; Zhang, X.; Hirai, T., Rhodamine-Based Fluorescent Thermometer Exhibiting Selective Emission Enhancement at a Specific Temperature Range. *Organic Letters* **2007**, *9* (20), 3921-3924.
13. (a) Soh, J. H.; Swamy, K. M. K.; Kim, S. K.; Kim, S.; Lee, S.-H.; Yoon, J., Rhodamine urea derivatives as fluorescent chemosensors for Hg²⁺. *Tetrahedron Letters* **2007**, *48* (34), 5966-5969; (b) Yang, Y.-K.; Yook, K.-J.; Tae, J., A Rhodamine-Based Fluorescent and Colorimetric Chemodosimeter for the Rapid Detection of Hg²⁺ Ions in Aqueous Media. *Journal of the American Chemical Society* **2005**, *127* (48), 16760-16761.
14. (a) Dujols, V.; Ford, F.; Czarnik, A. W., A Long-Wavelength Fluorescent Chemodosimeter Selective for Cu(II) Ion in Water. *Journal of the American Chemical Society* **1997**, *119* (31), 7386-7387; (b) Xiang, Y.; Tong, A.; Jin, P.; Ju, Y., New Fluorescent Rhodamine Hydrazone Chemosensor for Cu(II) with High Selectivity and Sensitivity. *Organic Letters* **2006**, *8* (13), 2863-2866.
15. Xiang, Y.; Tong, A., A New Rhodamine-Based Chemosensor Exhibiting Selective Fe(III)-Amplified Fluorescence. *Organic Letters* **2006**, *8* (8), 1549-1552.
16. Kwon, J. Y.; Jang, Y. J.; Lee, Y. J.; Kim, K. M.; Seo, M. S.; Nam, W.; Yoon, J., A Highly Selective Fluorescent Chemosensor for Pb²⁺. *Journal of the American Chemical Society* **2005**, *127* (28), 10107-10111.
17. Tang, B.; Xing, Y.; Li, P.; Zhang, N.; Yu, F.; Yang, G., A Rhodamine-Based Fluorescent Probe Containing a Se-N Bond for Detecting Thiols and Its Application in Living Cells. *Journal of the American Chemical Society* **2007**, *129* (38), 11666-11667.
18. (a) Kim, H. N.; Lee, M. H.; Kim, H. J.; Kim, J. S.; Yoon, J., A new trend in rhodamine-based chemosensors: application of spirolactam ring-opening to sensing ions. *Chemical Society Reviews* **2008**, *37* (8), 1465-1472; (b) Yuan, L.; Lin, W.; Feng, Y., A rational approach to tuning the pKa values of rhodamines for living cell fluorescence imaging. *Organic & Biomolecular Chemistry* **2011**, *9* (6), 1723-1726; (c) Li, Z.; Wu, S.; Han, J.; Han, S., Imaging of intracellular acidic compartments with a sensitive rhodamine based fluorogenic pH sensor. *Analyst* **2011**, *136* (18), 3698-3706; (d) Wu, S.; Li, Z.; Han, J.; Han, S., Dual colored mesoporous silica nanoparticles with pH activable rhodamine-lactam for ratiometric sensing of lysosomal acidity. *Chemical Communications* **2011**, *47* (40), 11276-11278; (e) Best, Q. A.; Xu, R.; McCarroll, M. E.; Wang, L.; Dyer, D. J., Design and Investigation of a Series of Rhodamine-Based Fluorescent Probes for Optical Measurements of pH. *Organic Letters* **2010**, *12* (14), 3219-3221; (f) Zhang,

- W.; Tang, B.; Liu, X.; Liu, Y.; Xu, K.; Ma, J.; Tong, L.; Yang, G., A highly sensitive acidic pH fluorescent probe and its application to HepG2 cells. *Analyst* **2009**, *134* (2), 367-371; (g) Misra, V.; Mishra, H.; Joshi, H. C.; Pant, T. C., Excitation energy transfer between acriflavine and rhodamine 6G as a pH sensor. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2000**, *63* (1-2), 18-23; (h) Misra, V.; Mishra, H.; Joshi, H. C.; Pant, T. C., An optical pH sensor based on excitation energy transfer in Nafion® film. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2002**, *82* (2-3), 133-141.
19. (a) Daffy, L. M.; de Silva, A. P.; Gunaratne, H. Q. N.; Huber, C.; Lynch, P. L. M.; Werner, T.; Wolfbeis, O. S., Arenedicarboximide Building Blocks for Fluorescent Photoinduced Electron Transfer pH Sensors Applicable with Different Media and Communication Wavelengths. *Chemistry – A European Journal* **1998**, *4* (9), 1810-1815; (b) Bissell, R. A.; de Silva, A. P.; Gunaratne, H. Q. N.; Lynch, P. L. M.; Maguire, G. E. M.; Sandanayake, K. R. A. S., Molecular fluorescent signalling with 'fluor-spacer-receptor' systems: approaches to sensing and switching devices via supramolecular photophysics. *Chemical Society Reviews* **1992**, *21* (3), 187-195; (c) de Silva, A. P.; Gunaratne, H. Q. N.; Habib-Jiwan, J.-L.; McCoy, C. P.; Rice, T. E.; Soumillon, J.-P., New Fluorescent Model Compounds for the Study of Photoinduced Electron Transfer: The Influence of a Molecular Electric Field in the Excited State. *Angewandte Chemie International Edition in English* **1995**, *34* (16), 1728-1731; (d) Werner, T.; Huber, C.; Heintz, S.; Kollmannsberger, M.; Daub, J.; Wolfbeis, O. S., Novel optical pH-sensor based on a boradiazindacene derivative. *Fresenius J Anal Chem* **1997**, *359* (2), 150-154; (e) Kubo, K.; Mori, A., PET fluoroionophores for Zn²⁺ and Cu²⁺: complexation and fluorescence behavior of anthracene derivatives having diethylamine, N-methylpiperazine and N,N-bis(2-picolyl)amine units. *Journal of Materials Chemistry* **2005**, *15* (27-28), 2902-2907; (f) de Silva, A. P.; Vance, T. P.; West, M. E. S.; Wright, G. D., Bright molecules with sense, logic, numeracy and utility. *Organic & Biomolecular Chemistry* **2008**, *6* (14), 2468-2480.
20. (a) Koide, Y.; Urano, Y.; Hanaoka, K.; Terai, T.; Nagano, T., Evolution of Group 14 Rhodamines as Platforms for Near-Infrared Fluorescence Probes Utilizing Photoinduced Electron Transfer. *ACS Chemical Biology* **2011**, *6* (6), 600-608; (b) Zhou, K.; Wang, Y.; Huang, X.; Luby-Phelps, K.; Sumer, B. D.; Gao, J., Tunable, Ultrasensitive pH-Responsive Nanoparticles Targeting Specific Endocytic Organelles in Living Cells. *Angewandte Chemie International Edition* **2011**, *50* (27), 6109-6114.
21. (a) Becer, C. R.; Babiuch, K.; Pilz, D.; Hornig, S.; Heinze, T.; Gottschaldt, M.; Schubert, U. S., Clicking Pentafluorostyrene Copolymers: Synthesis, Nanoprecipitation, and Glycosylation. *Macromolecules* **2009**, *42* (7), 2387-2394; (b) Becer, C. R.; Hoogenboom, R.; Schubert, U. S., Click Chemistry beyond Metal-Catalyzed Cycloaddition. *Angewandte Chemie International Edition* **2009**, *48* (27), 4900-4908; (c) Samaroo, D.; Vinodu, M.; Chen, X.; Drain, C. M., meso-Tetra(pentafluorophenyl)porphyrin as an Efficient Platform for Combinatorial Synthesis and the Selection of New Photodynamic Therapeutics using a Cancer Cell Line. *Journal of Combinatorial Chemistry* **2007**, *9* (6), 998-1011; (d) Vives, G.; Giansante, C.; Bofinger, R.; Raffy, G.; Guerso, A. D.; Kauffmann, B.; Batat, P.; Jonusauskas, G.; McClenaghan, N. D., Facile functionalization of a fully fluorescent perfluorophenyl BODIPY: photostable thiol and amine conjugates. *Chemical Communications* **2011**, *47* (37), 10425-10427; (e) Figueira, A. C. B.; de Oliveira, K. T.; Serra, O. A., New porphyrins tailored as biodiesel fluorescent markers. *Dyes and Pigments* **2011**, *91* (3), 383-388.
22. Kubin, R. F.; Fletcher, A. N., Fluorescence quantum yields of some rhodamine dyes. *Journal of Luminescence* **1982**, *27* (4), 455-462.
23. Öztürk, N.; Akgöl, S.; Arsoy, M.; Denizli, A., Reversible adsorption of lipase on novel hydrophobic nanospheres. *Separation and Purification Technology* **2007**, *58* (1), 83-90.
24. Janata, J., Do optical sensors really measure pH? *Analytical Chemistry* **1987**, *59* (9), 1351-1356.
25. Gao, F.; Wang, L.; Tang, L.; Zhu, C., A Novel Nano-Sensor Based on Rhodamine-β-Isothiocyanate – Doped Silica Nanoparticle for pH Measurement. *Microchim Acta* **2005**, *152* (1-2), 131-135.

26. (a) Huber, C.; Klimant, I.; Krause, C.; Wolfbeis, O. S., Dual Lifetime Referencing as Applied to a Chloride Optical Sensor. *Analytical Chemistry* **2001**, 73 (9), 2097-2103; (b) Liebsch, G.; Klimant, I.; Krause, C.; Wolfbeis, O. S., Fluorescent Imaging of pH with Optical Sensors Using Time Domain Dual Lifetime Referencing. *Analytical Chemistry* **2001**, 73 (17), 4354-4363.

Appendix A. Supplementary data

Additional Supporting Information (ASI)

New fluorescent pH sensors based on covalently linkable PET rhodamines

In collaboration with:

Institute of Analytical Chemistry and Food Chemistry, Graz University of Technology, Stremayrgasse 9, A-8010 Graz, Austria.

Department of Analytical Chemistry, University of Granada, Avd. Fuentenueva s/n, E-18071 Granada, Spain.

Institute for Chemistry and Technology of Materials, Graz University of Technology, Stremayrgasse 9, A-8010 Graz, Austria.

Index

List of Figures

Figure ASI 1. Absorption and fluorescence spectra of 1	123
Figure ASI 2. Absorption and fluorescence spectra of 3.	123
Figure ASI 3. Reversibility and repeatability (silica gel beads).....	124
Figure ASI 4. Reversibility and repeatability (poly(HEMA) beads).....	124
Figure ASI 5. ^1H -NMR spectrum of 1	125
Figure ASI 6. ^{19}F -NMR spectrum of 1.	125
Figure ASI 7. ^1H -NMR spectrum of 2.	126
Figure ASI 8. ^{19}F -NMR spectrum of 2.	126
Figure ASI 9. ^1H -NMR spectrum of 3.	127
Figure ASI 10. ^1H -NMR spectrum of the 5'-carboxy regioisomer to 3.	127
Figure ASI 11. Chromatogram of 1 after HPLC purification.....	128
Figure ASI 12. Total ion current chromatogram of 1 after HPLC purification.	128
Figure ASI 13. Chromatogram of crude 1.	129
Figure ASI 14. Total ion current chromatogram of crude 1.....	129
Figure ASI 15. Chromatogram of 2 after HPLC purification.....	130
Figure ASI 16. Chromatogram of 3 after HPLC purification.....	131
Figure ASI 17. Total ion current chromatogram of 3 after HPLC purification	131
Figure ASI 18. Chromatogram of crude 3.	132
Figure ASI 19. Total ion current chromatogram of crude 3.....	133

List of Tables

Table ASI 1. Gradient used for LC-MS characterisation of 1-3.	133
--	-----

Figures

UV/Vis spectra

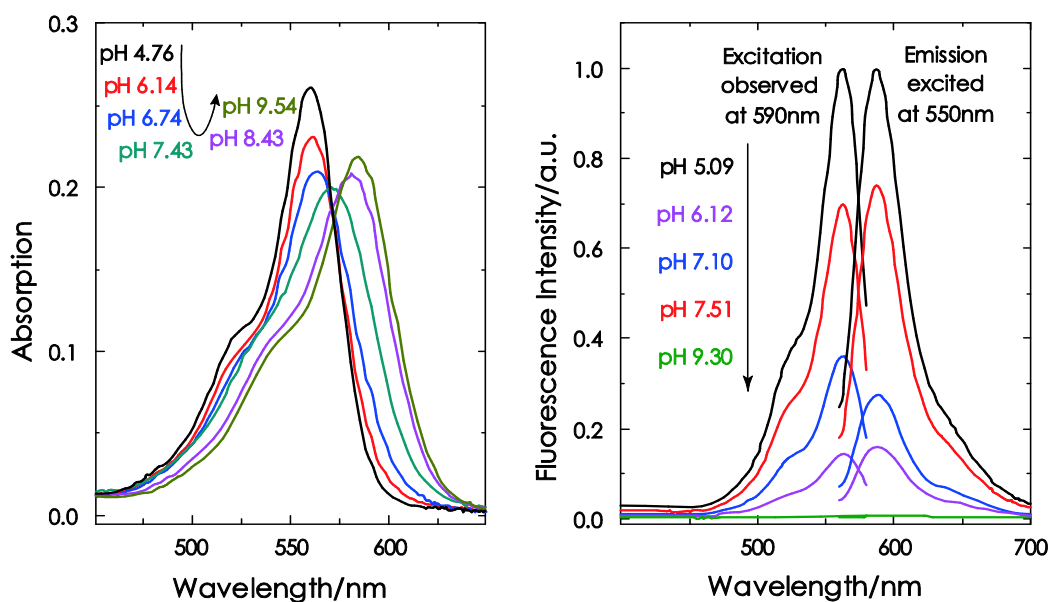


Figure ASI 1. Absorption spectra (left) and fluorescence spectra (right) of **1** in aqueous buffer solution (ionic strength 100mM) at different pH. Dye concentration was 2 μ M when recording absorption and 0.05 μ M when recording fluorescence spectra.

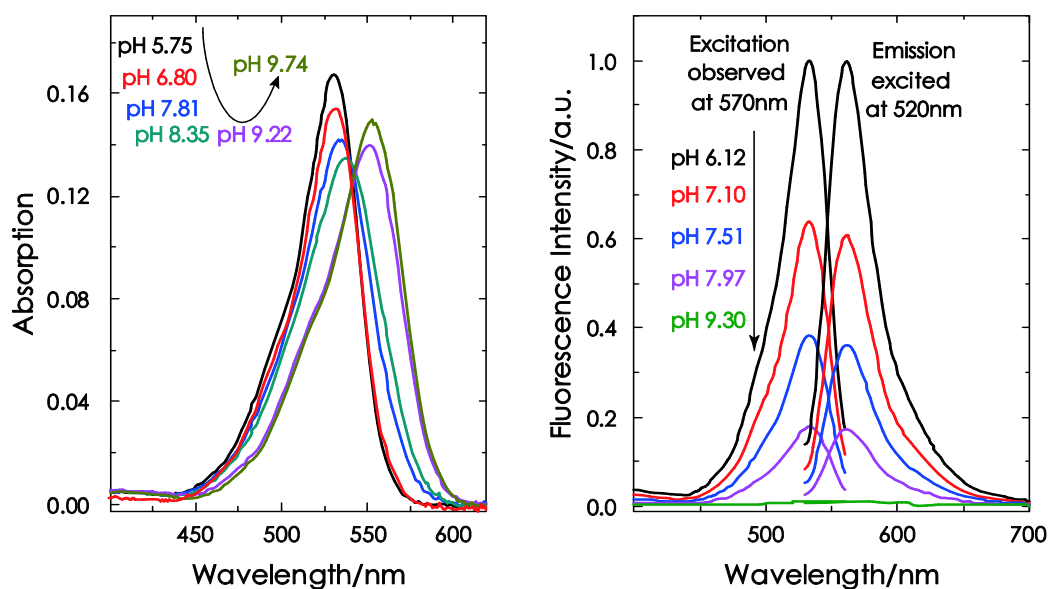


Figure ASI 2. Absorption spectra (left) and fluorescence spectra (right) of **3** in aqueous buffer solution (ionic strength 100mM) at different pH. Dye concentration was 2 μ M when recording absorption and 0.05 μ M when recording fluorescence spectra.

Sensor response curves

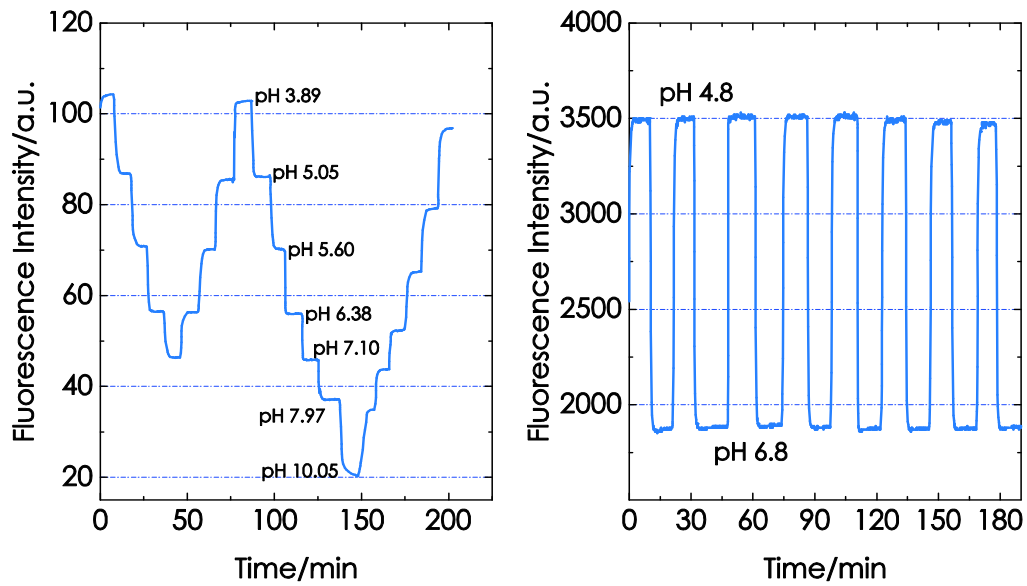


Figure ASI 3. Reversibility and repeatability of the sensor based on silica gel beads in D4® hydrogel. Signal drift and irreversible response are only observed at high pH values (>8) which are essentially outside the sensitive range.

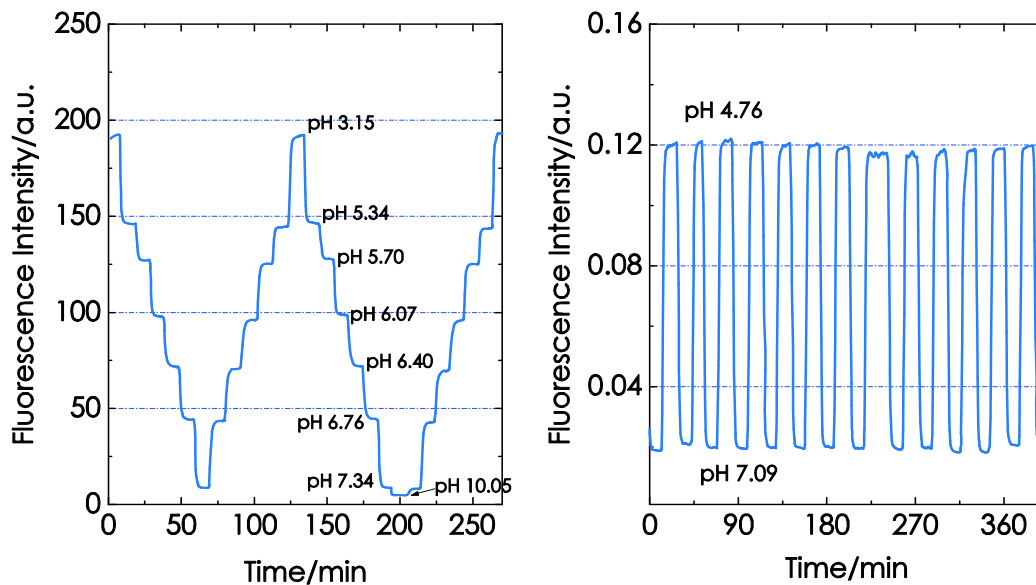


Figure ASI 4. Reversibility and repeatability of the sensor based on cross-linked poly(HEMA) beads linear poly(HEMA). They are good over the whole investigated pH range (pH 3-10).

Calibration

The following sigmoidal function was used for sensor calibration:

$$I = \frac{A_{min} - A_{max}}{1 + e^{(pH - pK_a)/dx}} + A_{max} \quad (\text{Equation 1})$$

Where I - fluorescence intensity, A_{max} , A_{min} , pK_a and dx are numerical coefficients.

NMR spectra

Compound 1

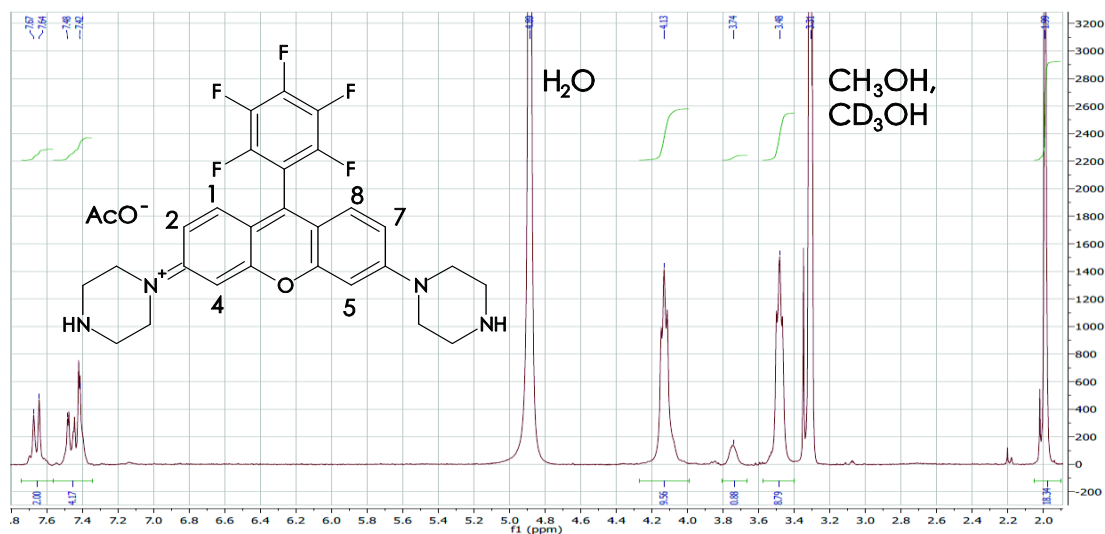


Figure ASI 5. ^1H -NMR spectrum of **1** in CD_3OD containing 0.1% HOAc and 0.1% CF_3COOH . Before addition of HOAc the integral of acetate hydrogen (1.99ppm) was 2.9 (spectrum not shown here). $\delta = 7.65\text{ppm}$ (2H, d, Ar-H(positions 1,8), $J_{\text{ArH}12,78} = 9.6\text{ Hz}$); $\delta = 7.46$ (2H, dd, Ar-H(2,7), $J_{\text{ArH}24,57} = 2.5\text{ Hz}$); $\delta = 7.42$ (2H, d, Ar-H(4,5)); $\delta = 4.13$ (8H, t, ArNCH₂, $J = 5.2\text{ Hz}$); $\delta = 3.48$ (8H, t, HNCH₂); $\delta = 1.99$ (3H, s, H_{acetate}).

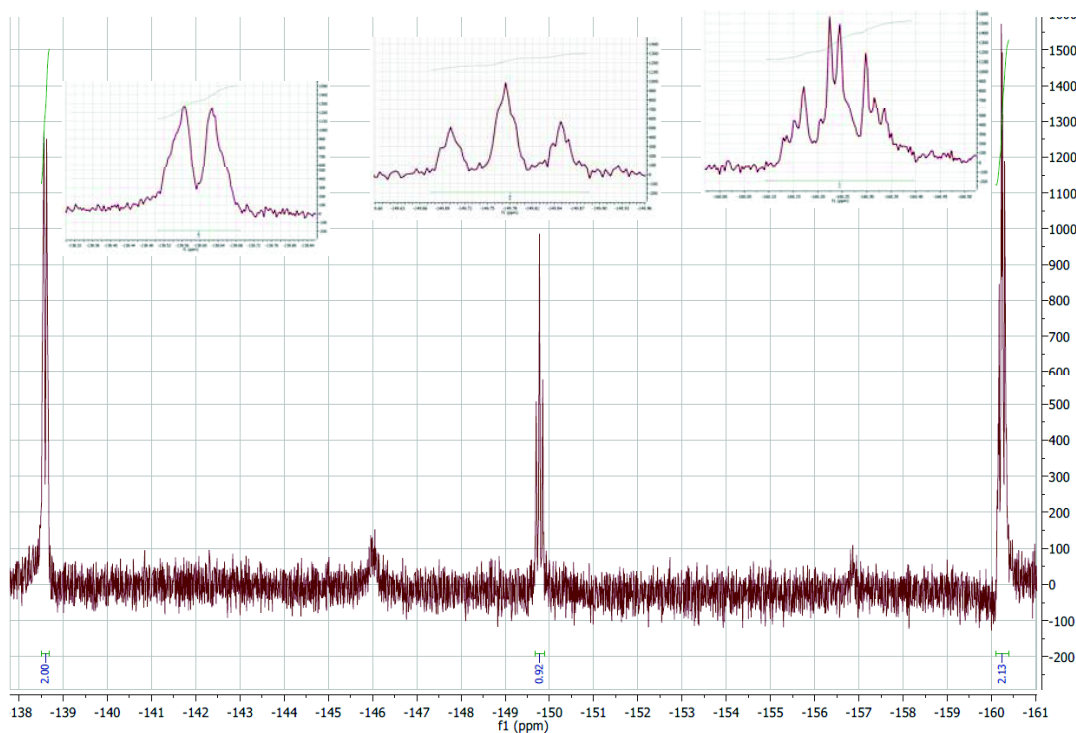


Figure ASI 6. ^{19}F -NMR spectrum of **1**. $\delta = -139\text{ppm}$ (2F, d, $J = 20\text{ Hz}$); $\delta = -150$ (1F, t, $J = 21\text{ Hz}$); $\delta = -160$ (2F, dt, $J_1 = 6\text{ Hz}$, $J_2 = 21\text{ Hz}$).

Compound 2

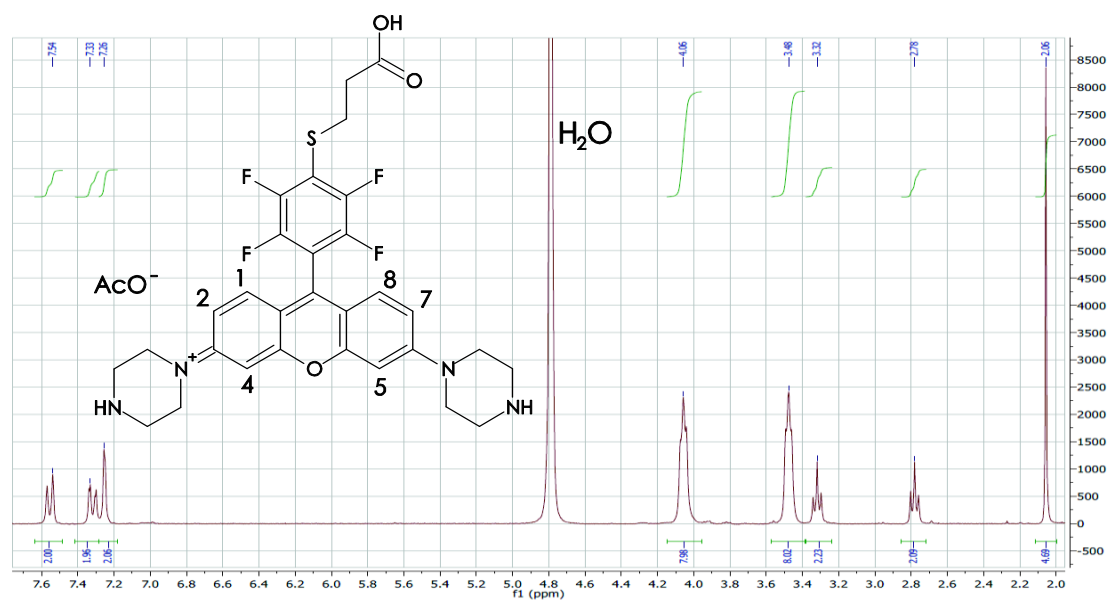


Figure ASI 7. ¹H-NMR spectrum of **2** in D₂O containing 0.1% CF₃COOH. $\delta = 7.55$ ppm (2H, d, Ar-H(positions 1,8), $J_{\text{ArH}12,78} = 9.6$ Hz); $\delta = 7.32$ (2H, dd, Ar-H(2,7), $J_{\text{ArH}24,57} = 2.3$ Hz); $\delta = 7.26$ (2H, d, Ar-H(4,5)); $\delta = 4.06$ (8H, t, ArNCH₂, $J = 4.9$ Hz); $\delta = 3.48$ (8H, t, HNCH₂); $\delta = 3.32$ (2H, t, ArSCH₂, $J = 6.7$ Hz); $\delta = 2.76$ (2H, t, CH₂COOH); $\delta = 2.06$ (4.7H, s, H_{acetate}).

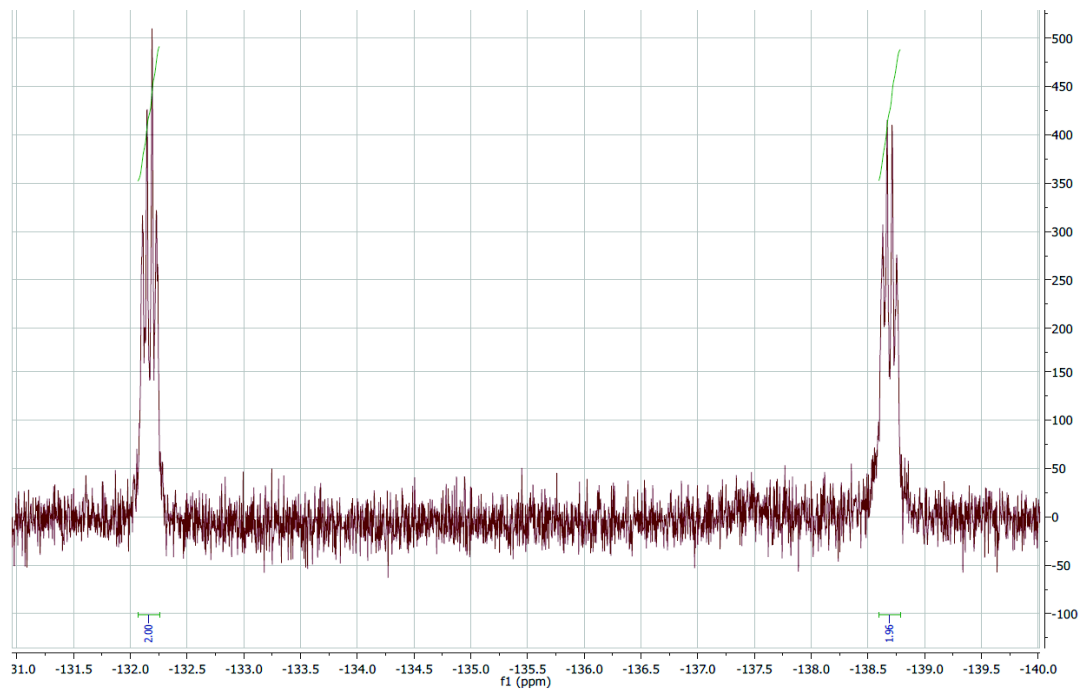


Figure ASI 8. ¹⁹F-NMR spectrum of **2**. $\delta = -132$ ppm (2F, q, $J = 11$ Hz); $\delta = -139$ (2F, q, $J = 11$ Hz).

Compound 3

Compound **3** could be identified as the pure 4'-carboxy regioisomer (Figure ASI 9). For comparison, the spectrum of the 5'-carboxy regioisomer (Figure ASI 10), which was also obtained upon HPLC purification of crude **3**, is shown. Resonance at >7.9ppm is can be attributed to the protons in the dicarboxyphenyl ring which are in ortho-position to a carboxy group. The 4'-isomer contains only two such protons, while three can be found for the 5'- isomer.

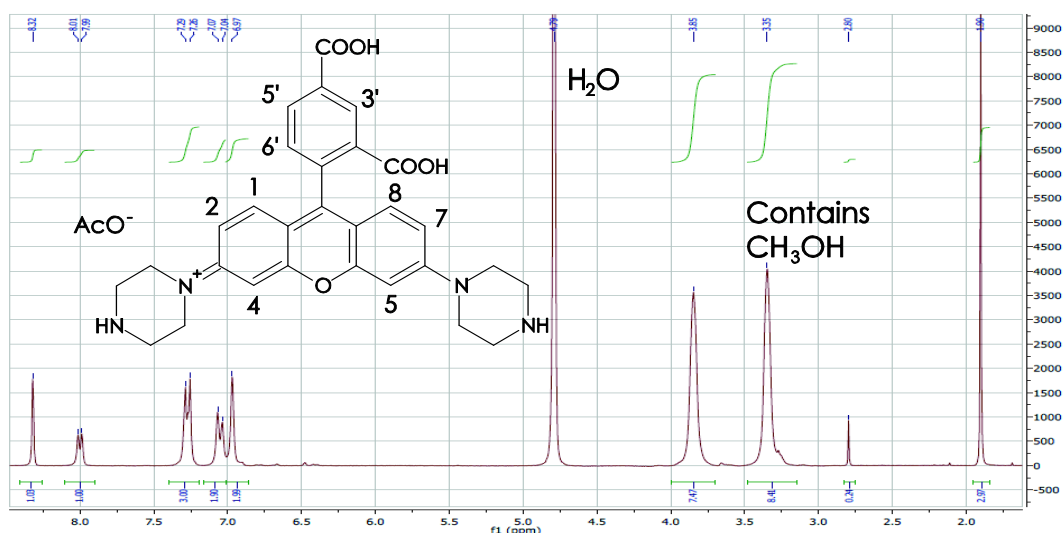


Figure ASI 9. $^1\text{H-NMR}$ spectrum of **3** (4'-carboxy regioisomer) in D_2O . $\delta = 8.32\text{ppm}$ (1H, s, Ar-H(position 3')); $\delta = 8.00$ (1H, d, Ar-H(5'), $J_{\text{ArH}5'6'} = 7.5$ Hz); $\delta = 7.27$ (3H, d, Ar-H(6',1,8), $J_{\text{ArH}12,78} = 9.3$ Hz); $\delta = 7.06$ (2H, d, Ar-H(2,7)); $\delta = 6.97$ (2H, s, Ar-H(4,5)); $\delta = 3.85$ (8H, broad s, ArNCH₂); $\delta = 3.35$ (8H, broad s, HNCH₂); $\delta = 1.90$ (3H, s, H_{Acetate}).

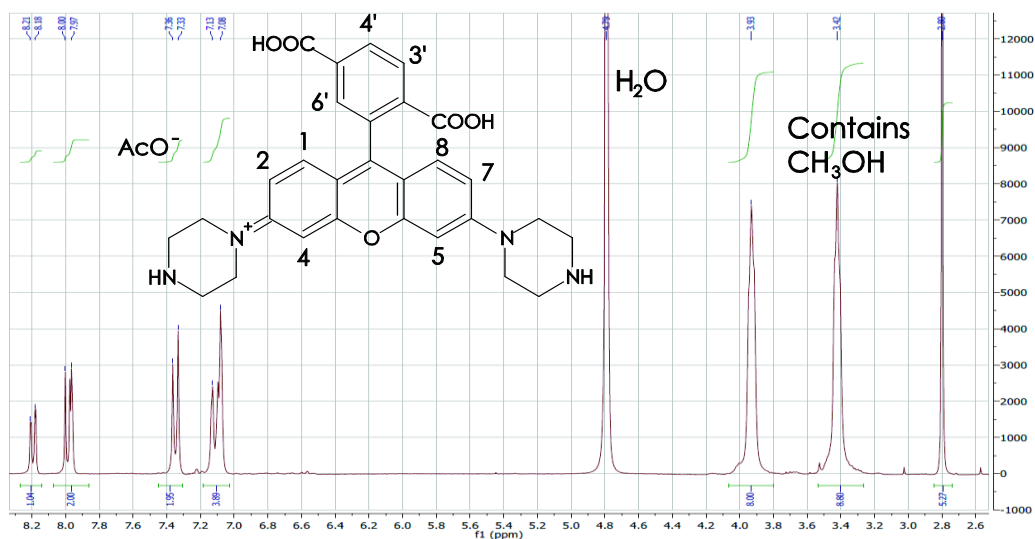


Figure ASI 10. $^1\text{H-NMR}$ spectrum of the 5'-carboxy regioisomer to **3** in D_2O . $\delta = 8.20$ (1H, dd, Ar-H(4'), $J_{\text{ArH}3'4'} = 8.1\text{Hz}$, $J_{\text{ArH}4'6'} = 1.7$ Hz); $\delta = 7.99$ (1H, d, Ar-H(3')); $\delta = 7.97$ (1H, d, Ar-H(6')); $\delta = 7.35$ (2H, dd, Ar-H(1,8), $J_{\text{ArH}12,78} = 9.4$ Hz, $J_{\text{ArH}24,57} = 1.6$ Hz); $\delta = 7.11$ (2H, d, Ar-H(2,7)); $\delta = 7.08$ (2H, d, Ar-H(4,5)); $\delta = 3.93$ (8H, t, ArNCH₂, $J = 4.6$ Hz); $\delta = 3.42$ (8H, t, HNCH₂); $\delta = 2.80$ (5.3H, s, H_{Acetate}).

LC-MS measurements:

Compound 1 after HPLC purification

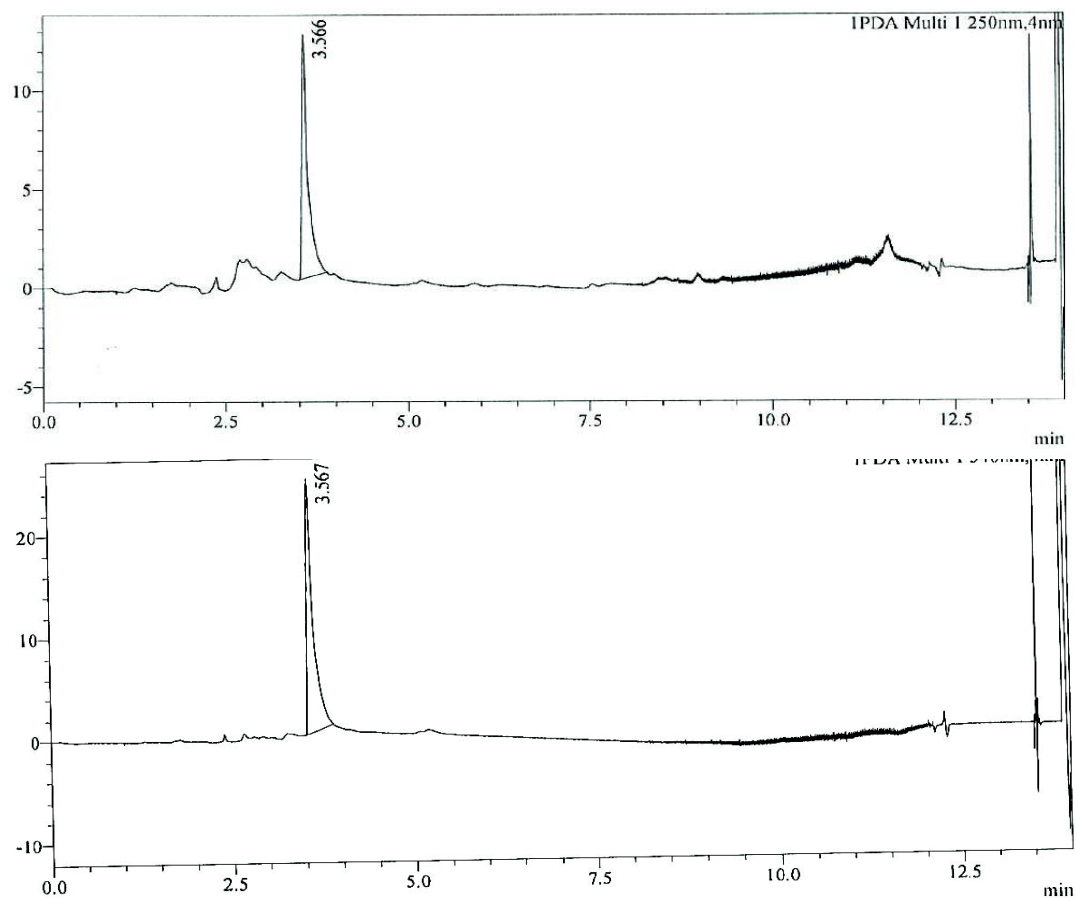


Figure ASI 11. Chromatogram of **1** after HPLC purification, recorded with an UV/VIS detector set to 250nm (top) and 540nm (bottom), bandwidth 4nm each.

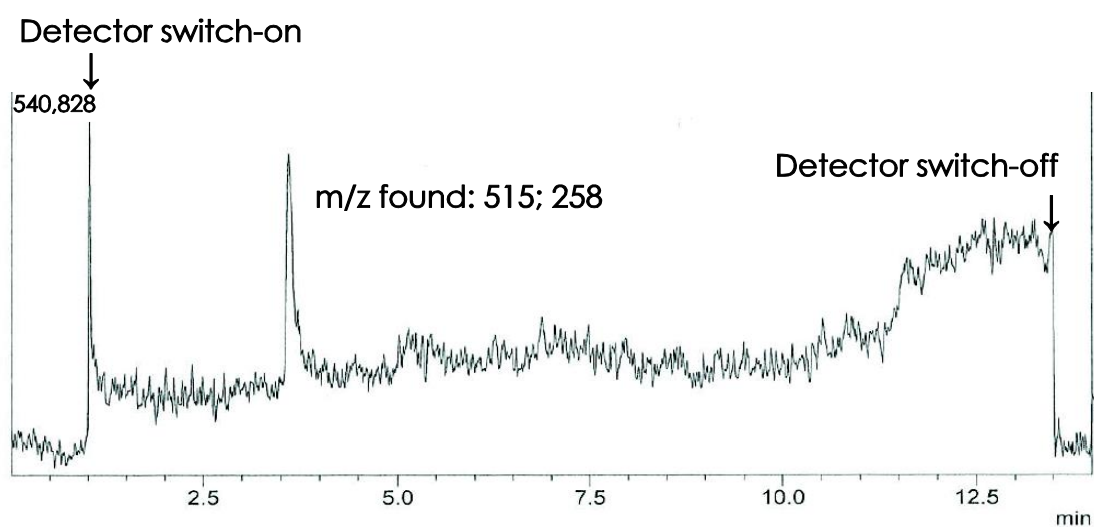


Figure ASI 12. Total ion current chromatogram of **1** after HPLC purification, recorded with an ESI-quadrupole MS detector.

Compound 1 (crude)

LC-MS characterisation of crude 1 reveals an interesting side-product which shows a slightly higher mass than the main product but no absorption typical for rhodamines. This could be the product of a reduction (formal addition of H^- to the chinoid form of the rhodamine) which results in disruption of the xantheno chromophore.

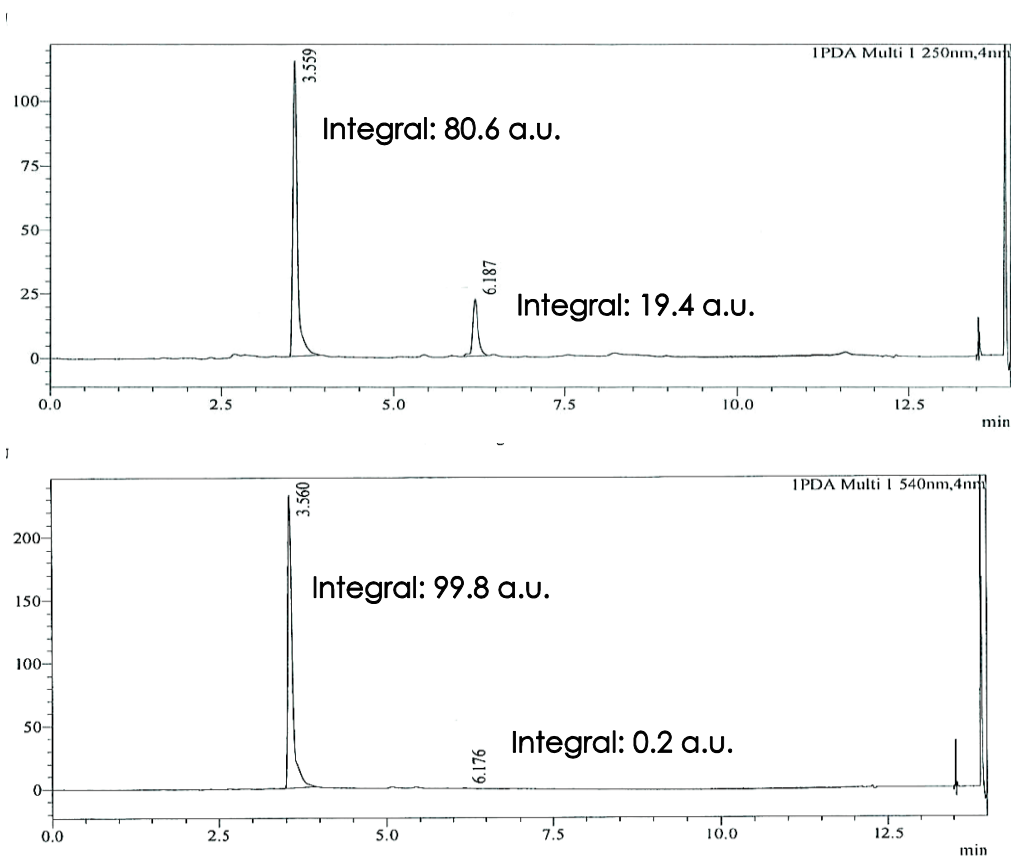


Figure ASI 13. Chromatogram of crude 1, recorded with an UV/VIS detector set to 250nm (top) and 540nm (bottom), bandwidth 4nm each.

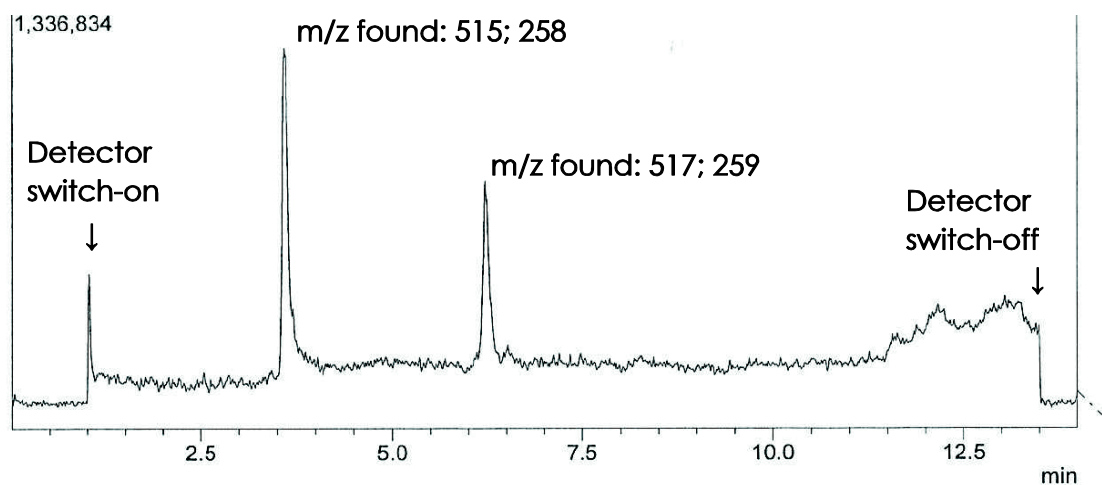


Figure ASI 14. Total ion current chromatogram of crude 1, recorded with an ESI-quadrupole MS detector.

Compound 2 after HPLC purification

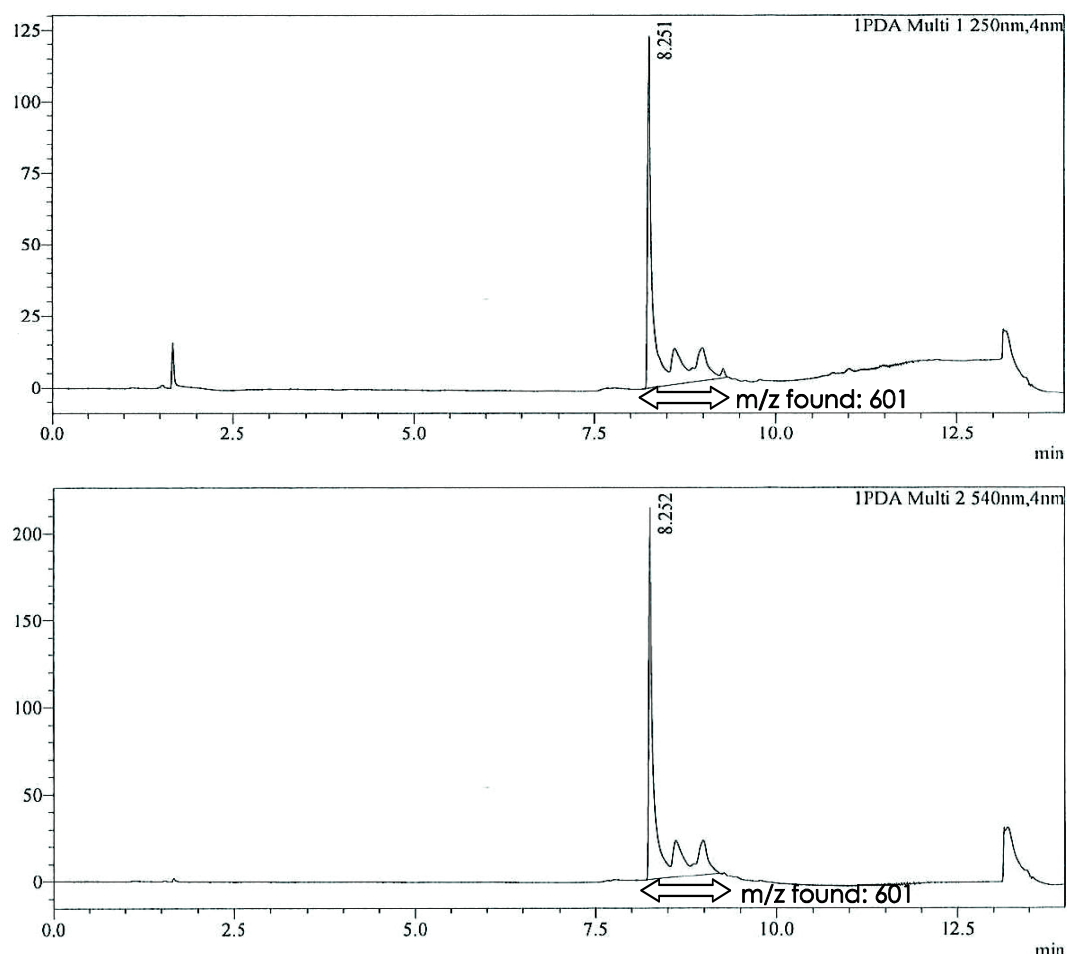


Figure ASI 15. Chromatogram of **2** after HPLC purification, recorded with an UV/VIS detector set to 250nm (top) and 540nm (bottom), bandwidth 4nm each. $m/z=601$ was found over the whole indicated time (ESI-quadruple MS detector).

Compound 3 after HPLC purification

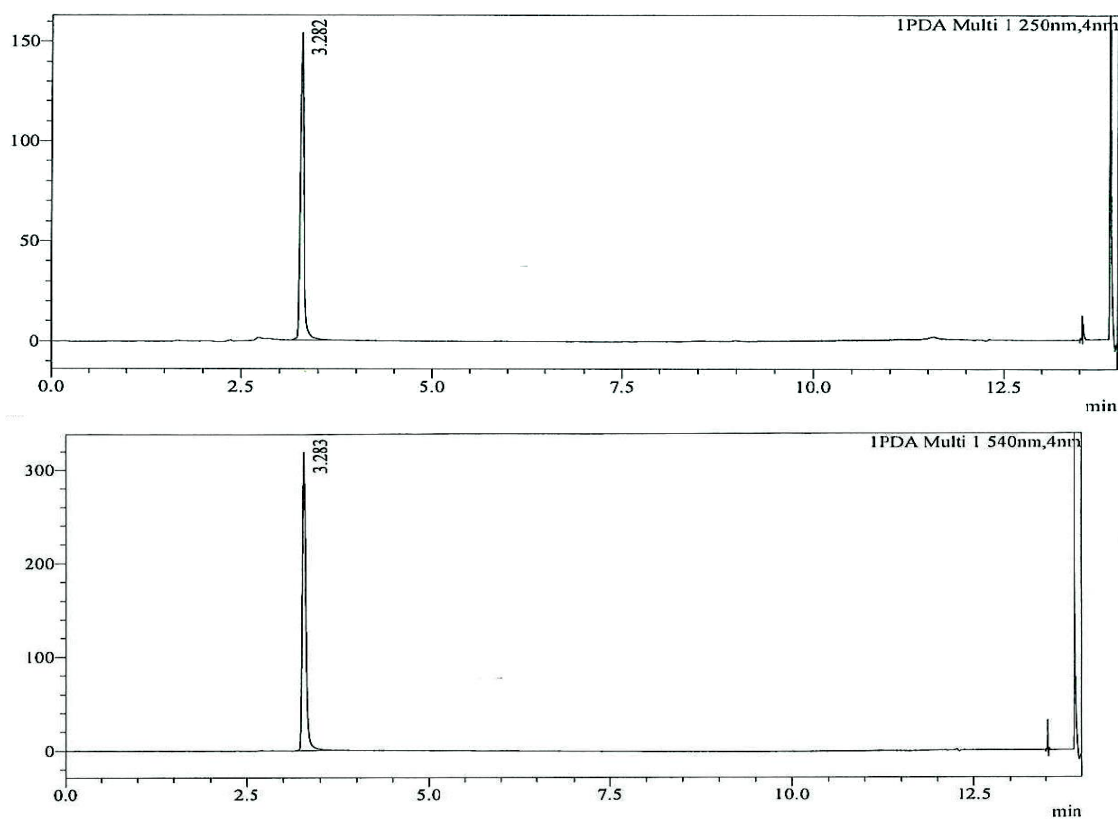


Figure ASI 16. Chromatogram of **3** after HPLC purification, recorded with an UV/VIS detector set to 250nm (top) and 540nm (bottom), bandwidth 4nm each.

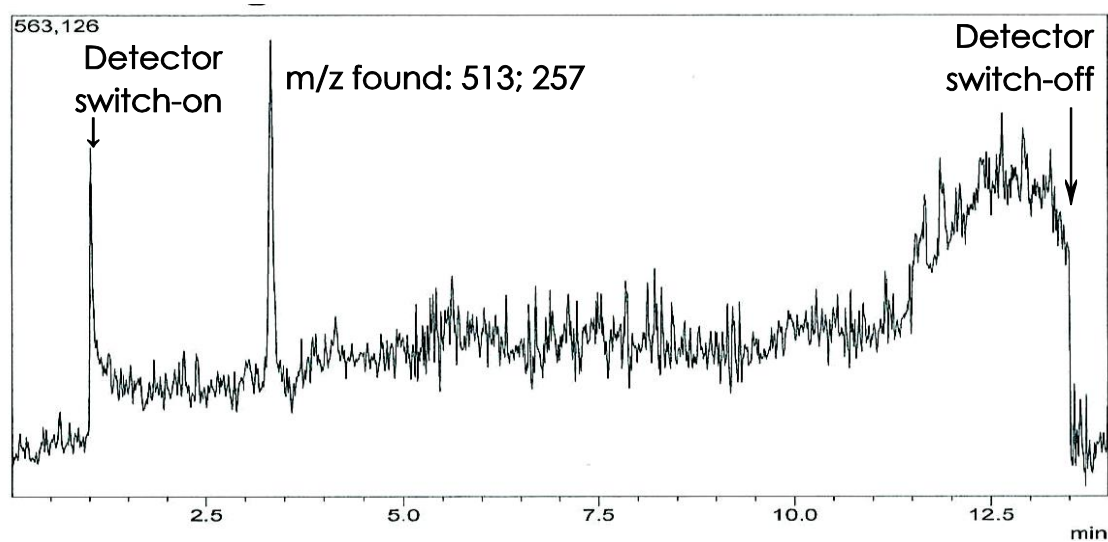


Figure ASI 17. Total ion current chromatogram of **3** after HPLC purification, recorded with an ESI-quadrupole MS detector.

Compound 3 (crude)

LC-MS characterisation shows that crude **3** is composed of four different rhodamines which have been formed in an approximate ratio of 1:1:0.3:0.3. The two main components which are eluted earlier have been isolated and identified by NMR spectroscopy as the 5'-carboxy and the 4'-carboxy regioisomers of the target structure. The 4'-isomer (i.e. compound **3**) was used for characterisation. The two components eluted later have higher molecular masses and could be the result of methylation by methanesulfonic acid upon preparation.

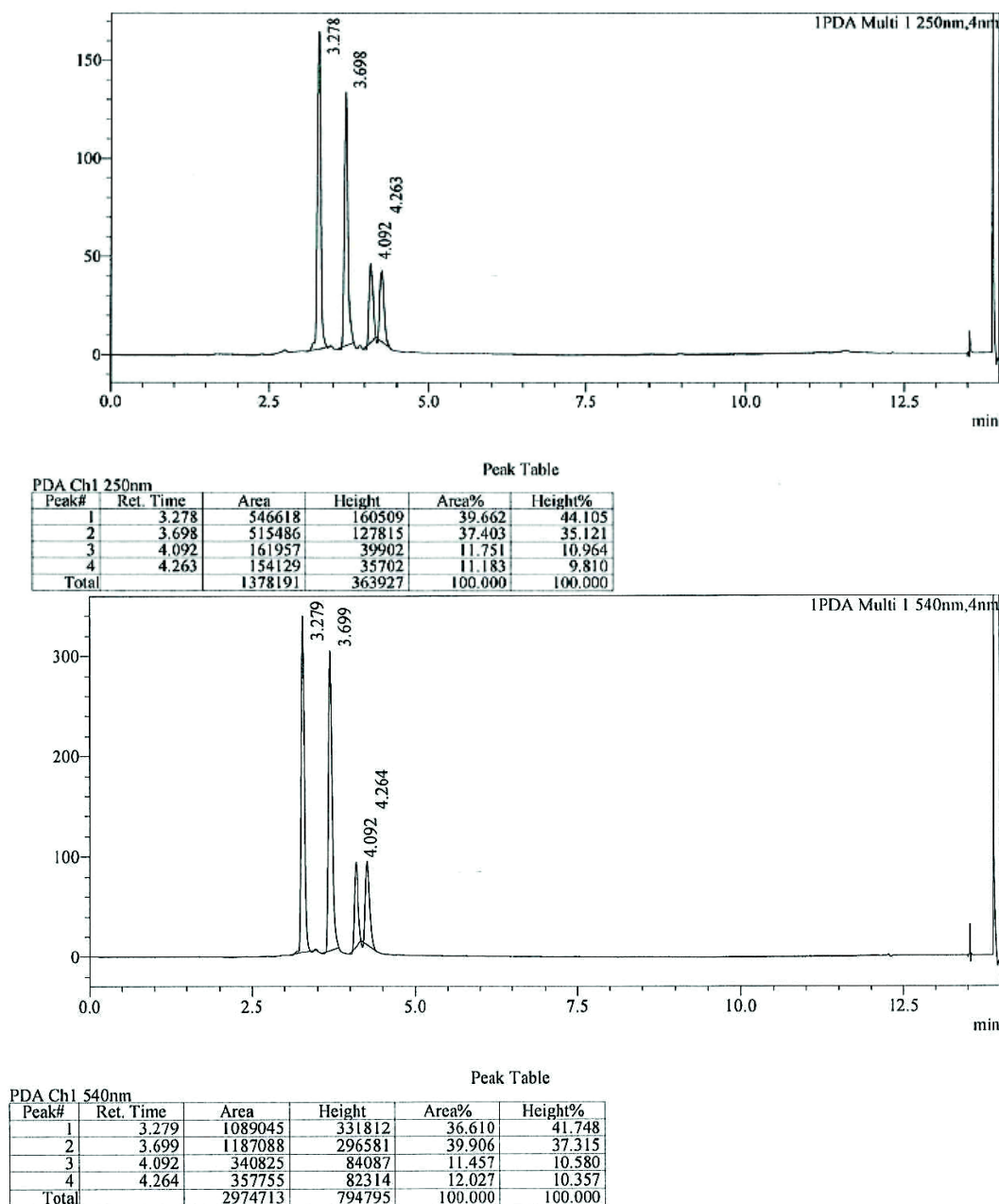


Figure ASI 18. Chromatogram of crude **3**, recorded with an UV/VIS detector set to 250nm (top) and 540nm (bottom), bandwidth 4nm each. The corresponding peak integrals are listed in the peak tables.

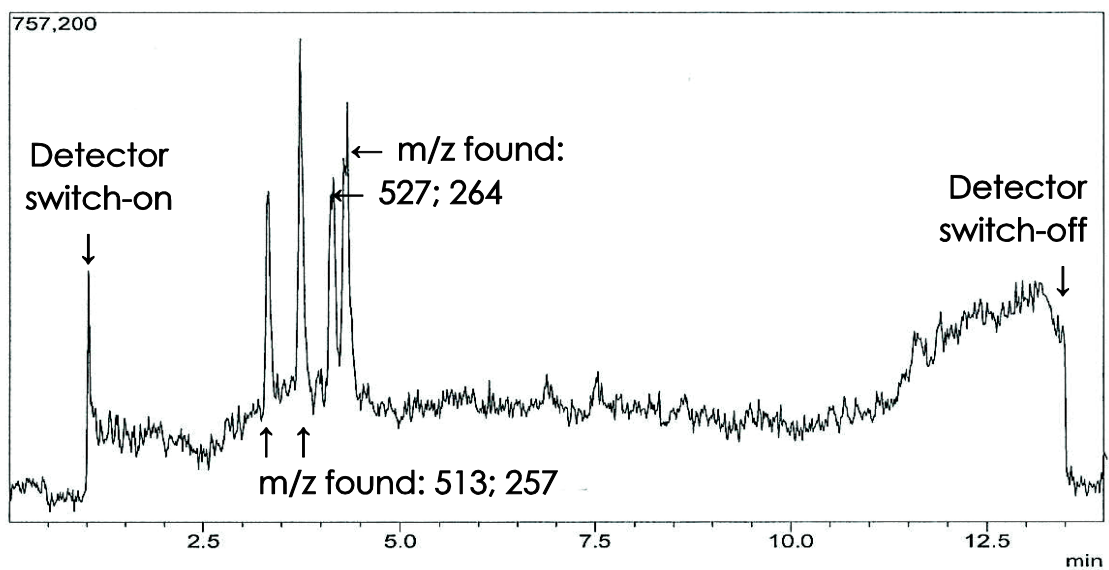


Figure ASI 19. Total ion current chromatogram of crude **3**, recorded with an ESI-quadrupole MS detector.

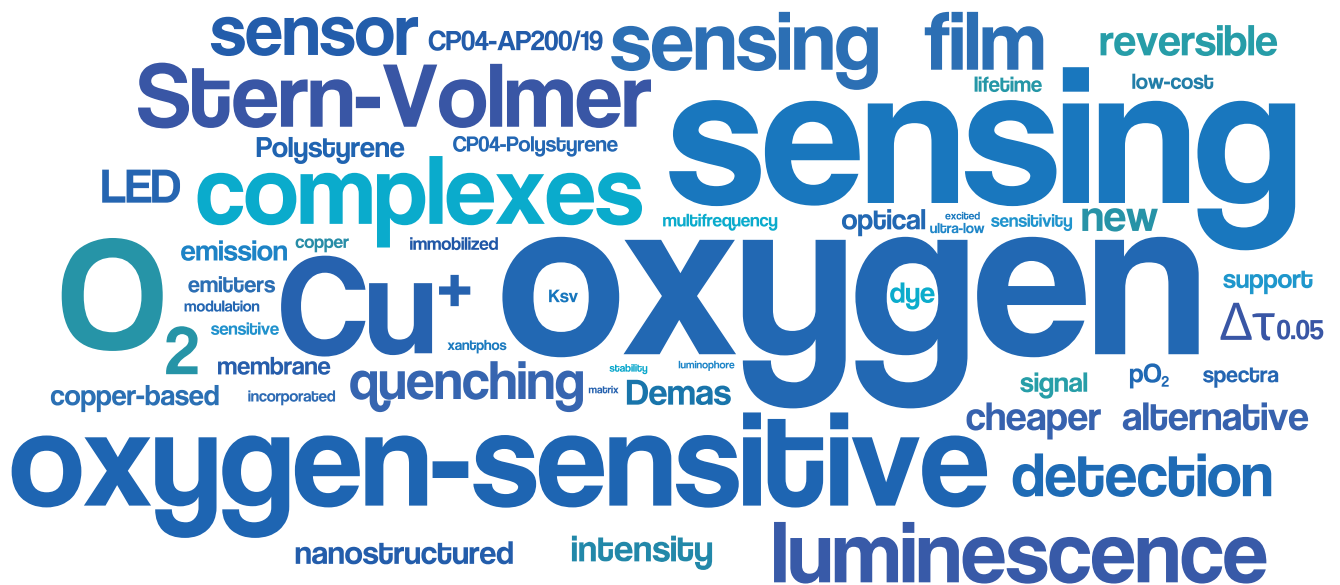
Tables

Gradient used for LC-MS characterization

Table ASI 1. Gradient used for LC-MS characterisation of **1-3**.

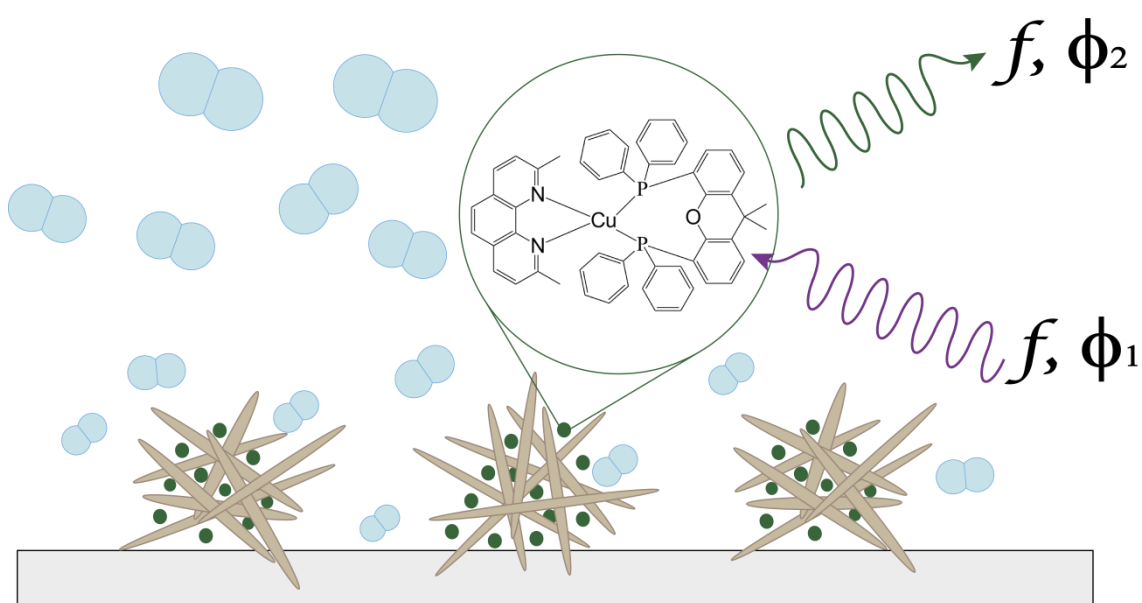
Time/min	Ratio MeOH/%	Ratio 0.1% aqueous HOAc/%	Flow rate/ml · min ⁻¹
0	2	98	0.7
5	2	98	0.7
10	100	0	0.7
12	100	0	0.7
13	2	98	0.7

Capítulo 2



Capítulo 2

Evaluation of novel, high performance optical sensing phases based on copper(I) complexes for oxygen determination using intensity and lifetime measurements



In collaboration with:

Department of Signal Theory, Networking and Communications, CITIC-UGR, University of Granada, C/ Periodista Rafael Gómez 2, E-18071 Granada, Spain.

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

School of Chemistry, University of Birmingham, Edgbaston, B15 2TT, England.

Submitted to Analyst

Evaluation of novel, high performance optical sensing phases based on copper(I) complexes for oxygen determination using intensity and lifetime measurements

Abstract

Optical oxygen sensors are commonly based on the luminescent complexes of noble metals such as Ir(III), Pd(II), Pt(II), Re(I) or Ru(II). These metals are extremely expensive. In contrast copper is earth abundant and its complexes offer a cheaper alternative for oxygen detection. In this report we present new optical sensing layers based on Cu(I) complexes that provide outstanding analytical performance when combined with the determination of luminescence lifetime by the multifrequency phase modulation method. For the first time we have incorporated three Cu(I) complexes ($[\text{Cu}(\text{xantphos})(\text{dmp})](\text{PF}_6)$, $[\text{Cu}(\text{xantphos})(\text{pzpy})](\text{PF}_6)$, and $[\text{Cu}(\text{xantphos})_2](\text{PF}_6)$) into both polystyrene and a nanostructured aluminium oxide-hydroxide solid support. $\text{Cu}(\text{xantphos})(\text{dmp})\text{PF}_6$ incorporated into the aluminium metal oxide nanostructured material shows excellent sensitivity between 0 and 1 kPa $p\text{O}_2$ ($K_{\text{SV}}=974\pm 87 \text{ bar}^{-1}$) and between 0 and 10 kPa $p\text{O}_2$ ($K_{\text{SV}}=559\pm 15 \text{ bar}^{-1}$) as well as $\Delta\tau_{0.05\%}$ (33.55 \pm 0.37%), which makes this copper complex a more sensitive alternative to phosphorescent iridium complexes reported in the literature for ultralow oxygen detection. The films also display full reversibility and long term stability.

1. Introduction

Monitoring oxygen is of great importance in life and environmental sciences and technologies. The detection of oxygen in gas and liquid phases¹ has attracted considerable attention over the past two decades. In particular, optical sensors for determining oxygen concentrations have gained growing interest in recent years². These optical sensors have several advantageous characteristics; they display high sensitivity and accuracy whilst remaining simple to use and giving fast detection. Further advantages are that non-invasive and non-destructive measurements can be achieved with simpler sample preparation and instrumentation than traditional methods^{1g}. In addition, optical sensors can be prepared in several formats (planar, nanoparticles, paints, fibre-optic, etc.) and sizes, and they allow remote monitoring as well as wireless readout^{1g, 3}.

Optical oxygen sensing devices consist of: 1) an oxygen sensitive luminescent dye; 2) a solid support in which the dye can be immobilized; 3) an optical transducer, which correlates optical properties with analytical performances.

Oxygen sensitive luminescent dyes are commonly the complexes of noble metals such as Ir(III), Pt(II), Pd(II), Re(I) or Ru(II)^{1f, g, 2a, 4}. However these complexes are generally very expensive due to the high cost of platinoid metals, which greatly limits the development of low-cost optical oxygen sensors. Luminescent Cu(I) complexes are increasingly considered as alternatives to noble metal complexes, owing to their lower cost, high availability, and environmental friendliness whilst displaying suitable photophysical properties such as highly emissive metal-to-ligand-charge-transfer (MLCT) state, long luminescence lifetimes, and large Stokes shift⁵. However, only a few oxygen sensors based on Cu(I) complexes have been reported to date and all display much lower performance than sensors based on platinoid-group metal complexes⁶. Smith *et al.* used crystals of the Cu(I) complexes [Cu(2,9-diisopropyl-1,10-phenanthroline)₂](tetrakis(bis-3,5-trifluoromethylphenylborate), [Cu(POP)(dmp)](tfpb), [Cu(xantphos)(dmp)](tfpb), [Cu(xantphos)(dipp)](tfpb), and [Cu(xantphos)(dipp)](pftpb), which resulted in very low sensitivity (Stern-Volmer constant K_{sv} of 0.3 bar⁻¹, 3.7 bar⁻¹, 5.8 bar⁻¹, 3.5 bar⁻¹ and 0.2 bar⁻¹, respectively)^{6c}.^{6e}. Wang *et al.* developed an optical sensing layer based on [Cu(POP)phencarz](BF₄)-PS (PS = polystyrene) with a $K_{sv} = 39$ bar⁻¹.^{6d} Wen *et al.* immobilized a similar complex, [Cu(POP)(Phen-Np)](BF₄), in PS and obtained the same sensitivity ($K_{sv}=40$ bar⁻¹)^{6f}. Shi *et al.* used MCM-41, a mesoporous material, as solid support for [Cu(POP)(PTZ)](BF₄) and achieved the best copper complex-based oxygen sensing film reported so far in the literature with sensitivity to oxygen $K_{sv}=50$ bar⁻¹.^{6b}

Herein we investigate three Cu(I) complexes, [Cu(xantphos)(dmp)](PF₆) (CP04), [Cu(xantphos)(pzpy)](PF₆) (CP05), and [Cu(xantphos)₂](PF₆) (CP06) to develop oxygen-sensitive sensing films with ten times better sensitivity than previously reported copper-based systems. Importantly, we also demonstrate for the first time that these emitters based on earth abundant metals can compete with expensive alternatives such as iridium complexes.

The solid matrix immobilizing the dye influences the sensing performance of the films because of its permeability to oxygen and its impact on dye aggregation^{1g, 4g}. An ideal solid support for high performance must have a high permeability to oxygen and prevent aggregation in order to isolate the dye. In addition, it should prevent photodegradation^{4c} and leaching of the immobilized dyes^{1d}. In this work, we have selected the commonly used polystyrene (PS) and a nanostructured inorganic (aluminium oxide-hydroxide; AlOOH) solid support because of its excellent properties for the aforementioned requirements^{4b, 4d, 4g, 7}.

The choice of sensing method also has an impact on the performance of the sensing films. We have chosen frequency-domain lifetime measurements⁸ as the optical transducer because these methods are simpler^{8a, 8g} and cheaper^{8e, f, 9} to operate than time-resolved methods.

Combining (1) the attractive photophysical properties of Cu(I) complexes (high emissive metal-to-ligand-charge-transfer (MLCT) state, long luminescence lifetimes, large Stokes shift, and low cost and low toxicity), (2) the properties provided by a polystyrene or nanostructured solid support provides (high sensitivity to oxygen and low response time), and (3) the phase-shift measurement method (high sensitivity and stability), we have developed one of the best, and potentially least expensive candidates for ultra-low oxygen-sensitive films. These films show good luminescence signal intensity, excellent sensitivity, complete reversibility and exceptional stability.

2. Experimental

2.1. Materials

Copper(I) complexes $[\text{Cu}(\text{xantphos})(\text{dmp})]\text{PF}_6$, named CP04; $[\text{Cu}(\text{xantphos})(\text{pzpy})]\text{PF}_6$, named CP05 and $[\text{Cu}(\text{xantphos})_2]\text{PF}_6$, named CP06 (where xantphos = 4,5-Bis(diphenylphosphino)-9,9-dimethylxanthene, dmp = 2,9-dimethyl-1,10-phenanthroline and pzpy = 2-(1H-pyrazol-1-yl)pyridine) were obtained following methods described in the literature^{6e,6g}. The chemical structure of the Cu(I) complexes used in this work are shown in Figure 1 and the chemical structure of the Pt(II), Ir(III), Ru(II) complexes used for comparison of sensing performance are shown in Figure 2.

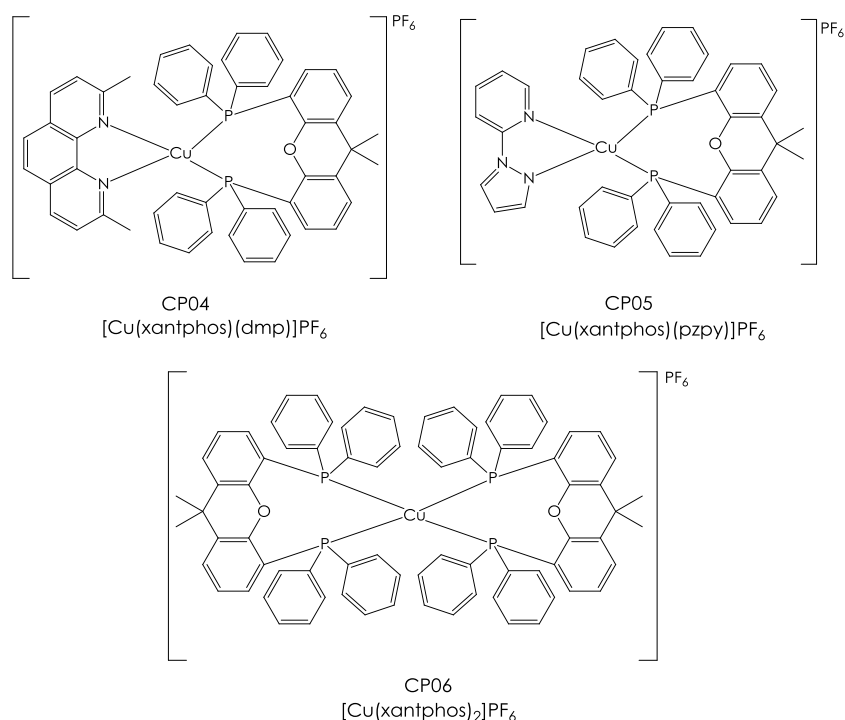


Figure 1. Chemical structure of the Cu(I) complexes used in this work.

Polystyrene (PS) was obtained from Scientific Polymers, and AP200/19 metal oxide support was prepared by Ilford Imaging Switzerland following the procedure previously published^{4b, 4d, 7b}.

Chloroform was obtained from Fluka, which was used as an organic solvent due to its good properties to dissolve the dyes. Nitrogen and oxygen (all of 99.999% purity) were obtained from Air Liquide.

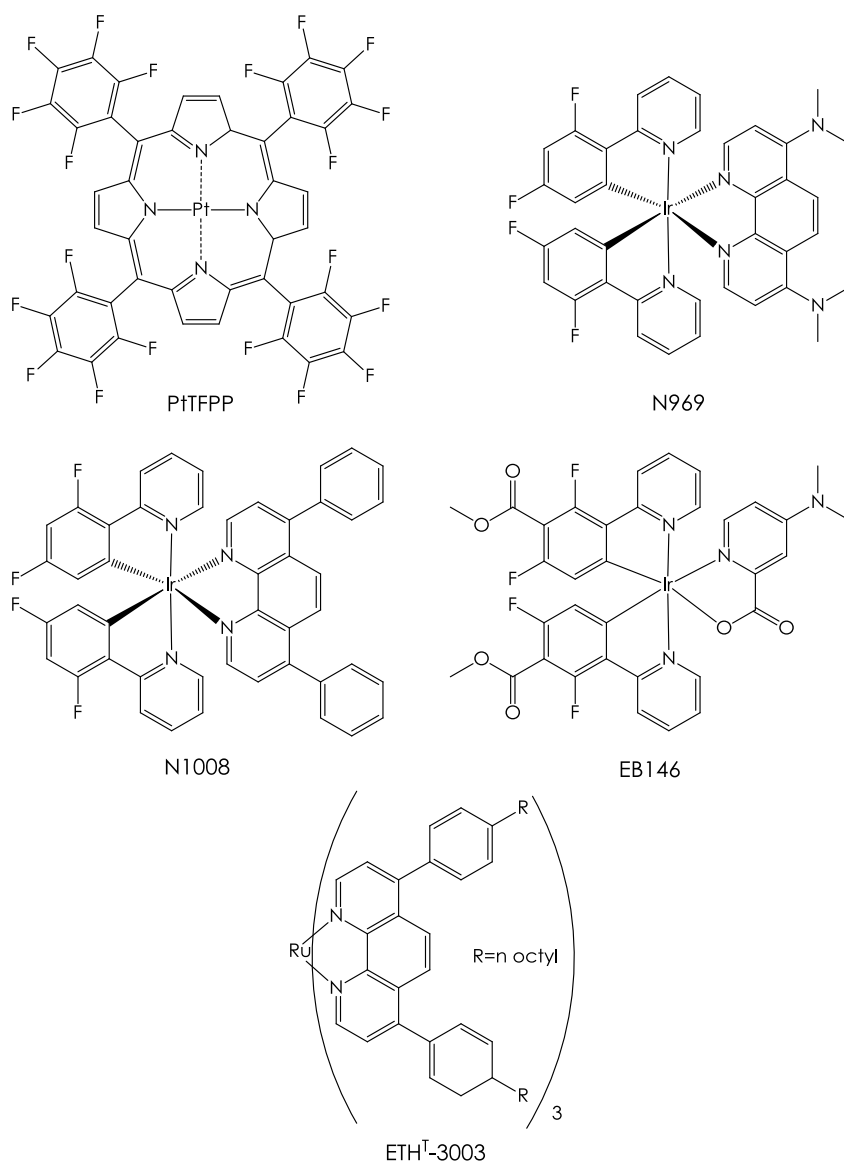


Figure 2. Chemical structure of the Pt(II), Ru(II), and Ir(III) complexes commented in this work.

2.2. Preparation of the oxygen-sensing films

The cocktails were prepared by dissolving CP04, CP05 or CP06 into 2 mL of chloroform (dye concentration of 1.5 mg mL^{-1}). In the case of polystyrene films, 200 mg of the polymer (PS) were added to each cocktail. The cocktails were shaken on an IKA-Vibramax-VXR (IKA-Labortechnik, Staufen, Germany) until the dye was completely dissolved. The oxygen-sensitive membranes were obtained using a Laurell spin-coater (WS-400B-6NPP/LITE, Laurell Technologies). For the AP200/19 membranes, 100 μL of the cocktail were injected onto the rotating metal oxide support fixed onto a spinning device at 300 rpm. For the PS membranes, 300 μL of the cocktail

were injected onto the rotating glass support fixed onto a spinning device at 700 rpm. All membranes obtained were translucent, allowing some visible light to pass through them. Three replicas were prepared for each membrane to evaluate the error. All the experimental results were expressed as the average of 3 replicas \pm error ($s \cdot t/\sqrt{n}$), where s is the standard deviation, t is the Student's t , and n is the number of replicas.

2.3. Instruments and methods

The control of oxygen was carried out with a gas-station developed at our laboratories based on two mass flow controllers (MFC) of Type EL-FLOW[®] model F-201CV Bronkhorst High-Tech. Copper and stainless steel tubing was used to connect the MFCs with the self-built flow-through cell as previously reported^{4c}. This gas station was controlled by a LabView 8.2 program connected to a Flow Bus interface (Bronkhorst) that completely controls the Bronkhorst mass-flow controllers via RS-232.

Excitation and emission spectra as well as intensity measurements were acquired on a Varian Cary-Eclipse luminescence spectrometer (Varian Inc.-Agilent Technologies). Lifetime measurements were carried out with the multifrequency measurement system developed by our research group^{8e, 8i}. It uses an ultraviolet LED as light source (Ocean Optics, LED-375, λ_{\max} = 375 nm, angle of illumination 15°, LED diameter 5 mm, luminous power 25 μ W) filtered through an optical band-pass filter (Thorlabs GmbH, MF390-18, λ_{central} = 390 nm). This LED is modulated by a rectangular-wave signal with 10% duty cycle at appropriate modulation frequency. The excitation signal is numerically generated with a computer and is provided by the analog output channel on an AD/DA board (NI PCIe-6363/ BNC-2120, National Instruments, USA) at a sampling rate of 500 kS/s. This excitation signal is applied to the LED driving circuit in order to modulate the current in the LED. The voltage in a resistor in series with the LED is used as reference excitation signal. The emission signal is transduced with a photomultiplier tube (PMT) with a bandwidth dc-1 MHz (H10723-20, Hamamatsu Photonics, Japan) equipped with an appropriate optical band-pass filter, and the PMT output is amplified and filtered with appropriate analog electronics. Both the excitation signal (the reference) and the emission signal from the sensing film are simultaneously digitized via a digital oscilloscope WaveRunner 604Zi (LeCroy, USA) at 500 kS/s using signals of 1 s in duration (i.e., a 500 kS data buffer). The bandwidth of the electronic devices and the sampling rates are large enough for the frequency of the harmonics involved in these experiments and they are also appropriate for the typical lifetimes of the used complexes (that is, for lifetimes in the range of tens of microseconds).

All measurements were performed at room temperature (21 °C). The temperature was continuously monitored using a commercial temperature sensor (MicroLite, Fourtec-Fourier Technologies).

2.4. Characterization of oxygen sensing films

The luminescence quantum yield, Φ , was determined following the procedure previously described in the literature for similar sensing films^{4b} using Ir(2-(2,4-difluorophenyl)pyridine)₂(4,7-diphenyl-1,10-phenanthroline)](PF₆)^{4d}, named N1008, as reference substance ($\lambda_{exc/em}$ = 400/538 nm, $\Phi=0.92 \pm 0.05$)^{4d}.

A standard protocol was used for characterizing the membranes⁸ⁱ. To obtain the Stern-Volmer Plot (SVP), the oxygen partial pressures were calculated from the measured oxygen/nitrogen flows, assuming a constant environmental pressure of 1 bar. Intensity and lifetime measurements were made at 14 different oxygen partial pressures between 0 and 1 bar.

Luminescence quenching methods are based on the decrease in luminescence intensity or lifetime in the presence of the quencher (oxygen), and they are described by the Stern-Volmer equation³.

For complex scenarios the luminophores may exhibit characteristic quenching constants that are associated with distinct luminophore sites and/or microdomains⁸ⁱ. When two microdomains are expected, the experimental data can be fitted using a two-site model proposed by Demas and co-workers, and called the Demas model¹⁰. The Stern-Volmer constants are calculated with the next expression:

$$\frac{I_0}{I} = \frac{\tau_0}{\tau} = \left[\frac{x_1}{1 + K_{SV,1} \cdot pO_2} + \frac{x_2}{1 + K_{SV,2} \cdot pO_2} \right]^{-1}$$

where I is the luminescence intensity, τ is the luminescence lifetime, the subindex 0 represents unquenched conditions, and x_i denotes the fractional contribution of the total luminescence emission from the luminophore located at site type i , which exhibits a discrete Stern-Volmer quenching constant given by $K_{SV,i}$.

The apparent luminescence lifetimes were determined by phase-resolved luminescence³ using a multifrequency phase-modulation method that uses rectangular-wave signals with a short duty cycle to modulate the excitation light source⁸ⁱ. Luminescence from a monoexponential luminophore using an excitation modulated at a frequency (f) presents a luminescence phase-shift $\phi(f)$ described by:

$$\phi(f) = -\arctan(2\pi f \tau_\phi)$$

From this equation, the phase-shift based apparent lifetime can be estimated at frequency f as:

$$\tau_\phi(f) = \tan(-\phi(f)) / 2\pi f$$

In this work, the use of short duty-cycle rectangular signals for excitation provides several harmonics with enough amplitude for allowing the simultaneous measurement of phase shift and modulation factor at several frequencies. For multifrequency analysis of the luminescent response, we propose an analog-to-digital conversion and subsequent processing of the recorded digital signal, which can easily be implemented via software in a conventional computer or a microcontroller[®].

3. Results and discussion

3.1. Spectroscopic characterization of the sensing films

Six different oxygen-sensing films based on the immobilization of three Cu(I) oxygen-sensitive complexes (CP04, CP05 and CP06) into both an inorganic nanostructured matrix (AP200/19) and into polystyrene were evaluated.

The luminescent properties of these sensing films are summarized in Table 1 and the excitation and emission spectra of CP04 in the absence and in the presence of oxygen (100 kPa pN₂ and 100 kPa pO₂, respectively) are shown in Figure 3; additional spectra of CP05 and CP06 are shown in Figure 4 and Figure 5, respectively. When exposed to oxygen, the luminescence of the sensing films is completely quenched but in the case of CP06 into AP200/19, in which case the intensity decreased by half (see Figure 5b). This is attributed to its more hydrophobic nature compared to other dyes, resulting in significant aggregation in the highly polar AP200/19. The aggregates would prevent the oxygen diffusion and therefore limit the quenching of the luminescence. CP04 can be excited with a standard 375 nm LED. CP05 and CP06 require shorter excitation wavelengths incompatible with our set-up. For this reason, only CP04 has been evaluated using phase shift measurements.

Table 1. Luminescent properties of the complexes; Φ is the luminescence quantum yield and τ_0 is the luminescent lifetime in absence of oxygen.

Sensing film		λ_{exc} (nm)	λ_{em} (nm)	Φ	τ_0 (μ s)
CP04	PS	375	500	0.290	26.0
	AP200/19	376	518	0.293	22.5
CP05	PS	288	500	0.221	—
	AP200/19	338	500	0.113	—
CP06	PS	296	496	—	—
	AP200/19	308	550	—	—

When measurable with our experimental set-up, the luminescence quantum yields (Φ) and lifetime of excited state (τ_0) of the sensing films are reported in Table 1. The luminescence quantum yield of CP06 into both PS and AP200/19 could not be determined due to its low absorbance, which is masked by the absorbance of the solid support. Compared to classical organometallic compounds used in the development of oxygen-sensitive films, the quantum yields are quite low and future efforts should aim at increasing the luminescent quantum yield and brightness of Cu(I) oxygen-sensitive dyes.

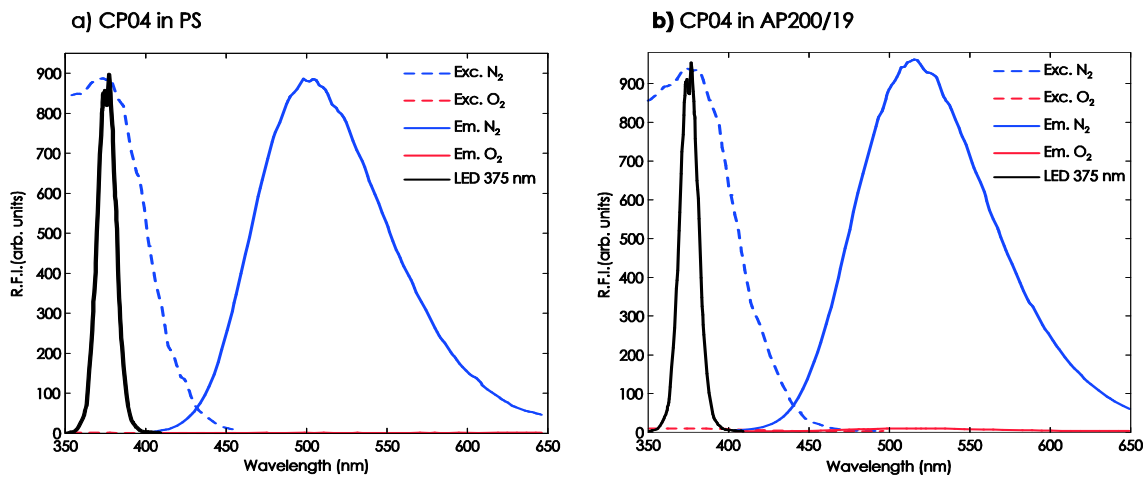


Figure 3. Excitation (---) and emission (—) spectra of CP04 a) in PS and b) in AP200/19 in the absence (blue) and presence (red) of oxygen (see Table 1 for the luminescent conditions). The black line is the emission spectrum of the LED ($\lambda_{\text{peak}} = 375$ nm) used to excite the sensing film in the lifetime measurements.

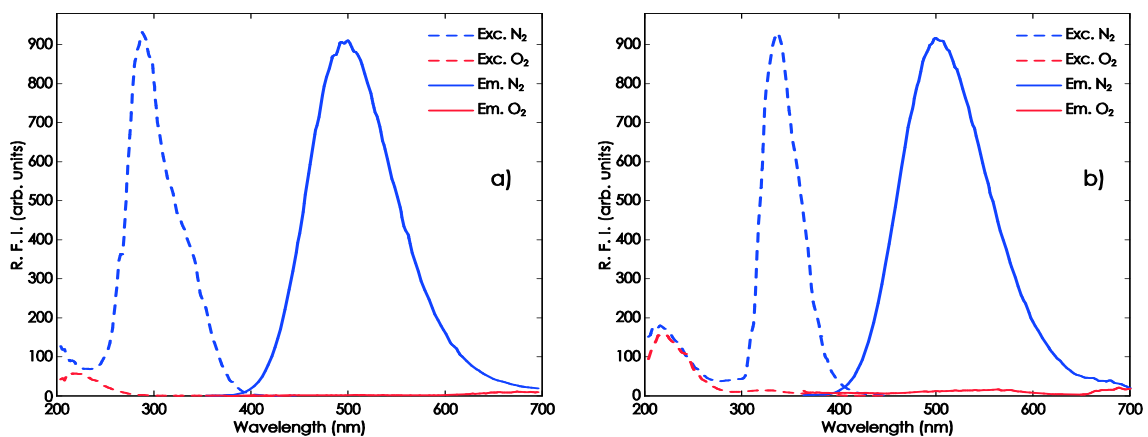


Figure 4. Excitation (---) and emission (—) spectra of CP05 a) in PS and b) in AP200/19 in the absence (blue) and presence (red) of oxygen (see Table 1 for the luminescent conditions).

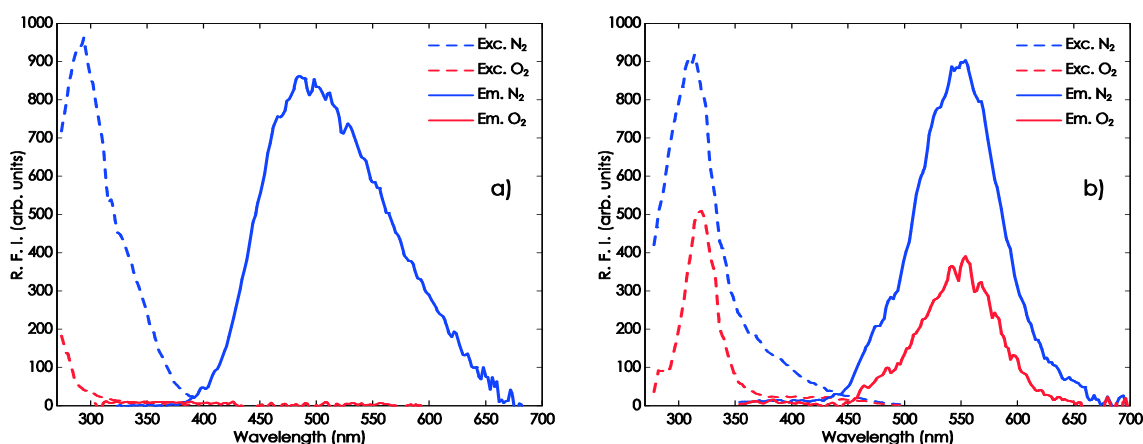


Figure 5. Excitation (---) and emission (—) spectra of CP06 a) in PS and b) in AP200/19 in the absence (blue) and presence (red) of oxygen (see Table 1 for the luminescent conditions).

3.2. Oxygen-sensitive properties

3.2.1. Intensity measurements

The sensing films were characterized by intensity measurements following the procedure described in the Experimental Section. The variations of the luminescence intensity with the oxygen concentration as well as the Stern-Volmer plots are shown in Figure 6 for CP04 immobilized into AP200/19 and PS; in Figure 7 for CP05 immobilized into AP200/19 and PS; and in Figure 8 for CP06 immobilized into PS. CP06 immobilized into AP200/19 provided irreproducible measurements and for this reason this sensing layer has not been characterized by intensity. As explained above, the irreproducibility is attributed to the low solubility of the complex in polar solid supports.

The fitting parameters for all five studied sensing films are reported in Table 2. As anticipated, the use of the nanostructured support AP200/19 increased the oxygen sensitivity, as shown by the increase of the Stern-Volmer constant values. In particular the incorporation of CP04 into AP200/19 increased its sensitivity more than 5 times compared to the same complex in a PS matrix. Such sensitivity improvement has previously been observed for Pt(II), Ru(II), and Ir(III) oxygen sensitive dyes^{4b, 4d, 4g, 11} and is now demonstrated for the first time with Cu(I) dyes, which confirms that the improvement is qualitatively due to the nanostructured film.

The most sensitive sensing films are based on CP04 and CP05 immobilized into AP200/19 (K_{SV1} of 545 bar⁻¹ and 513 bar⁻¹, respectively). Comparing these results with classical Pt(II), Ru(II), and Ir(III) sensing films using the same nanostructured matrix (see Table 3), it is clear that Cu(I) sensing films are very promising for O₂-sensing applications. Indeed, Ir(III) sensing films show lower sensitivity ($K_{SV}(\text{N969-AP200/19})=479$ bar⁻¹, $K_{SV}(\text{N1008-AP200/19})=145$ bar⁻¹, $K_{SV}(\text{EB146-AP200/19})=170$ bar⁻¹)¹¹ as well as Ru(II) sensing films ($K_{SV}(\text{ETHI-3003-AP200/19})=71.1$ bar⁻¹)^{4b}. Only the PtTFPP complex shows higher sensitivity in the same condition ($K_{SV}(\text{PtTFPP-AP200/19})=2568$ bar⁻¹)¹¹.

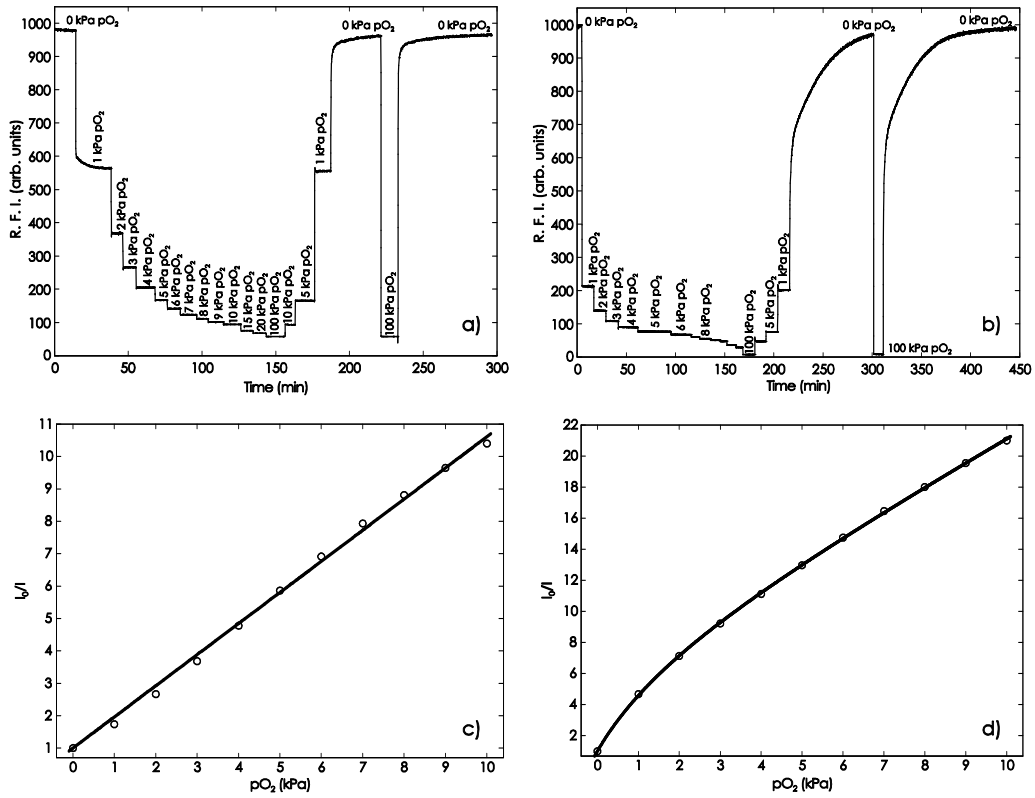


Figure 6. Time trace curves (variation of the luminescence intensity with the oxygen concentration) for a) CP04-PS and b) CP04-AP200/19, and Stern-Volmer plots in the range 0-10 kPa pO_2 for c) CP04-PS and d) CP04-AP200/19 obtained by intensity measurements (see Table 1 for luminescent conditions).

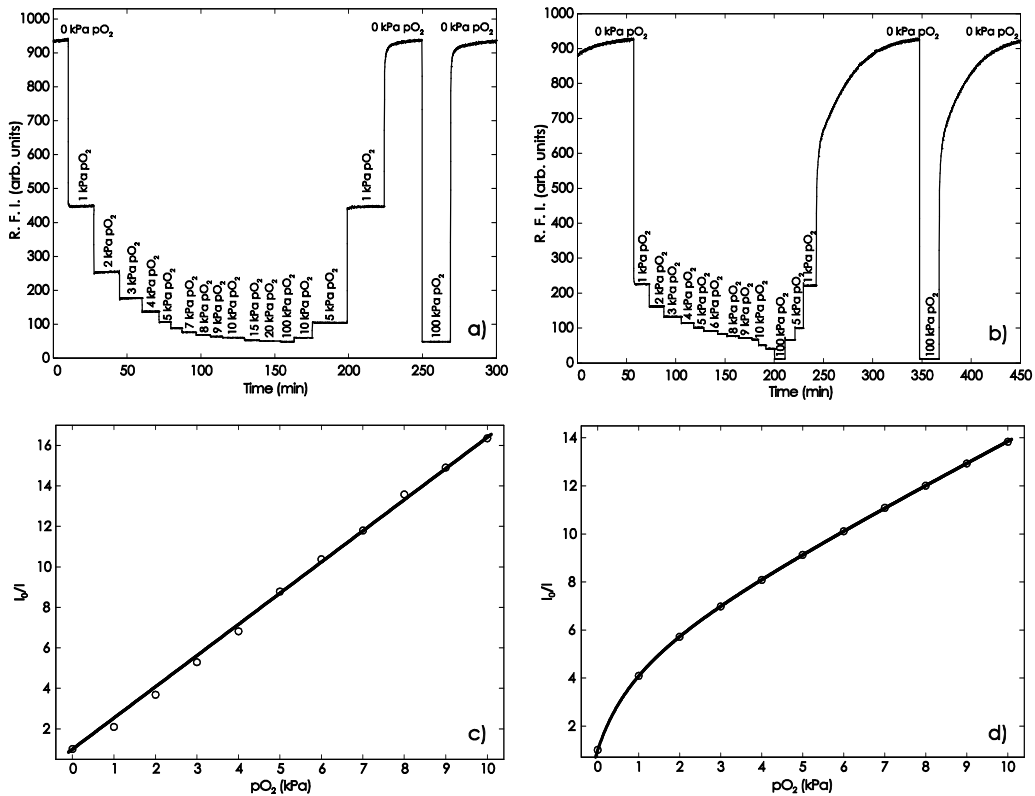


Figure 7. Time trace curves (variation of the luminescence intensity with the oxygen concentration) for a) CP05-PS and b) CP05-AP200/19, and Stern-Volmer plots in the range 0-10 kPa pO_2 for c) CP05-PS and d) CP05-AP200/19 obtained by intensity measurements (see Table 1 for luminescent conditions).

Table 2. Oxygen sensitivity of sensing films using luminescence intensity measurements and apparent luminescence lifetimes estimated from phase shift measurements.

Range	Parameters	Intensity measurements* (I_0/I)				
		CP04-PS	CP04-AP200/19	CP05-PS	CP05-AP200/19	CP06-PS
0-10 kPa pO ₂	K_{SV1} (bar ⁻¹)	93 ± 7 ^a	545.0 ± 32.3 ^b	159.0 ± 11.0 ^a	513.0 ± 19.2 ^b	257.0 ± 16.1 ^b
	x_1	1.0 ± 0.0	0.9 ± 0.1	1.0 ± 0.0	0.88 ± 0.05	0.93 ± 0.09
	K_{SV2} (bar ⁻¹)	–	20.0 ± 1.4	–	10.0 ± 0.8	4.0 ± 1.4
	x_2	–	0.09 ± 0.06	–	0.12 ± 0.04	0.07 ± 0.12
	R^2	0.9926 ± 0.0115	0.9966 ± 0.0084	0.9914 ± 0.0139	0.9960 ± 0.0115	0.9977 ± 0.0068
0-100 kPa pO ₂	K_{SV1} (bar ⁻¹)	162.8 ± 13.2 ^b	349.0 ± 10.7 ^b	314.9 ± 12.5 ^b	379.9 ± 17.0 ^b	233.3 ± 4.9 ^b
	x_1	0.94 ± 0.01	0.97 ± 0.01	0.96 ± 0.02	0.90 ± 0.01	0.95 ± 0.04
	K_{SV2} (bar ⁻¹)	0.00 ± 0.00	5.15 ± 0.64	0.00 ± 0.00	8.60 ± 4.80	0.03 ± 0.01
	x_2	0.06 ± 0.01	0.03 ± 0.01	0.04 ± 0.01	0.10 ± 0.03	0.05 ± 0.01
	R^2	0.9623 ± 0.0075	0.9999 ± 0.0006	0.9332 ± 0.0205	0.9996 ± 0.0008	0.9985 ± 0.0051
		Lifetime measurements* (τ_0/τ)				
		CP04-PS	CP04-AP200/19			
0-1 kPa pO ₂	K_{SV1} (bar ⁻¹)	19.0 ± 1.0 ^b	974.0 ± 87.0 ^b			
	x_1	0.62 ± 0.01	0.63 ± 0.09			
	K_{SV2} (bar ⁻¹)	20.0 ± 3.0	9.0 ± 5.0			
	x_2	0.38 ± 0.02	0.37 ± 0.08			
	R^2	0.9996 ± 0.0003	0.9998 ± 0.0002			
0-10 kPa pO ₂	K_{SV1} (bar ⁻¹)	28.0 ± 4.0 ^b	559.0 ± 16.0 ^b			
	x_1	0.76 ± 0.08	0.68 ± 0.09			
	K_{SV2} (bar ⁻¹)	1.0 ± 2.0	3.0 ± 7.0			
	x_2	0.24 ± 0.09	0.31 ± 0.08			
	R^2	0.9998 ± 0.0004	0.9988 ± 0.0009			

*[Dye concentration] = 1.5 mg mL⁻¹; the results are the average of 3 replicas $\pm s \frac{t}{\sqrt{n}}$ ($n = 3$, $t = 4.303$ ($2P = 0.05$), s = standard deviation); ^a Data fitted with the Stern-Volmer model; ^b Data fitted with the Demas two-site model.

Table 3. Comparison of the sensitivity of the O₂ sensing films under study with Pt(II), Ru(II), and Ir(III) sensing films from the literature. Figure 1 shows the chemical structure of Cu(I) complexes and Figure 2 shows the chemical structure of the platinumoid complexes commented in this Table.

Complex	Support	Sensitivity		Reference
		K_{SV} (bar ⁻¹)	$\Delta\tau_{0.05}$ (%)	
PITFPP	AP200/19	2568 ^a	62.53	11
	PS	41.42 ^a	-	11
	Silica beads	423 ^b	-	4f
	Silica beads in silicone	370 ^b	-	4f
N-969	AP200/19	479 ^a	20.98	11
N-1008	AP200/19	145 ^a	4.44	11
EB146	AP200/19	170 ^a	9.43	11
ETH ⁺ -3003	AP200/19	71.1 ^a	-	4b
CP04	AP200/19	559 ^a	33.55	This work
	PS	28 ^a	1.50	
CP05	AP200/19	513 ^a	-	This work
	PS	159 ^a	-	
CP06	PS	257 ^a	-	This work

^a pO₂ between 0-10 kPa.

^b pO₂ between 0-1 kPa.

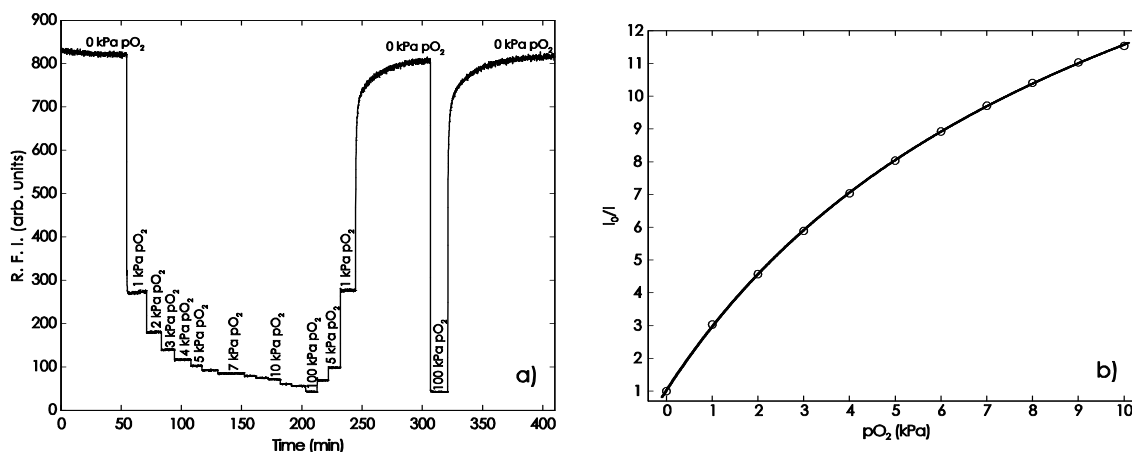


Figure 8. a) Time trace curves (variation of the luminescence intensity with the oxygen concentration) for CP06-PS and b) Stern-Volmer plots in the range 0-10 kPa pO₂ for CP06-PS (see Table 1 for luminescent conditions).

3.2.2. Lifetime measurements

The intensity measurements are not sensitive enough to characterize the sensing films in the range 0-1 kPa pO₂. Therefore we used lifetime measurements for this range of low oxygen concentrations. Only CP04 films were characterized using lifetime measurements in the frequency domain (phase-resolved method) because of the impossibility to excite other sensing films with the 375 nm LED used in our set-up.

For multifrequency analysis, rectangular-wave excitation signals with a 10% duty cycle and different fundamental frequencies (i.e., 113, 565 and 2825 Hz) were used to set the modulation frequency for each sensing film. The procedure for the selection of the modulation frequency can be found in reference.¹¹

This study (see Figure 9 and Figure 10) concludes that the most suitable modulation frequencies (in the frequency range 100 Hz - 23 kHz) for the measurement range 0-10 kPa pO₂ are 5650 Hz for the CP04-PS sensing film (average phase difference of 21.83°) and 14125 Hz for the CP04-AP200/19 sensing film (average phase difference of 37.28°). Similar modulation frequencies were obtained for the measurement range 0-1 kPa pO₂. After finding the appropriate modulation frequency for each sensing film, 10% duty cycle rectangular-wave excitation signals with the selected modulation frequencies (i.e., with fundamental frequencies of 5650 Hz and 14125 Hz for CP04-PS and CP04-AP200/19 membranes, respectively) were used to carry out the calibration of the sensing films. This allowed a higher power of signaling (i.e., better signal-to-noise ratio (SNR) for the modulated signal), since the first harmonic of the rectangular signal (the fundamental harmonic) has the greatest amplitude.⁸ⁱ

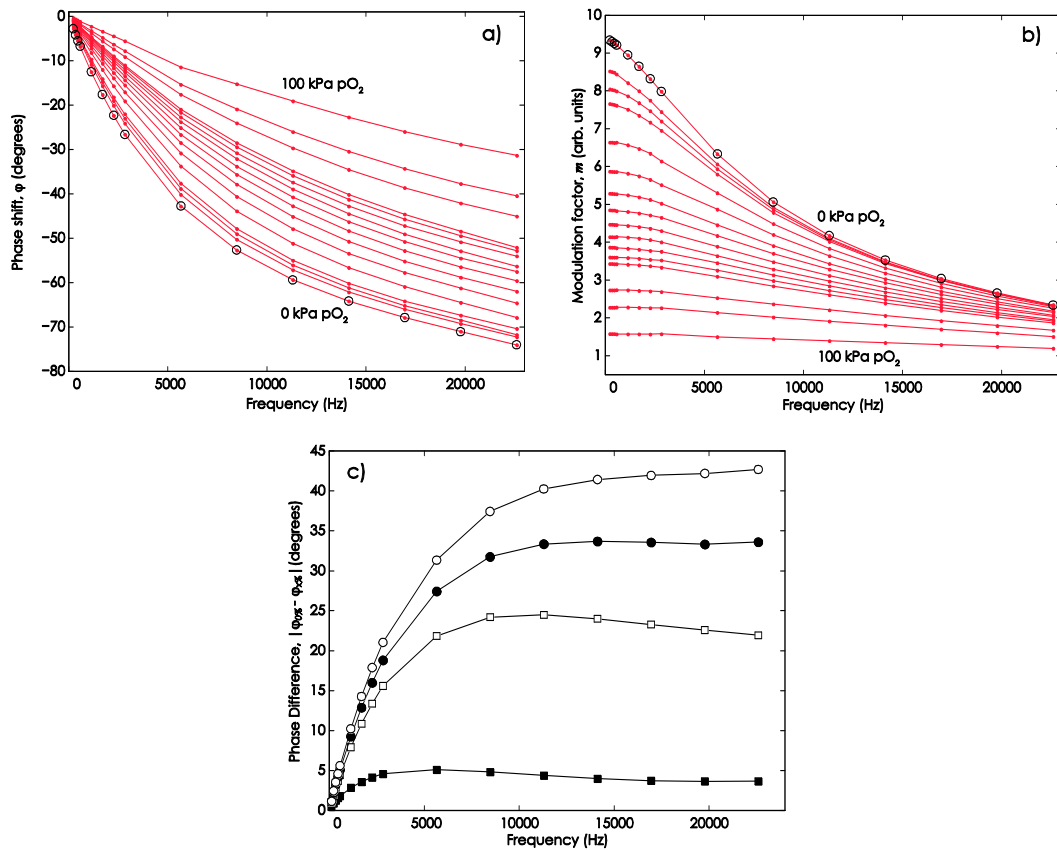


Figure 9. Variation of the a) phase-shift and b) modulation factor¹ with the modulation frequency at different oxygen concentrations (0, 0.5, 0.75, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 and 100 kPa pO₂), and c) effect of the modulation frequency on the average phase difference at several oxygen concentrations (■ from 0 to 1 kPa pO₂, □ from 0 to 10 kPa pO₂, ● from 0 to 20 kPa pO₂, ○ from 0 to 100 kPa pO₂) of CP04 incorporated into PS at 21 °C.

¹ Modulation factors are estimated from the measurements at both channels of the digital oscilloscope (see reference 11b). The amplitude of the excitation signal is expressed in volts and the emission signal is also expressed in volts after transduction in the Photomultiplier Tube (PMT) and preamplification. So, modulation factor is expressed in V/V, even though the values would be scaled depending on the configuration of the PMT and the preamplification stage. For this reason, the modulation factor is expressed in arbitrary units.

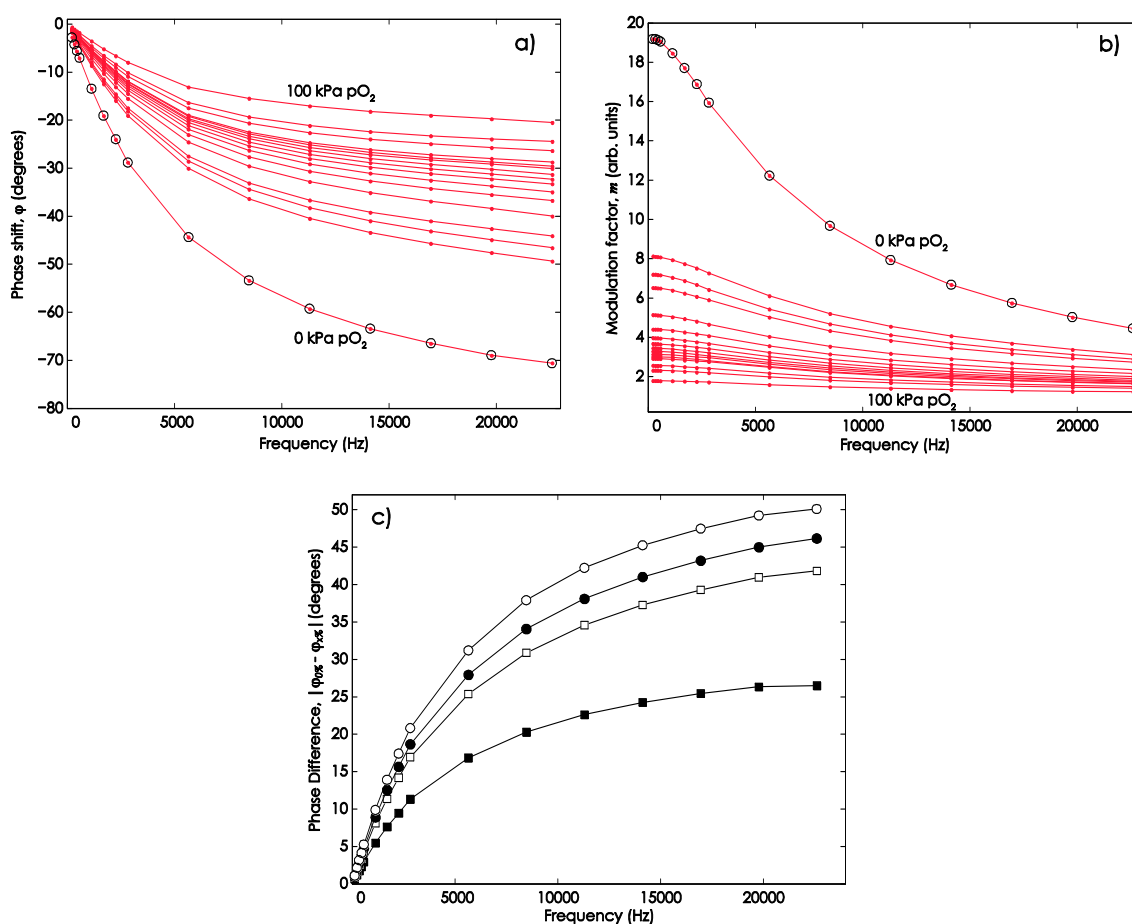


Figure 10. Variation of the a) phase-shift and b) modulation factor² with the modulation frequency at different oxygen concentrations (0, 0.5, 0.75, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 and 100 kPa pO₂), and c) effect of the modulation frequency on the average phase difference at several oxygen concentrations (■ from 0 to 1 kPa pO₂, □ from 0 to 10 kPa pO₂, ● from 0 to 20 kPa pO₂, ○ from 0 to 100 kPa pO₂) of CP04 incorporated into AP200/19 at 21 °C.

Oxygen-sensitive properties of CP04 immobilized into PS as well as into AP200/19 were determined following the procedure described in section 2.4. The calibration curves for CP04 incorporated into PS and into AP200/19 when exposed to different oxygen concentrations are shown in Figure 11 and the results are summarized in Table 2.

As for intensity measurements, the incorporation of the dye into AP200/19 increased the sensitivity of the film to oxygen. Gratifyingly, intensity and lifetime measurements provided similar results for high oxygen concentrations (K_{SV1} of CP04-AP200/19 by intensity is 545 bar⁻¹ and by lifetime is 559 bar⁻¹ for the range 0-10 kPa pO₂). A significant advantage is that lifetime measurements allowed characterization of the sensing films also at very low oxygen

² Modulation factors are estimated from the measurements at both channels of the digital oscilloscope (see reference 11b). The amplitude of the excitation signal is expressed in volts and the emission signal is also expressed in volts after transduction in the Photomultiplier Tube (PMT) and preamplification. So, modulation factor is expressed in V/V, even though the values would be scaled depending on the configuration of the PMT and the preamplification stage. For this reason, the modulation factor is expressed in arbitrary units.

concentrations (range 0-1 kPa pO_2) demonstrating the high sensitivity of the film (K_{SV1} of CP04-AP200/19 is 974 bar^{-1}) in these conditions.

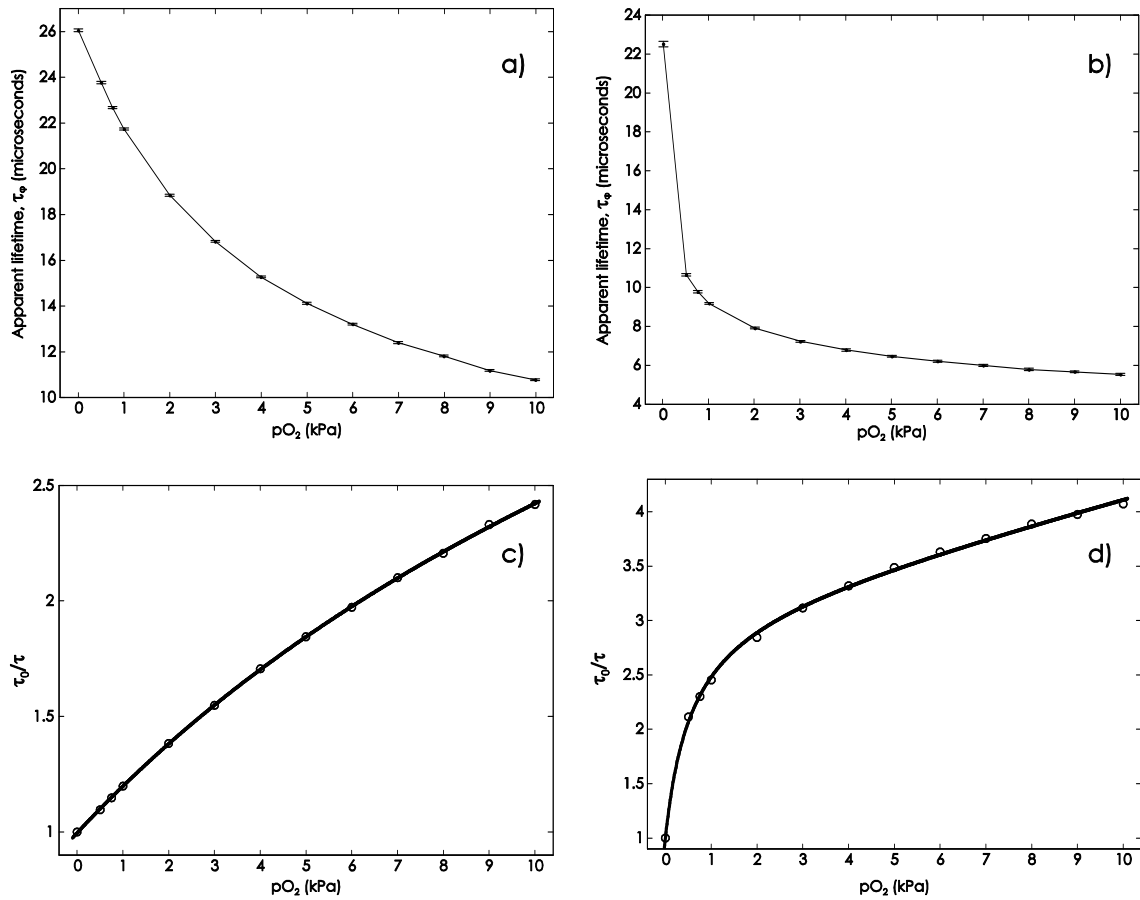


Figure 11. Apparent lifetimes determined from the phase-shift (τ_ϕ , expressed in microseconds) of a) CP04-PS and b) CP04-AP200/19 at 21 °C in the range 0-10 kPa pO_2 ; and Stern-Volmer plot of c) CP04-PS and d) CP04-AP200/19 fitted using the Demas two-site model.

To demonstrate that these new sensing films can also be used for ultra-low oxygen detection, the gas station was modified by replacing the pure oxygen with synthetic air (mixture of oxygen and nitrogen) to achieve a minimum oxygen concentration of 0.05 kPa pO_2 . The phase-based luminescence lifetime variations for different oxygen levels between 0 and 2.1 kPa pO_2 are shown in Figure 12. The results demonstrate that both membranes (CP04-PS and CP04-AP200/19) are suitable for the detection of ultra-low oxygen concentrations.

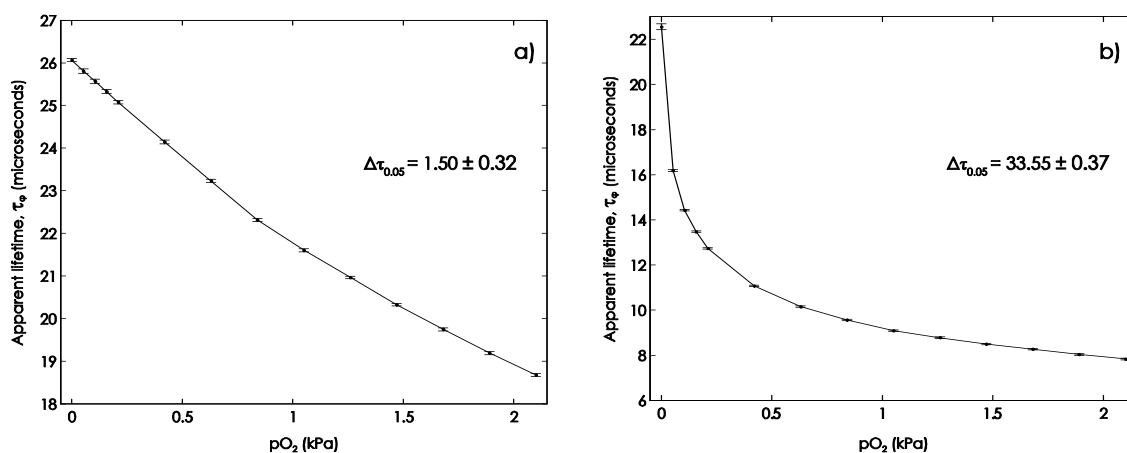


Figure 12. Variation of the apparent lifetime between 0 and 2.1 kPa pO_2 of CP04 incorporated into a) PS and b) AP200/19 at 21 °C and the parameter $\Delta\tau_{0.05}$.

$\Delta\tau_{0.05\%}$ was used to characterize the sensitivity of the sensing films for concentrations over 0.05 kPa pO_2 . This parameter was determined following the equation provided in the literature:¹¹

$$\Delta\tau_{0.05\%} = \frac{\tau_0 - \tau_{0.05}}{\tau_0 - \tau_{100}} \times 100$$

where τ_0 corresponds to the luminescence lifetime in the absence of oxygen, $\tau_{0.05}$ is the luminescence lifetime in the presence of 0.05 kPa oxygen and τ_{100} is the luminescence lifetime in the presence of 100 kPa oxygen. CP04-PS has a $\Delta\tau_{0.05\%} = 1.50 \pm 0.32\%$ while CP04-AP200/19 shows a much higher $\Delta\tau_{0.05\%} = 33.55 \pm 0.37\%$. In practice it means that 33.55% of the emission is quenched at 0.05 kPa pO_2 . Therefore, CP04-AP200/19 is the most suitable sensing film for ultra-low detection of oxygen.

Comparing these results with previous works from our research group using the same methodology and same set-up (see Table 3)¹¹, we confidently conclude that CP04-AP200/19 is more sensitive at ultra-low O_2 concentrations than Ir(III) complexes (i.e. $\Delta\tau_{0.05\%}$ for N969, N1008 and EB146 immobilized in the same solid support and performing the measurements in the same conditions are $20.98 \pm 1.02\%$, $4.44 \pm 0.70\%$ and $9.43 \pm 1.41\%$, respectively). Among the noble metal-based sensing films, only PtTFPP-AP200/19 sensing film ($\Delta\tau_{0.05\%} = 62.53 \pm 3.66\%$), which is one of the most sensitive film at ultra-low O_2 concentration reported in the literature, displays better performance than CP04-AP200/19.

To demonstrate the usefulness of the developed sensing films by intensity and lifetime measurements, several air samples were analyzed. The oxygen concentrations measured with the sensing films were compared with the real O_2 concentrations (see Table 4). Because of their higher sensitivity, films based on AP200/19 are also more accurate with intensity measurements, while both matrices have similar accuracy for lifetime measurements.

Table 4. Measurement capability of the developed sensing films using luminescence intensity measurements and apparent luminescence lifetime measurements determined from the phase shift. The data are shown in kPa and the relative error (into bracket) in %.

Intensity measurements ^a					
Real pO_2 , kPa	CP04-PS	CP04-AP200/19	CP05-PS	CP05- AP200/19	CP06-PS
1.00	0.917 (9.72)	1.023 (2.43)	0.902 (9.92)	1.000 (0.18)	1.020 (2.22)
2.00	1.840 (8.55)	1.997 (0.31)	1.854 (7.73)	1.998 (0.23)	1.998 (0.42)
3.00	2.904 (6.57)	2.973 (0.96)	2.902 (6.66)	3.000 (0.18)	2.995 (0.58)
5.00	5.047 (0.98)	4.984 (0.43)	5.042 (0.87)	5.001 (0.14)	4.987 (0.97)
6.00	6.143 (2.41)	6.008 (0.28)	6.083 (1.41)	5.999 (0.20)	5.993 (0.89)
7.00	7.204 (2.95)	7.040 (0.62)	7.005 (0.14)	7.004 (0.22)	7.003 (0.88)
9.00	9.001 (0.10)	8.996 (0.22)	9.013 (0.18)	9.001 (0.18)	8.990 (0.79)

Lifetime measurements ^b		
Real pO_2 , kPa	CP04-PS	CP04-AP200/19
0.50	0.479 (3.25)	0.523 (3.64)
0.75	0.744 (1.19)	0.748 (0.92)
1.00	0.999 (1.06)	0.972 (2.83)
3.00	2.999 (0.52)	2.975 (1.34)
5.00	5.001 (0.53)	5.050 (1.55)
6.00	5.970 (0.74)	6.028 (1.80)
7.00	7.009 (0.68)	7.036 (1.48)
9.00	9.093 (1.15)	8.959 (1.51)

^a All values correspond to the average of 50 measurements. Calibration curves obtained for the luminescence intensity (I , expressed in arb. units) in the range of 0-10 kPa pO_2 were used.

^b All values correspond to the average of 50 measurements. Calibration curves obtained for the apparent lifetime determined from the phase-shift (τ_ϕ , expressed in microseconds) at a single modulation frequency in the range of 0-10 kPa pO_2 were used.

3.3. Reversibility, response times, stability and the effect of humidity

The quenching reaction does not consume oxygen and therefore the process is reversible as demonstrated by results shown in Figure 6.

As the most relevant application for this sensing film is trace oxygen analysis, the response and recovery times have been calculated between 1 and 5 kPa pO₂, which provide more relevant information than response times to 100% of oxygen and recovery to anoxic condition. The t₉₅ response times for all of the sensing films are given in Table 5. All of them are shorter than 11 s when changing from 1 to 5 kPa pO₂ and shorter than 16 s when changing from 5 to 1 kPa pO₂. The registered response times are in fact the response times of the full system, which is the time needed by the system to change O₂ concentration from 1 to 5 kPa pO₂ and vice versa.

Table 5. Response times (t₉₅) of the dyes incorporated into PS and AP200/19.

Sensing film*	t ₉₅ Response time (s)	
	1-5 kPa	5-1 kPa
CP04-PS	10.0 ± 0.5	13.0 ± 0.4
CP04-AP200/19	3.3 ± 0.3	10.4 ± 0.5
CP05-PS	6.4 ± 0.3	11.1 ± 0.6
CP05-AP200/19	5.8 ± 0.4	10.7 ± 0.5
CP06-PS	11.0 ± 0.3	15.6 ± 0.4

*[Dye concentration] = 1.5 mg mL⁻¹; the results are the average of 3 replicas $\pm s \frac{t}{\sqrt{n}}$ (n = 3, t = 4.303 (2P = 0.05), s = standard deviation).

An important concern common to all optical sensors is the degradation of their quantum efficiency following prolonged sampling and continuous illumination. For this reason, it is very important to know the photostability of the immobilized dyes. To evaluate the photostability of the sensing films, they were illuminated with a UV lamp (VL-6.LC, wavelength of 315 nm and 6 Watt power) during 6 h. The photostability study (Figure 13 for CP-04 films and Figure 14 for other films) was carried out at 21 °C for three oxygen concentrations (0, 2, and 8 kPa). Data were collected every hour, using intensity measurements. The most stable sensing film was CP05 immobilized into PS, which suffered the least degradation (12% of the signal after 6 hours).

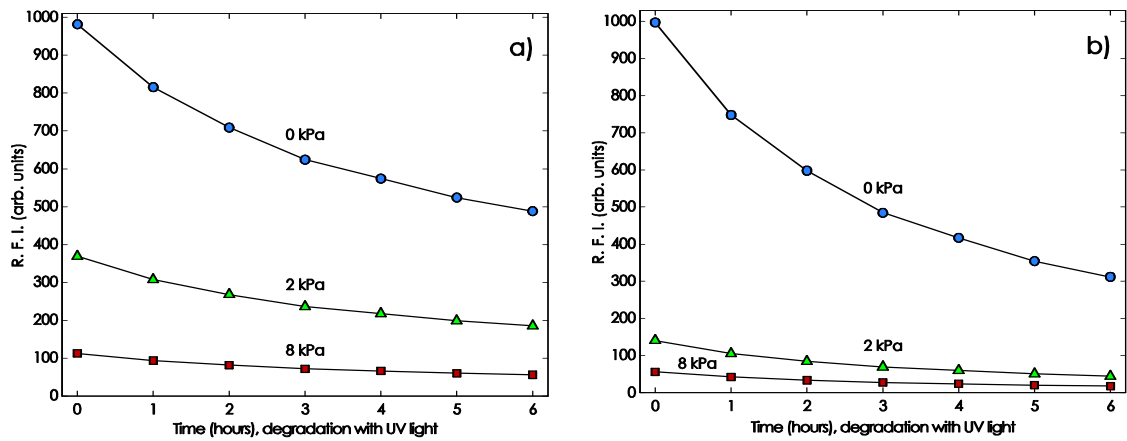


Figure 13. Photostability testing of a) CP04-PS and b) CP04-AP200/19 at 21 °C for several oxygen concentrations using intensity measurements. The degradation of the membranes was performed using a UV lamp VL-6.LC from Vilber Lourmat (wavelength of 315 nm and 6 Watt power). A CN-6 darkroom from Vilber Lourmat was used to place the UV lamp and sensing films.

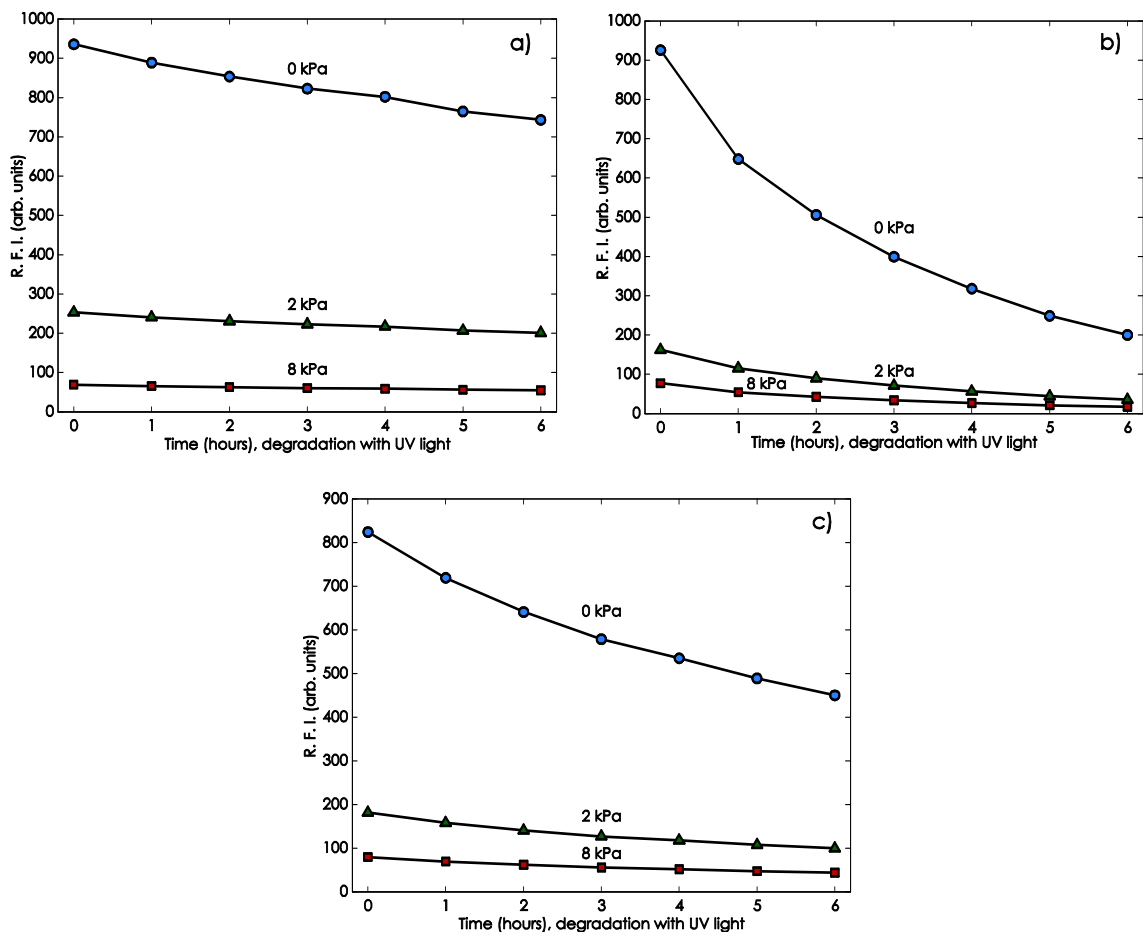


Figure 14. Photostability testing of a) CP05-PS, b) CP05-AP200/19 and c) CP06-PS at 21 °C for several oxygen concentrations using intensity measurements.

Finally, the effect of the humidity on the sensing response was also evaluated in order to demonstrate the real applicability of the developed sensing films. Five sensing films based on CP04 immobilized into PS and AP200/19 were used to determine the concentration of oxygen

between 0 and 20 kPa at various levels of relative humidity (0, 10, 20, 40 and 80% RH) (Figure 15). CP04 immobilized into PS was not affected by RH because of the hydrophobicity of PS. On the other hand, CP04 immobilized into AP200/19 was affected by RH and the sensitivity of the film to oxygen decreased as the RH increased. It is due to the high hydrophilicity of the solid support which had been pointed out several times in the literature^{4b, 7, 12}. Thus, CP04 immobilized into AP200/19 is more useful for gaseous analysis and the relative humidity of the environment has to be taken into account during the calibration of the sensing film.

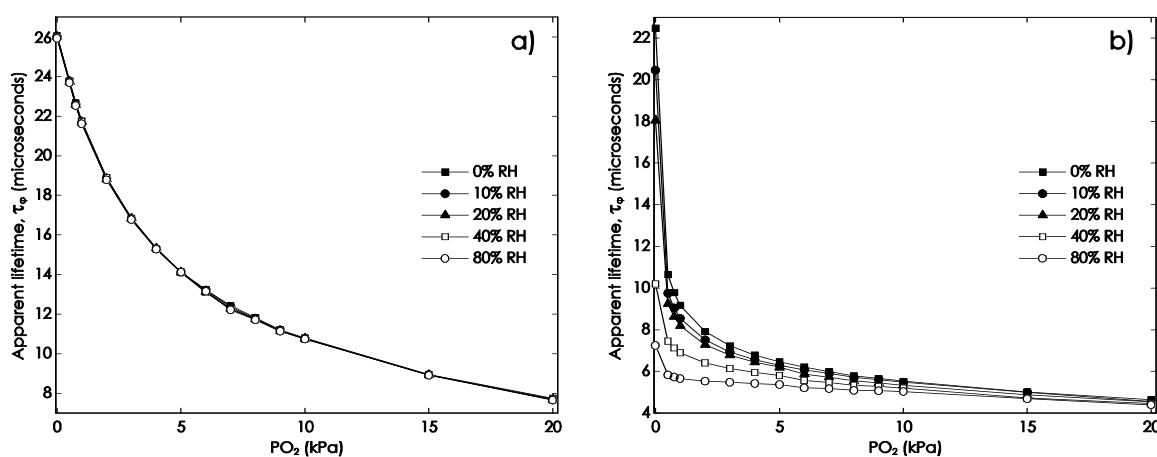


Figure 15. Effect of relative humidity (RH, %) on the apparent lifetime estimated from phase shift (τ_ϕ , expressed in microseconds) of a) CP04 incorporated into PS and b) CP04 incorporated into AP200/19 at 21 °C.

4. Conclusions

The luminescent Cu(I)-complexes CP04, CP05 and CP06 were investigated for the optical sensing of low and ultra-low oxygen concentrations using intensity and phase-based apparent lifetime measurements. The organometallic complexes were incorporated into both a classical PS membrane and a nanostructured, metal oxide matrix. They were characterized under a controlled atmosphere.

This is the first time that Cu(I) complexes have been incorporated into AP200/19. The spectral properties of these dyes are not affected by the solid support. In addition, the luminescence lifetime of CP04 is not affected by the solid support (τ_0 (AP200/19) = 22.53 μ s, τ_0 (PS) = 26.00 μ s). The most sensitive sensing films are based on CP04 and CP05 immobilized into AP200/19 (K_{SV1} of 545 bar^{-1} and 513 bar^{-1} , respectively, in the range 0-10 kPa pO_2). Interestingly they show higher sensitivity than classical Ir(III) sensing films (K_{SV} (N969-AP200/19)=479 bar^{-1} , K_{SV} (N1008-AP200/19)=145 bar^{-1} , K_{SV} (EB146-AP200/19)=170 bar^{-1}), but still lower than PtTFPP complex (K_{SV} (PtTFPP-AP200/19)= 2568 bar^{-1}). As expected from the definition of K_{SV} , sensitivity is primarily better correlated to the lifetime of excited state of the emitting species than to the photoluminescent quantum yield of the film, which provides a direction of research to further increase the sensitivity of these promisingly low cost copper-based emitters.

Furthermore these sensing films are suitable for ultra-low oxygen detection down to 0.05 kPa pO₂. In particular the parameter $\Delta\tau_{0.05\%}$ (33.55±0.37%) shows that CP04-AP200/19 is more sensitive at ultra-low O₂ concentrations than films based on Ir(III) complexes (i.e. $\Delta\tau_{0.05\%}$ for N969, N1008 and EB146 immobilized into the same solid support and performing the measurements in the same conditions are 20.98±1.02%, 4.44±0.70% and 9.43±1.41%, respectively) and as much as the half of the most sensitive sensing films at ultra-low O₂ concentration reported in the literature ($\Delta\tau_{0.05\%}$ for PtTFPP-AP200/19 is 62.53±3.66%). These results make the copper-based sensing film one of the cheaper alternative published in the literature for ultralow oxygen detection.

Overall, we have clearly demonstrated that copper-based luminescent complexes are a credible alternative to more expensive emitters for oxygen sensing and deserve particular attention for the development of low cost O₂ sensing films.

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge the financial support of the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (CTQ2011-25316 and Medina-Rodríguez's grant reference BES-2009-026919), the Regional Government of Andalusia (Excellence projects P07-FQM-2625 and P07-FQM-2738), and the European Union (MulTHIC, IEF-326107). Also, the authors are grateful to Ilford Imaging Switzerland GmbH (Switzerland) for supplying the metal oxide membranes.

References

- (a) Borisov, S. M.; Vasylevska, A. S.; Krause, C.; Wolfbeis, O. S., Composite luminescent material for dual sensing of oxygen and temperature. *Advanced Functional Materials* **2006**, *16* (12), 1536-1542; (b) Fernández-Sánchez, J. F.; Roth, T.; Cannas, R.; Nazeeruddin, M. K.; Spichiger, S.; Graetzel, M.; Spichiger-Keller, U. E., Novel oxygen sensitive complexes for optical oxygen sensing. *Talanta* **2007**, *71* (1), 242-250; (c) McDonagh, C.; Burke, C. S.; MacCraith, B. D., Optical Chemical Sensors. *Chemical Reviews* **2008**, *108* (2), 400-422; (d) Wolfbeis, O. S., Fiber-Optic Chemical Sensors and Biosensors. *Analytical Chemistry* **2008**, *80* (12), 4269-4283; (e) Borisov, S. M.; Seifner, R.; Klimant, I., A novel planar optical sensor for simultaneous monitoring of oxygen, carbon dioxide, pH and temperature. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2011**, *400* (8), 2463-2474; (f) Koren, K.; Borisov, S. M.; Saf, R.; Klimant, I., Strongly phosphorescent iridium(III)-porphyrins - New oxygen indicators with tuneable photophysical properties and functionalities. *European Journal of Inorganic Chemistry* **2011**, (10), 1531-1534; (g) Wang, X.-d.; Wolfbeis, O. S., Optical methods for sensing and imaging oxygen: materials, spectroscopies and applications. *Chemical Society Reviews* **2014**, *43* (10), 3666-3761.
- (a) Amao, Y., Probes and Polymers for Optical Sensing of Oxygen. *Microchimica Acta* **2003**, *143* (1), 1-12; (b) Lange, C. A. K.; Stavarakas, P.; Luhmann, U. F. O.; De Silva, D. J.; Ali, R. R.; Gregor, Z. J.; Bainbridge, J. W. B., Intraocular oxygen distribution in advanced proliferative diabetic retinopathy. *American Journal of Ophthalmology* **2011**, *152* (3), 406-412; (c) Medina-Castillo, A. L.; Fernández-Sánchez, J. F.; Fernández-Gutiérrez, A., One-step fabrication of multifunctional core-shell fibres by Co-electrospinning. *Advanced Functional Materials* **2011**, *21* (18), 3488-3495; (d) Xie, K.; Zhang, X.-W.; Huang, L.; Wang, Y.-T.; Lei, Y.;

- Rong, J.; Qian, C.-W.; Xie, Q.-L.; Wang, Y.-F.; Hong, A.; Xiong, S., On-line monitoring of oxygen in Tubespinn, a novel, small-scale disposable bioreactor. *Cytotechnology* **2011**, *63* (4), 345-350; (e) Achatz, D. E.; Meier, R. J.; Fischer, L. H.; Wolfbeis, O. S., Luminescent sensing of oxygen using a quenchable probe and upconverting nanoparticles. *Angewandte Chemie International Edition* **2011**, *50* (1), 260-263; (f) Song, D. H.; Kim, H. D.; Kim, K. C., Dissolved oxygen concentration field measurement in micro-scale water flows using PtOEP/PS film sensor. *Optics and Lasers in Engineering* **2012**, *50* (1), 74-81; (g) Ergeneman, O.; Chatzipirpiridis, G.; Pokki, J.; Marín-Suárez del Toro, M.; Sotiriou, G. A.; Medina-Rodriguez, S.; Fernández-Sánchez, J. F.; Fernández-Gutiérrez, A.; Pane, S.; Nelson, B. J., In Vitro Oxygen Sensing Using Intraocular Microrobots. *Biomedical Engineering, IEEE Transactions on* **2012**, *59* (11), 3104-3109.
3. Lakowicz, J. R., *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. 2nd ed.; Kluwer Academic: New York, **1999**.
 4. (a) Borisov, S. M.; Klimant, I., Ultrabright oxygen optodes based on cyclometalated iridium(III) coumarin complexes. *Analytical Chemistry* **2007**, *79* (19), 7501-7509; (b) Fernández-Sánchez, J. F.; Cannas, R.; Spichiger, S.; Steiger, R.; Spichiger-Keller, U. E., Novel nanostructured materials to develop oxygen-sensitive films for optical sensors. *Analytica Chimica Acta* **2006**, *566* (2), 271-282; (c) Medina-Castillo, A. L.; Fernández-Sánchez, J. F.; Klein, C.; Nazeeruddin, M. K.; Segura-Carretero, A.; Fernández-Gutiérrez, A.; Graetzel, M.; Spichiger-Keller, U. E., Engineering of efficient phosphorescent iridium cationic complex for developing oxygen-sensitive polymeric and nanostructured films. *Analyst* **2007**, *132* (9), 929-936; (d) Marín-Suárez del Toro, M.; Fernández-Sánchez, J. F.; Baranoff, E.; Nazeeruddin, M. K.; Grätzel, M.; Fernández-Gutiérrez, A., Novel luminescent Ir(III) dyes for developing highly sensitive oxygen sensing films. *Talanta* **2010**, *82* (2), 620-626; (e) Roche, P. J. R.; Cheung, M. C. K.; Yung, K. Y.; Kirk, A. G.; Chodavarpu, V. P.; Bright, F. V., Application of gold quenching of luminescence to improve oxygen sensing using a ruthenium (4,7-diphenyl-1,10-phenanthroline)₃Cl₂:TEOS thin film. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2010**, *147* (2), 581-586; (f) Borisov, S. M.; Lehner, P.; Klimant, I., Novel optical trace oxygen sensors based on platinum(II) and palladium(II) complexes with 5,10,15,20-meso-tetrakis-(2,3,4,5,6-pentafluorophenyl)-porphyrin covalently immobilized on silica-gel particles. *Analytica Chimica Acta* **2011**, *690* (1), 108-115; (g) Marín-Suárez, M.; Curchod, B. F. E.; Tavernelli, I.; Rothlisberger, U.; Scopelliti, R.; Jung, I.; Di Censo, D.; Grätzel, M.; Fernández-Sánchez, J. F.; Fernández-Gutiérrez, A.; Nazeeruddin, M. K.; Baranoff, E., Nanocomposites containing neutral blue emitting cyclometalated iridium(III) emitters for oxygen sensing. *Chemistry of Materials* **2012**, *24* (12), 2330-2338.
 5. (a) Gneu; Leith, M. J.; Finger, L. H.; Rau, N.; Yersin, H.; Sundermeyer, J., A new class of luminescent Cu(I) complexes with tripodal ligands - TADF emitters for the yellow to red color range. *Dalton Transactions* **2015**; (b) Osawa, M.; Hoshino, M.; Hashimoto, M.; Kawata, I.; Igawa, S.; Yashima, M., Application of three-coordinate copper(I) complexes with halide ligands in organic light-emitting diodes that exhibit delayed fluorescence. *Dalton Transactions* **2015**; (c) Leith, M. J.; Krylova, V. A.; Djurovich, P. I.; Thompson, M. E.; Yersin, H., Phosphorescence versus Thermally Activated Delayed Fluorescence. Controlling Singlet-Triplet Splitting in Brightly Emitting and Sublimable Cu(I) Compounds. *Journal of the American Chemical Society* **2014**, *136* (45), 16032-16038; (d) Wallesch, M.; Volz, D.; Zink, D. M.; Schepers, U.; Nieger, M.; Baumann, T.; Bräse, S., Bright Copper Opportunities: Multinuclear CuI Complexes with N-P Ligands and Their Applications. *Chemistry – A European Journal* **2014**, *20* (22), 6578-6590; (e) Hofbeck, T.; Monkowius, U.; Yersin, H., Highly Efficient Luminescence of Cu(I) Compounds: Thermally Activated Delayed Fluorescence Combined with Short-Lived Phosphorescence. *Journal of the American Chemical Society* **2014**, *137* (1), 399-404.
 6. (a) Miller, M. T.; Karpishin, T. B., Oxygen sensing by photoluminescence quenching of a heteroleptic copper (I) bis(phenanthroline) complex immobilized in polystyrene. *Sensors and Actuators B: Chemical* **1999**, *61* (1-3), 222-224; (b) Shi, L.; Li, B.; Yue, S.; Fan, D., Synthesis, photophysical and oxygen-sensing properties of a novel bluish-green emission Cu(I) complex. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2009**, *137* (1), 386-392; (c) Smith, C. S.; Mann, K. R., Void Space Containing Crystalline Cu(I) Phenanthroline

- Complexes As Molecular Oxygen Sensors. *Chemistry of Materials* **2009**, 21 (21), 5042-5049; (d) Wang, Y.; Li, B.; Liu, Y.; Zhang, L.; Zuo, Q.; Shi, L.; Su, Z., Highly sensitive oxygen sensors based on Cu(II) complex-polystyrene composite nanofibrous membranes prepared by electrospinning. *Chemical Communications* **2009**, (39), 5868-5870; (e) Smith, C. S.; Branham, C. W.; Marquardt, B. J.; Mann, K. R., Oxygen Gas Sensing by Luminescence Quenching in Crystals of Cu(xantphos)(phen)⁺ Complexes. *Journal of the American Chemical Society* **2010**, 132 (40), 14079-14085; (f) Wen, C.; Tao, G.; Xu, X.; Feng, X.; Luo, R., A phosphorescent copper(I) complex: Synthesis, characterization, photophysical property, and oxygen-sensing behavior. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **2011**, 79 (5), 1345-1351; (g) Yuasa, J.; Dan, M.; Kawai, T., Phosphorescent properties of metal-free diphosphine ligands and effects of copper binding. *Dalton Transactions* **2013**, 42 (45), 16096-16101.
7. (a) Fernández-Sánchez, J. F.; Nezel, T.; Steiger, R.; Spichiger-Keller, U. E., Novel optical NO₂-selective sensor based on phthalocyaninato-iron(II) incorporated into a nanostructured matrix. *Sensors and Actuators, B: Chemical* **2006**, 113 (2), 630-638; (b) Fernández-Sánchez, J. F.; Fernández, I.; Steiger, R.; Beer, R.; Cannas, R.; Spichiger-Keller, U. E., Second-generation nanostructured metal oxide matrices to increase the thermal stability of CO and NO₂ sensing layers based on iron(II) phthalocyanine. *Advanced Functional Materials* **2007**, 17 (7), 1188-1198.
 8. (a) Trettnak, W.; Kolle, C.; Reiningger, F.; Dolezal, C.; O'Leary, P., Miniaturized luminescence lifetime-based oxygen sensor instrumentation utilizing a phase modulation technique. *Sensors and Actuators, B: Chemical* **1996**, 36 (1-3), 506-512; (b) Dakin, J.; Culshaw, B., *Optical Fiber Sensors: Applications, Analysis and Future Trends*. Artech House ed.; Norwood, MA, **1997**; (c) Tsukada, K.; Sakai, S.; Hase, K.; Minamitani, H., Development of catheter-type optical oxygen sensor and applications to bioinstrumentation. *Biosensors & Bioelectronics* **2003**, 18 (12), 1439-1445; (d) Yeh, T. S.; Chu, C. S.; Lo, Y. L., Highly sensitive optical fiber oxygen sensor using Pt(II) complex embedded in sol-gel matrices. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2006**, 119 (2), 701-707; (e) Medina-Rodríguez, S.; de la Torre-Vega, A.; Fernández-Sánchez, J. F.; Fernández-Gutiérrez, A., An open and low-cost optical-fiber measurement system for the optical detection of oxygen using a multifrequency phase-resolved method. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2013**, 176 (0), 1110-1120; (f) Medina-Rodríguez, S.; de la Torre-Vega, A.; Fernández-Sánchez, J. F.; Fernández-Gutiérrez, A., Evaluation of a simple PC-based quadrature detection method at very low SNR for luminescence spectroscopy. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2014**, 192 (0), 334-340; (g) McDonagh, C.; Kolle, C.; McEvoy, A. K.; Dowling, D. L.; Cafolla, A. A.; Cullen, S. J.; MacCraith, B. D., Phase fluorometric dissolved oxygen sensor. *Sensors and Actuators, B: Chemical* **2001**, 74 (1-3), 124-130; (h) Hartmann, P.; Leiner, M. J. P.; Lippitsch, M. E., Response characteristics of luminescent oxygen sensors. *Sensors and Actuators B: Chemical* **1995**, 29 (1-3), 251-257; (i) Medina-Rodríguez, S.; de la Torre-Vega, A.; Sainz-Gonzalo, F. J.; Marín-Suárez, M.; Elosúa, C.; Arregui, F. J.; Matias, I. R.; Fernández-Sánchez, J. F.; Fernández-Gutiérrez, A., Improved Multifrequency Phase-Modulation Method That Uses Rectangular-Wave Signals to Increase Accuracy in Luminescence Spectroscopy. *Analytical Chemistry* **2014**, 86 (11), 5245-5256.
 9. Andrzejewski, D.; Klimant, I.; Podbielska, H., Method for lifetime-based chemical sensing using the demodulation of the luminescence signal. *Sensors and Actuators, B: Chemical* **2002**, 84 (2-3), 160-166.
 10. Demas, J. N.; DeGraff, B. A., Luminescence-based sensors: microheterogeneous and temperature effects. *Sensors and Actuators: B. Chemical* **1993**, 11 (1-3), 35-41.
 11. Medina-Rodríguez, S.; Marín-Suárez del Toro, M.; Fernández-Sánchez, J. F.; Torre-Vega, A. d. I.; Baranoff, E.; Fernández-Gutiérrez, A., High performance optical sensing nanocomposites for low and ultra-low oxygen concentrations using phase-shift measurements. *Analyst* **2013**, 138 (16), 4607-4617.
 12. Spichiger-Keller, U.; Spichiger, S.; Fernández-Sánchez, J. F. Gas permeable membrane with a porous translucent membrane matrix useful for measurement of presence, partial pressure and/or concentration of gas in cultivation flask, is built on by using a metal oxide. EP1722223-A1;

WO2006119986-A1; EP1889050-A1; EP1889050-B1; DE602006005359-E; US2009199619-A1; US8114509-B2, EP1722223-A1 15 Nov 2006 G01N-033/00 200708, 2006.

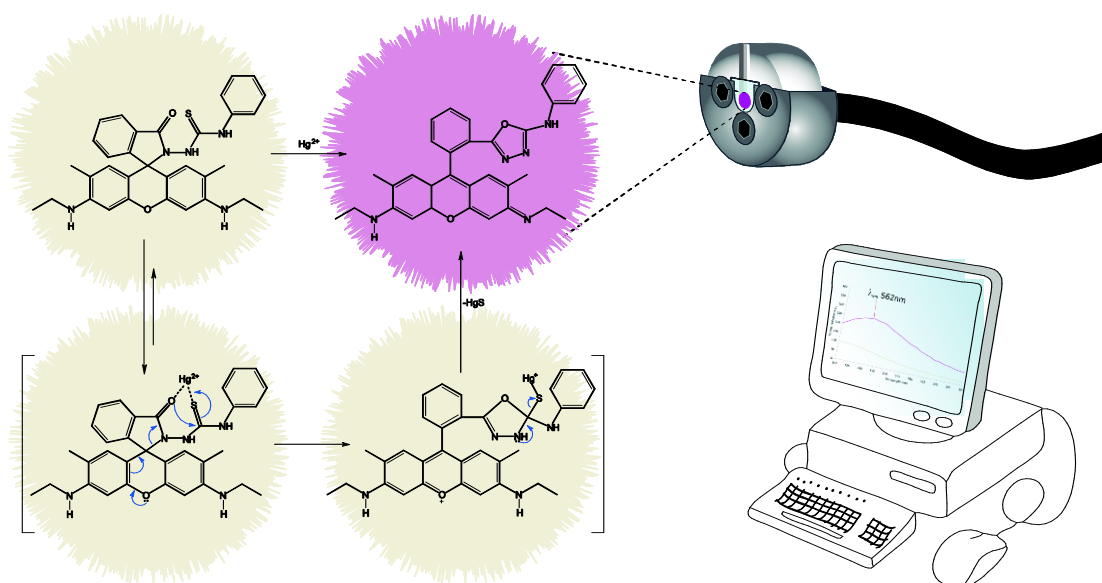
Segundo Bloque

Capítulo 3

FC1 **HEMA-co-MMA**
fluorescence **copolymer**
polymer **novel** **GPC** **monomers** **chemosensor** **sensing** **chemodosimeter** **immobilization**
Hg²⁺ **rhodamine** **6G** **ATRP**
membrane **hydrophilic** **MeHg⁺** **emission** **selective** **insoluble** **detection**
fluorophore **sensitivity** **mercury** **sensor** **luminescence** **support** **monitoring** **spirolactam** **water-insoluble** **methylmercury** **polymerization**

Capítulo 3

Hg²⁺- selective sensing film based on the incorporation of a rhodamine 6G derivative into a novel hydrophilic water-insoluble copolymer



In collaboration with:

Department of Analytical Chemistry, University of Granada, Avd. Fuentenueva s/n, 18071 Granada, Spain.

NanoMyP®, Nanomateriales y Polimeros S.L., Spin-Off company of the UGR, BIC building, Avd. Innovacion 1, E-18100, Granada, Spain.

Department of Analytical Chemistry, University of Extremadura, 06006, Badajoz, Spain.

Hg²⁺- selective sensing film based on the incorporation of a rhodamine 6G derivative into a novel hydrophilic water-insoluble copolymer

Abstract

We describe a Hg²⁺-selective sensing film based on the incorporation of a spirocyclic phenylthiosemicarbazide rhodamine 6G derivative (called FC1) into a novel hydrophilic water-insoluble copolymer synthesized by Reverse Atom Transfer Radical Polymerization. It is demonstrated that the chemodosimeter preserves its sensing ability and displays intense fluorescence in the presence of mercury (II) after being immobilized in the novel MMA-co-HEMA water insoluble linear copolymer containing 29.6% HEMA. This paper describes the synthesis and characterization of the MMA-co-HEMA copolymer, and the careful optimization of all the instrumental and experimental variables which can affect the sensitivity of the sensing film. It responds to Hg²⁺ concentrations in water between 0.9 and 12 μM , with a detection limit of 0.3 μM Hg²⁺ and the response is highly selective to mercury and methylmercury. The applicability of the sensing film has been demonstrated by analysing two real samples (tap and mineral waters) obtaining recovery percentages close to 100% with RSD lower than 5%.

1. Introduction

Mercury is considered as one of the most hazardous pollutants¹. It is widely distributed in air, water and soils through different processes², and it is present in the environment in several different forms³. Inorganic mercury can cause a wide range of diseases such as digestive, heart, kidney and especially neurological disorders³. Therefore, it is important to monitor Hg²⁺ levels in aquatic ecosystems as a potential source of contamination⁴. The United States Environmental Protection Agency (US-EPA) has set the safety level of Hg²⁺ concentration for drinking water as 10 nM (2 ng mL⁻¹)², and the European Union indicates for this ion a value of 5 nM (1 ng mL⁻¹), highlighting the necessity of developing sensitive methods for its determination⁵.

The usual methods for determining Hg²⁺ are atomic absorption spectroscopy⁶, ICP-MS⁷, CE-ICP-MS⁸, and HPLC-ICP-MS⁹. Although these methods offer good limits of detection and wide linear ranges, most of them require the use of sophisticated and high-cost instrumentation and complicated operations. In addition, they are not suitable for on-line or field monitoring, and they require long analysis time, time-consuming sample preparation and pre-concentration procedures. Therefore, in the last few years, special attention has been paid to the use of electrochemical and optical sensors for selective and sensitive routine monitoring of mercury in

water and biological samples^{4, 10}. The use of optical sensors offers potential advantages over electrochemical ones such as electrical isolation, reduced noise interference, the possibility of miniaturization and remote sensing¹¹. In addition, they are often inexpensive and can be mass-produced as disposable materials¹². Among other methods, the fluorescence-based sensors represent a simple but sensitive technique for fast control of Hg²⁺ in many samples¹³.

Generally, Hg²⁺ is known to produce fluorescence quenching when it interacts with the fluorophore, via the spin-orbit coupling effect. As a consequence, the turn-off is the usual response upon binding in most instances, and the sensors with fluorescence enhancement (turn-on response) are still rare¹. However, turn-on response is preferred due to the ubiquitous nature of fluorescence quenching, enhanced sensitivity and practical utility¹⁴.

Rhodamine derivatives have received increasing attention in the design of turn-on fluorescence chemosensors for Hg²⁺ ions^{4, 15}; they are non-fluorescent and when they interact with Hg(II) they provide the ring-opening of the corresponding spirolactam and, therefore, a strong fluorescence emission. One of these rhodamine 6G derivatives, a spirocyclic phenylthiosemicarbazide (called FC1), works as a highly selective and sensitive chemodosimeter for Hg(II) ion in water^{4, 16}. It was selected as an optimal sensitive dye in this work.

The solid support is an important component of an optical sensor¹¹. Ideally, a matrix must be permeable to mercury ions, should be structurally stable enough to withstand mechanical stress, and should increase photostability¹¹. In addition, it has to prevent the leaching and migration of chemical compounds by insulation of the dyes and has to preclude the aggregation of the dye. In this paper, a new hydrophilic water-insoluble polymer has been synthesized by Reverse Atom Transfer Radical Polymerization (ATRP) in order to immobilize FC1 by physical entrapment.

2. Experimental

2.1. Chemicals and reagents

Methyl methacrylate (MMA; Aldrich; 99%) and hydroxyethyl methacrylate (HEMA; Aldrich; 98%) were passed through a column filled with neutral alumina prior to use. m-Xylene (Fluka; 99%), dimethylsulfoxide (DMSO; Panreac; 99.9%), azobisisobutyronitrile (AIBN; Fluka; 98%), N,N,N',N'-pentamethyldiethylenetriamine (PMDETA; Sigma; 99%), CuBr₂ (Sigma; 99%), poly(vinyl chloride) (PVC, high molecular weight, Fluka), DOS (dioctyl sebacate), Nafion® perfluorinated resin solution (20 wt% containing 34% water, Aldrich) and potassium tetrakis(4-chlorophenyl)borate (KTpCIPB, Fluka, 98%) were used as received. KTpCIPB is an alkaline lipophilic salt, which was incorporated into the membrane for reasons of electroneutrality.

For the characterization of the sensing films, the following salts were used as received: CuCl₂·2H₂O (Sigma, 99%), Ag₂SO₄ (Sigma, >99%), ZnCl₂ (Panreac, 97%), CoCl₂·6H₂O (Fluka, <98%), Cd(NO₃)₂·4H₂O (Sigma, <99%) and CH₃HgCl (Fluka, <99%).

FC1 was synthesized and confirmed by ¹H NMR and ¹³C NMR following the procedure described by Bohoyo et al.⁴, based on a combination of the procedure of Yang et al.^{16b} and Dujols et al.¹⁷, following the detailed described two steps protocol¹⁸. Briefly, in a first step, to 0.4 g of rhodamine 6G dissolved in 15 mL ethanol, an excess of hydrazine hydrate (0.5 mL) was added and then the reaction solution was refluxed until the pink colour disappeared. After that, the cooled reaction solution was poured into distilled water and extracted with ethyl acetate (6 × 25 mL). The combined extracts were dried with anhydrous sodium sulphate, filtered, and then evaporated. The solvent yielded 0.48 g (92%) of rhodamine 6G hydrazide¹⁹. In a second step, rhodamine 6G hydrazide (200 mg, 0.47 mmol) in DMF (1.5 mL) was added to a solution of phenyl isothiocyanate (0.1 mL, 0.65 mmol) in DMF (1.5 mL). The reaction mixture was stirred for 6 h at room temperature. After the solvent was evaporated under reduced pressure, the crude product was column chromatographed on a silica gel (elution with hexane/EtOAc/CH₂Cl₂ = 4 : 1 : 1) to give 166 mg (67%) of FC1.

2.2. Instrumentation and apparatus

¹H NMR spectra of the polymers were obtained on a Bruker Avance 400 MHz spectrometer in CDCl₃. The molecular weights were characterized by triple detection gel permeation chromatography (GPC), using a TDA-MAX-305 OmniSEC 4.6, Malvern Instrument. The fluorescence characterization was done with a Fluorescence spectrometer, Varian Cary Eclipse, coupled with an optical fibre accessory.

A homemade cell was designed to couple the tip of the optical fibre with the sensing film. It allows to control the distance between the tip and the polymeric film. The distance was stated as 1 mm to obtain the best sensing response. Figure 1 shows pictures of the measuring system and the homemade cell.

A KDS100 syringe pump (KD Scientific, USA) was used for drop coating the polymeric cocktail. A G560E Vortex-Genie 2 mixer (Scientific Industries, Bohemia, USA) was used to obtain the polymer solution. Sonication of the solution was achieved by an Ultrasons Selecta ultrasonic bath (JP Selecta, Abrera, Spain).

A MicropH2000 Crison pHmeter (Crison Instruments, Alella, Spain) was used to adjust the pH of the employed solutions.

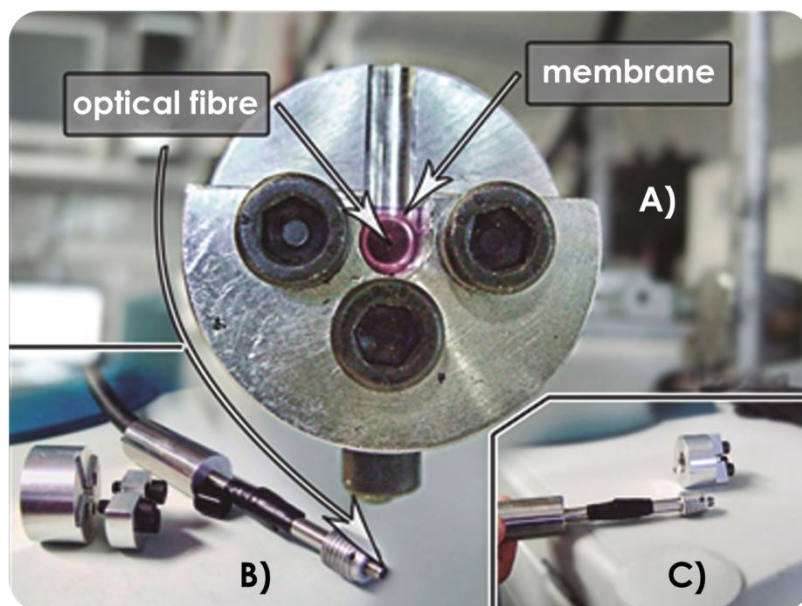


Figure 1 Photographs of the measurement device. A) home-made cell with a sensing film; B and C) Picture of the tip of the optical fibre and home-made cell.

2.3. Synthesis of the copolymers

A solution was prepared by dissolving MMA and HEMA in a mixture composed of 15 mL *m*-xylene and 15 mL DMSO and added to a 100 mL round-bottom flask which contains a $\text{CuBr}_2/\text{PMDETA}$ catalyst system. This mixture was stirred for 15 min at room temperature and then AIBN (0.27 mmol) was added into the flask which was stopped with a septum. Then, the mixture was deoxygenated bubbling nitrogen for 15 min and the solution was heated with continuous stirring. Polymerization was carried out at 80 °C for 4 h with stirring and under nitrogen atmosphere. Four copolymers with different feed molar ratios of monomers (MMA–HEMA) were synthesized. The feed molar ratios of MMA : HEMA used were: 90 : 10, 80 : 20, 70 : 30 and 60 : 40.

After polymerization, the polymer solution was diluted in an excess of acetone and the polymer was recovered by precipitation in distilled water at pH = 6.6. The polymer was purified by repeated precipitation (3 times) from acetone into distilled water at pH = 6.6. Then the polymer was dried in a vacuum at 75 °C to a constant weight. Table 1 summarises the weight and the yield for each polymer.

Table 1. Final molar percentage of MMA and HEMA in the final copolymers calculated by ¹H-NMR, yield obtained after synthesis, average molecular weight (M_w), number average molecular weight (M_n), polydispersity (M_w/M_n) and refractive index increment (d_n/d_c) of the synthesized copolymers

Name	Composition	MMA	HEMA	Yield	M_w (Da)	M_n (Da)	M_w/M_n	d_n/d_c (mL g ⁻¹)
		(mol%)	(mol%)	(wt%)				
P10	(MMA) ₁₁ -co-(HEMA) ₂	84.6	15.4	26.6	92260	52780	2.06	0.0279
P20	(MMA) ₁₆ -co-(HEMA) ₅	76.3	23.7	62.4	149430	54075	3.00	0.0299
P30	(MMA) ₁₂ -co-(HEMA) ₅	70.4	29.6	72.1	352610	132777	2.79	0.0320
P40	(MMA) ₈ -co-(HEMA) ₇	53.5	46.5	59.1	160292	62375	2.58	0.0365

2.4. Fabrication and characterization of the Hg(II)-sensing films

The optimum membrane solution was prepared by mixing thoroughly in a closed vial 266.7 mg of the polymer, 243 μ L of glycerol, 2.5 mg of FC1 and 5 mg of KTpCIPB in a mixture of solvents (8 mL acetone and 2 mL of methanol). The obtained mixture was stirred continuously with a mixer until its complete dissolution. A volume of 10 μ L of the resulting solution was drop coated on an acetate sheet at 0.2 mL min⁻¹ and room temperature. After the complete solvent evaporation, transparent, colour-less, thin and homogeneous sensing films were obtained. Three membrane replicates were made for each experimental point. Figure 2 shows a picture of the prepared sensing films.

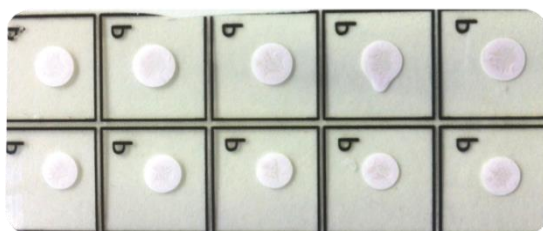


Figure 2. Photograph of the sensing films prepared by drop coating.

The luminescence measurements of the sensing films were carried out at $\lambda_{exc/em} = 540/562$ nm, which correspond with the maxima excitation and emission wavelengths (see Table 2 for the optimum instrumental and experimental variables). The sensing response ($I_x - I_0$) was considered as the difference between I_x , which corresponds with the luminescence intensity of the membrane in the presence of Hg(II), and I_0 , which is the luminescence intensity of the membrane in the absence of mercury ion. The blank solution contained the same chemical composition as the standard solution but without Hg²⁺. All the experiments were carried out in triplicate for error issues.

Table 2. Overview of the optimal membrane composition and instrumental and measurement conditions.

Instrumental conditions	Membrane composition	Measurement conditions
λ_{exc} 540 nm	Polymer 26.67 mg mL ⁻¹ P30	pH 7.0
λ_{em} 562 nm	Plasticizer 24.33 μ L mL ⁻¹ glycerol	Buffer Phosphate
Slits _{exc/em} 5/5 nm	FC1 0.25 mg mL ⁻¹	20 mM
Voltage 500 V	KTpCIPB 0.50 mg mL ⁻¹	
	Solvent 8 : 2 acetone–methanol	

2.5. Solution and samples preparation

Aqueous solutions were prepared using doubly distilled water obtained from a Milli-Q Plus 185 ultrapure water system (Millipore, Billerica, USA). Stock Hg(II) solutions were done with doubly distilled water. Stock and working standard solutions of mercury ions were stored in amber glass bottles at 4 °C.

One drinking (tap) water sample and one mineral water sample were used for demonstrating the applicability of the sensing film. After analysing the samples, it was observed that Hg(II) ion was not detected, so they were spiked at several concentration levels (see Table 3).

Table 3. Analysis of Hg²⁺ in water samples.

Sample	Hg ²⁺ added (μ M)	Hg ²⁺ detected (μ M)	Recovery percentage (%)
Tap water	1	0.99 \pm 0.04	99.0
	3	3.04 \pm 0.09	101.3
	7	6.83 \pm 0.09	97.6
Mineral water	1	0.87 \pm 0.07	87.0
	3	2.81 \pm 0.07	96.7
	7	7.52 \pm 0.07	107.4
	12	12.10 \pm 0.07	100.8

The tap water sample was previously treated to eliminate chlorine because it interferes in the determination of Hg(II). To eliminate chlorine the water samples were heated at 85 °C for 5 min and then were kept in an open flask for two-days. After that, water samples were prepared by adding up to 20 mM phosphate buffer solution at pH 7.00.

The mineral water samples were prepared by adding to the water sample up to 20 mM phosphate buffer solution at pH 7.00.

3. Results and discussion

A spirocyclic rhodamine 6G phenyl-thiosemicarbazide derivative (FC1) has been selected as a fluorescent chemodosimeter for Hg²⁺ determination, utilizing the well-known spiro-lactam (non-fluorescent) to ring opened amine (fluorescent) equilibrium of rhodamine derivatives as the recognition mechanism^{1, 4}. FC1 would undergo oxadiazole formation when the phenylthiosemicarbazide moiety is liberated by the presence of Hg²⁺,²⁰ facilitating ring opening of the spirocycle group, followed by a removal of HgS (see Figure 3).

3.1. Selection of the polymeric support

PVC plasticised with DOS (PVC-DOS) was the first polymeric support evaluated to immobilise FC1 because it has been widely used in the immobilization of rhodamine derivatives²¹. Thus several membranes based on PVC-DOS containing FC1 and KTpCIPB were prepared in THF-methanol (90 : 10 v/v) and evaluated. When the PVC-DOS sensing film was immersed in water, FC1 was lixiviated from the polymeric liquid membrane to the aqueous phase. It could be due to the highly hydrophilic character of FC1^{1, 4, 16a}. It is possible to conclude that a more hydrophilic polymer has to be used.

Nafion was secondly selected to immobilize FC1 because it is more hydrophilic than PVC. Several membranes based on Nafion containing FC1 and KTpCIPB were prepared in methanol and evaluated. The obtained membranes showed strong luminescence even in the absence of Hg²⁺. It was attributed to the strong acid pH of Nafion. The luminescence emission of FC1 in solution at pH higher than 5.0 is almost negligible, but the luminescence intensity increases greatly with decreasing pH values⁴. Thus, FC1 must be immobilised into a polymeric membrane which provides a microenvironmental pH higher than 5.0. Nafion provides an acid microenvironmental pH, thus it was also discharged.

It is possible to conclude that the polymer to immobilise FC1 should: (1) be water-insoluble but permeable to water; (2) be more hydrophilic than PVC and (3) provide a microenvironmental pH higher than 5.0. Because there are not many hydrophilic water insoluble polymers which can be chemically compatible with FC1 we decided to synthesize hydrophilic water-insoluble polymers.

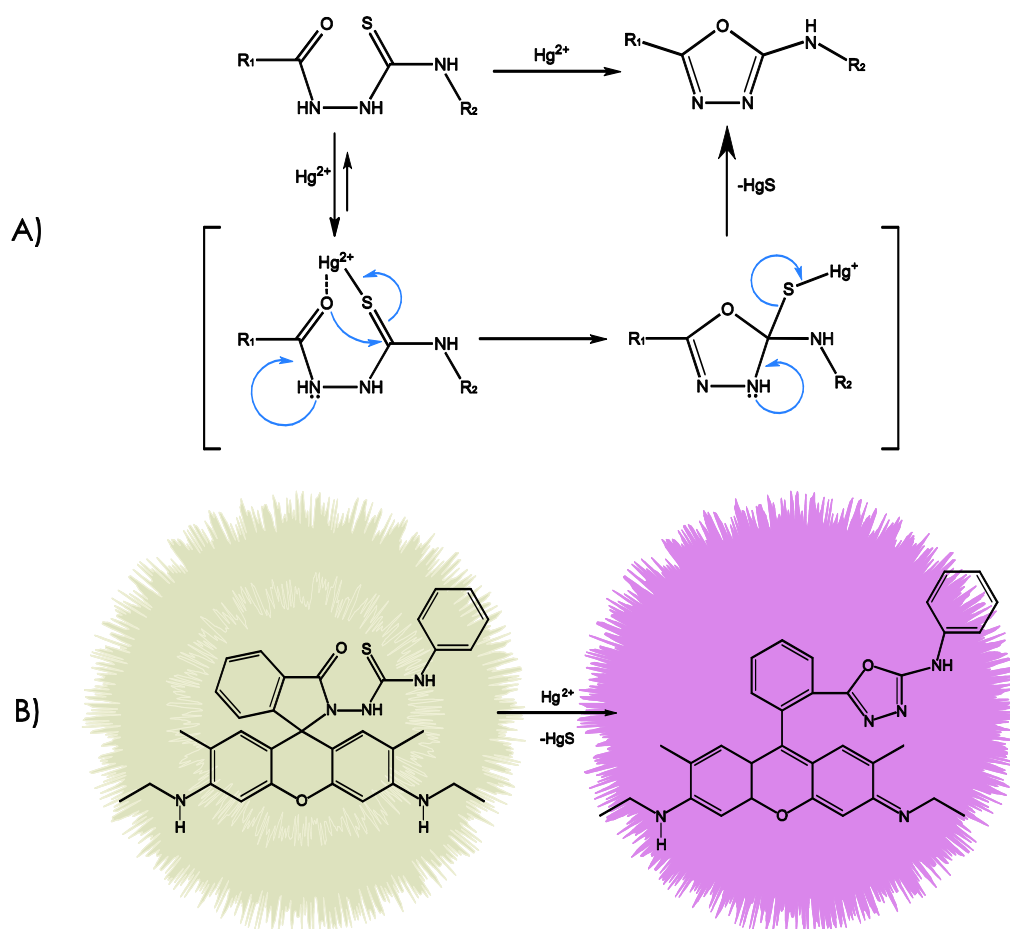


Figure 3. (A) Hg^{2+} -promoted cyclization of thiosemicarbazide to 1,3,4-oxadiazole^{16c}. (B) Scheme of the recognition mechanism.

Medina-Castillo et al.²² developed luminescent, water-insoluble, linear copolymers by Reverse Atom Transfer Radical Polymerization (ATRP) using MMA and HEMA as principal frameworks of the copolymers and fluorescein o-acrylate (FOA) as a pH-sensitive monomer. Following the same procedure but in the absence of FOA, we synthesized four MMA-co-HEMA copolymers. This methodology allows the modulation of the polarity of the polymeric support to avoid the leaching of FC1. In addition, they are water insoluble and they provide a microenvironmental pH higher than 5.0; meeting all the required properties to immobilize FC1.

These copolymers were characterized by ^1H NMR and triple detection gel permeation chromatography (GPC). ^1H NMR allows the determination of the averaged numbers of HEMA units in each copolymer by using the values of the integrals corresponding to the $\text{CH}_2\text{-CH}_2$ of the HEMA signal and to the CH_3 of the MMA signal (see Figure 4). In addition, the molecular weights: average molecular weight (M_w), number average molecular weight (M_n) and polydispersity (M_w/M_n) were analyzed by GPC. The chromatographic conditions were: N-methyl-2-pyrrolidone (NMP) as a solvent, a flow rate of 0.75 mL min^{-1} , an injection volume of $100 \mu\text{L}$, a column/detector temperature of $60 \text{ }^\circ\text{C}$ and $2 \times$ ViscoGel T6000M columns. The samples were prepared by adding about 80 mg of the material into a 20 mL glass vial with accurately weighing. 10 mL of NMP was added using a clean glass pipette. The vial was capped with a Teflon coated cap and the

samples were left to dissolve overnight at room temperature whilst shaking gently. The samples were then filtered through a 0.45 μm nylon filter. The detector alignment and instrument sensitivity parameters were previously determined using a narrow polystyrene standard. The samples were analyzed by triplicate. The final molar percentage of HEMA monomers in the synthesized copolymers and the values of molecular weights are shown in Table 1.

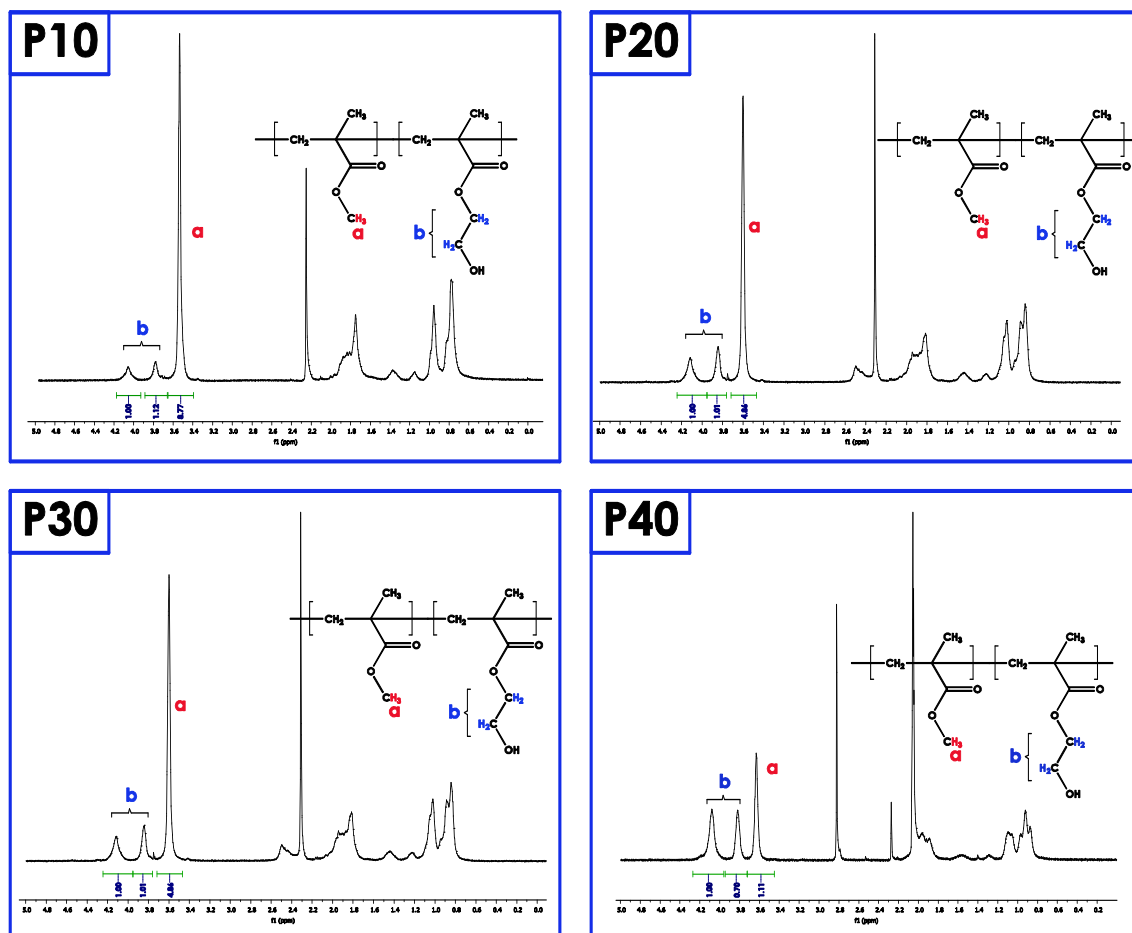


Figure 4. ¹H-NMR spectra of the synthesized polymers.

Several membranes based on these polymers containing 0.25 mg mL⁻¹ FC1 and 0.5 mg mL⁻¹ KTpCIPB were prepared in acetone–methanol (80 : 20 v/v) and evaluated. P10 provided polymeric liquid membranes with poor mechanical properties and, in addition, FC1 was precipitated into the polymeric membranes, thus P10 was discarded. P20, P30 and P40 provided membranes with good mechanical properties and the precipitation of FC1 was not observed in any of them. In addition, when they were immersed in water solutions, FC1 was not lixiviated and the prepared sensing films did not show luminescence emission. Thus, it is possible to conclude that HEMA-co-MMA polymers with an amount of HEMA higher than 23.7 mol% have the appropriate hydrophilicity and microenvironmental pH for the immobilisation of FC1. To select the best polymer they were immersed in 10 μM Hg²⁺ water solution and the sensing responses I_x/I_0 were recorded, where I_x is the luminescence intensity in the presence of Hg²⁺ and I_0 is the luminescence intensity in the absence of Hg²⁺, i.e. the blank signal. Figure 5 shows the experimental results, thus P30 (29.6 mol% HEMA) was selected as the optimum polymeric support.

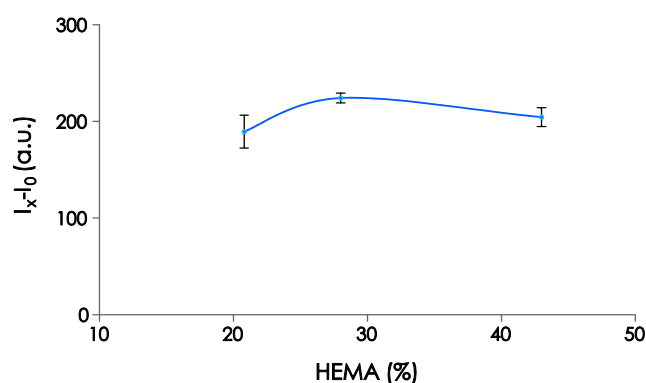


Figure 5. Effect of the percentage of HEMA in the composition of the polymer over the sensing response. See Table 2 for the optima instrumental and measurement conditions.

3.2. Optimization of the sensing film

To obtain the best sensing films for determining and quantifying Hg(II) in water, the concentration of polymer, the effect of plasticizer, the concentration of FC1 and the concentration of lipophilic salt were evaluated.

The effect of the amount of polymer used in the preparation of the sensing film was evaluated from 17 to 67 mg mL⁻¹. The experimental results are shown in Figure 6. 26.7 mg mL⁻¹ polymer was selected for the rest of the experimental work.

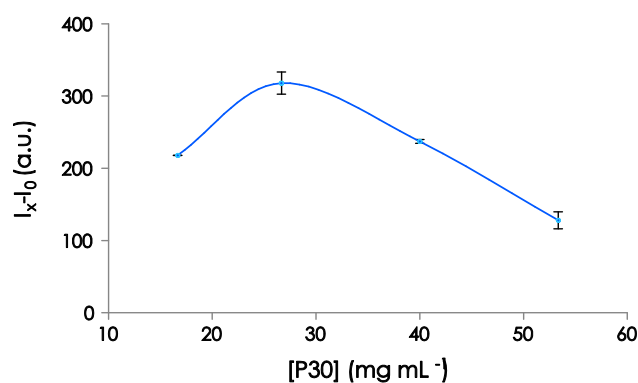


Figure 6. Effect of the concentration of polymer P30 over the sensing response. See Table 2 for the optima instrumental and measurement conditions.

Several plasticizers (ethylene glycol, octan-1-ol, butan-1-ol and glycerol) were evaluated. Glycerol provides the best sensing response. Thus, the effect of the amount of glycerol was also evaluated (see Figure 7). The maximum amount of glycerol which provides transparent membranes (50 wt% with respect to the amount of polymer) was selected for the rest of the experimental work.

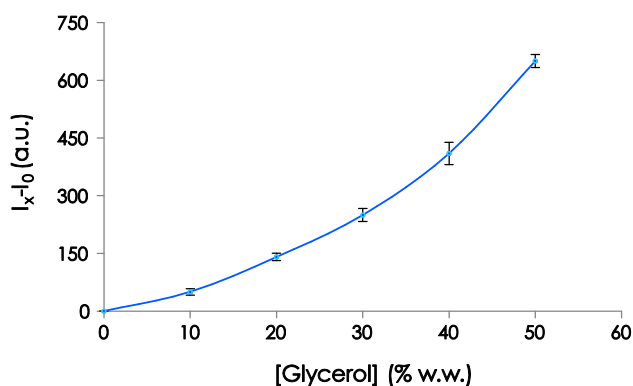


Figure 7. Effect of the concentration of glycerol over the sensing response. See Table 2 for the optima instrumental and measurement conditions.

The effect of FC1 was evaluated by varying the amount of the chemodosimeter in the polymeric film. It can be concluded that the increase of the amount of FC1 provides an increase in the fluorescence of the sensing film up to 0.25 mg mL⁻¹. Higher concentration of FC1 provides a decrease in the fluorescence of the sensing film (see Figure 8). Thus, 0.25 mg mL⁻¹ was set as optimum.

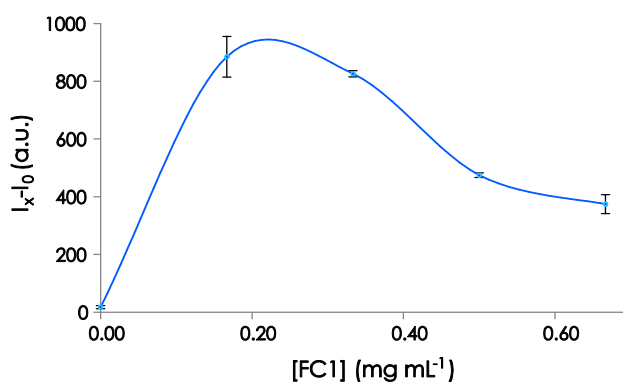


Figure 8. Effect of the concentration of FC1 over the sensing response. See Table 2 for the optima instrumental and measurement conditions.

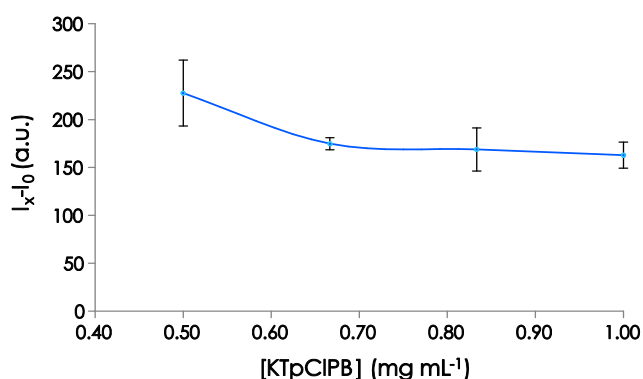


Figure 9. Effect of the concentration of KTpCIPB over the sensing response. See Table 2 for the optima instrumental and measurement conditions.

Finally, the concentration of KTpCIPB was also evaluated (see Figure 9). The optimum concentration of KTpCIPB was set as 0.5 mg mL⁻¹ as a compromise between sensitivity,

transparency and mechanical properties; membranes containing KTpCIPB concentration lower than 0.5 mg mL^{-1} were opaque (precipitation of any of the component of the cocktail) and had poor mechanical stability. Table 2 summarizes the optimal composition of the sensing film.

3.3. Optimization of the measurement conditions

To obtain the best measurement conditions for determining and quantifying Hg(II) in water, the effect of pH, kind of buffer and ionic strength of the media were evaluated.

The optimum membrane was used for detecting $5 \mu\text{M Hg}^{2+}$ in water at several pHs (4, 5, 7, 10 and 12) and the results were similar to those obtained in solution⁴. FC1 responds to Hg^{2+} in the pH range from 5.0 to 12.0, while the fluorescence of free FC1 is almost negligible. When the pH is lower than 5.0, the fluorescence enhancement also occurs in the presence of Hg^{2+} , but the fluorescence intensity of free FC1 increases greatly with decreasing pH values. The experiment shows that FC1 allows the quantification of the concentration of Hg^{2+} in a wide pH range from pH 5.0 to pH 12.0. A value of pH of 7.0 was selected as optimum for the further experiments.

In order to establish the best buffer solution to measure Hg^{2+} , 20 mM HEPES, phosphate and phthalate buffer solutions at pH 7.0 were studied (see Figure 10). The highest sensing response was obtained for phthalate buffer solution but it takes off the polymeric membrane from the inert support. Thus, phosphate was selected as buffer solution.

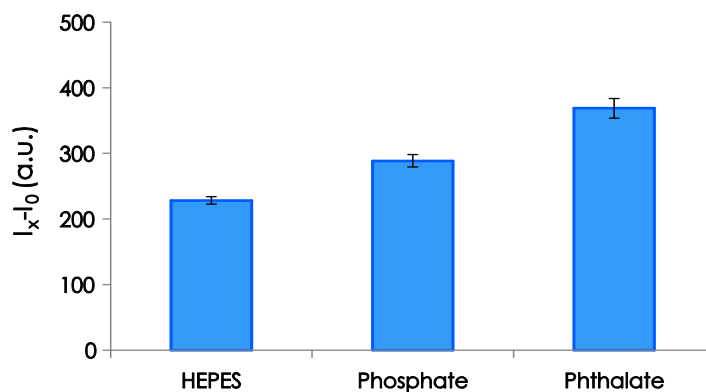


Figure 10. Effect of the kind of buffer solution over the sensing response. See Table 2 for the optimal instrumental and measurement conditions.

In order to evaluate the effect of the ionic strength, several concentrations (from 0 to 100 mM) of phosphate buffer solution were evaluated (see Figure 11). An increase in the concentration of the buffer solutions provides an increase in the sensing response up to 20 mM, and it is constant for higher concentrations. Thus 20 mM phosphate at pH 7.0 buffer solution was selected for the rest of the experimental work.

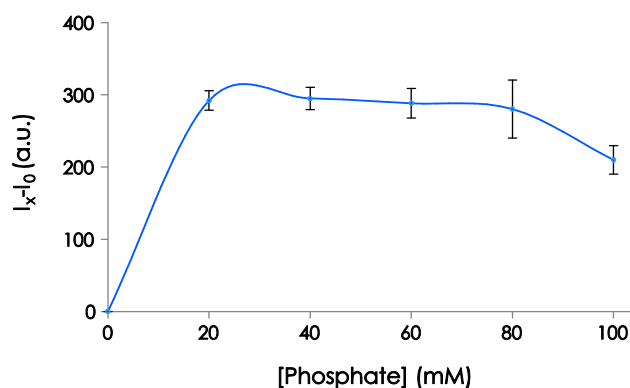


Figure 11. Effect of the concentration of phosphate buffer solution at pH 7.0 over the sensing response. See Table 2 for the optima instrumental and measurement conditions.

Table 2 summarizes the optimal conditions for measuring Hg²⁺ in water samples.

3.4. Optical properties and analytical features

Figure 12 shows the emission spectra of the optimum sensing film in the optimal measurement conditions in the presence and in the absence of mercury(II). Table 2 summarizes the optimal instrumental conditions for detecting and quantifying Hg²⁺ in water samples.

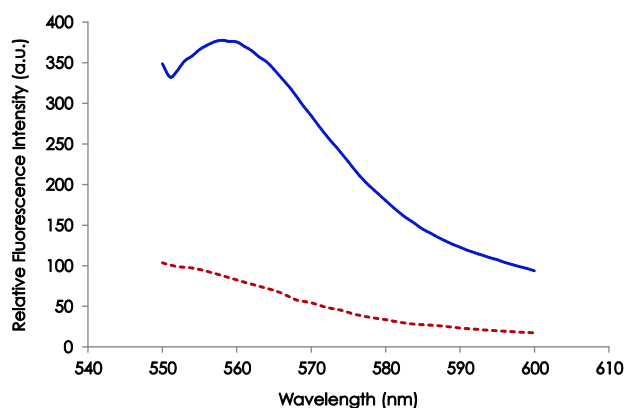


Figure 12. Emission spectra of the sensing film in the presence (—) and in the absence (---) of 1 μM Hg²⁺. See Table 2 for the optimal conditions.

The luminescence intensity of the sensing films at different concentrations of mercury(II) (see Figure 13) indicated a linear concentration range from 0.87 to 12 μM . A linear fit (sensing response = $41.712[\text{Hg}^{2+}] + 9.319$; $r^2 = 0.9934$) was obtained successfully with the experimental data, in which graphical or mathematical interpolation could be carried out inside the linear range to determine the Hg(II) concentration. Other characteristic parameters may be summarized as follows: the detection limit, calculated as the concentration of Hg(II) which produced an analytical signal three times the standard deviation of the blank signal (IUPAC

criterion), was $0.26 \mu\text{M}$, the quantification limit was $0.87 \mu\text{M}$ and the blank relative standard deviation for three replicate measurements was 6.6%.

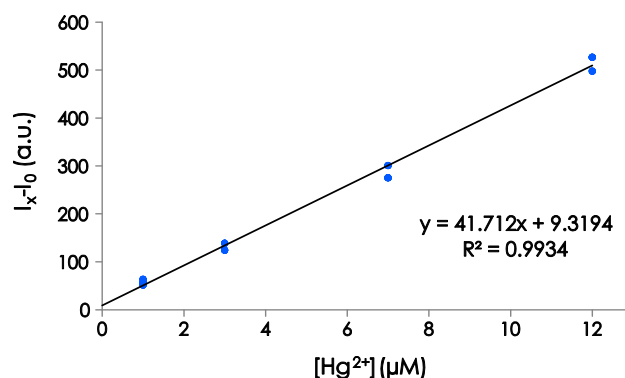


Figure 13. Calibration curve See Table 2 for the optima instrumental and measurement conditions.

3.5. Study of interferences

The selective behaviour is clearly one of the most important parameters of a membrane sensor. Six metal ions (Cu^{2+} , Zn^{2+} , Ag^+ , Pb^{2+} , Co^{2+} and Cd^{2+}) and one cation containing mercury(II) (monomethylmercury(II); MeHg^+) were selected as interfering ions in order to check the selectivity of the membrane sensor. Figure 14 shows the results of this study. It presents that Cu^{2+} , Zn^{2+} , Pb^{2+} , Co^{2+} and Cd^{2+} ions provoked negligible signals whereas Ag^+ ion provided a detectable luminescence signal with regard to the $\text{Hg}(\text{II})$ ion signal. Therefore, it can be concluded that silver(I) ion produced a small positive interference in the determination of $\text{Hg}(\text{II})$ ion. On the other hand, MeHg^+ provoked a similar signal to that of Hg^{2+} .

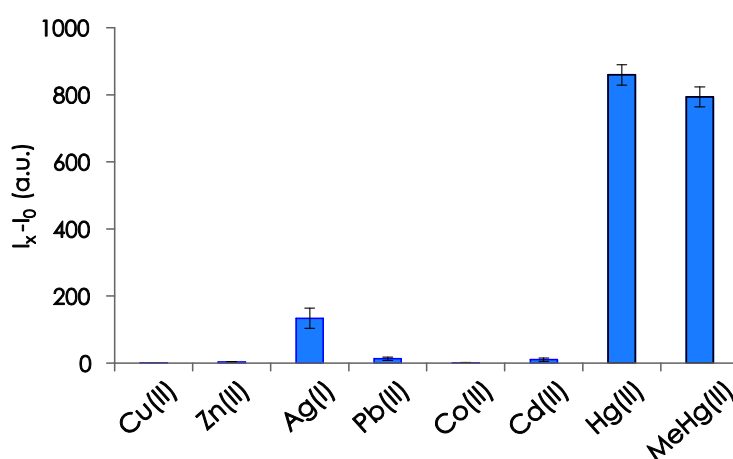


Figure 14. Interference study. [ions] = $100 \mu\text{M}$. See Table 2 for the optimal conditions.

With respect to other molecular probes, we need to point out that, although the number of examples of molecular probes reported for Hg^{2+} detection in solution is high, there are only a few examples of probes immobilized in solid supports that concern Hg^{2+} detection. In a recent paper, double hydrophilic block co-polymers bearing rhodamine B-based Hg^{2+} reactive moieties

were reported, which can serve as multifunctional chemosensors to pH, temperature and Hg²⁺ ions. The block was composed of poly(ethylene oxide)-b-poly(N-isopropylacrylamide-co-RhBHA). It was found that the detection capability was improved by elevated temperature (40 °C), and a LOD of 1.6 ng mL⁻¹ was reported, although the chemosensor was not applied to real samples²³. In a second report, novel fluorescent silica nanoparticles, formed by quantum dot SiO₂-rhodamine nanoparticles, with high selectivity towards Hg²⁺, were synthesized, and a LOD of 0.52 ng mL⁻¹ was reported, and applied to water samples²⁴. In both cases, the reported LODs are lower than the one obtained in this work. To use the developed chemosensor for Hg²⁺ determination in drinking water a pre-concentration step is necessary.

3.6. Application of the sensing film

To test the predictive ability of our sensing film, two real water samples were evaluated: one sample of tap drinking water from the city of Granada (Andalusia, Spain) and one mineral water sample commercialised in Spain. Because both samples did not contain Hg²⁺, they were spiked at several Hg(II) concentration levels (see Table 3).

The samples were prepared by following the sample preparation procedure. The sensing films were exposed to the sample and luminescence was measured at the optimal conditions (see Table 2). The results are set out in Table 3. In all cases the detection and quantification rates of the optical sensor were highly satisfactory, showing recovery percentages between 107 and 96% with relative standard deviations lower than 5%.

4. Conclusions

This paper describes an Hg²⁺-selective sensing film based on the incorporation of a spirocyclic phenylthiosemicarbazide rhodamine derivative (called FC1) into a novel hydrophilic water-insoluble copolymer synthesized by Reverse Atom Transfer Radical Polymerization.

It was demonstrated that there are not commercially available polymers for an appropriate immobilisation of this chemodosimeter. Thus, novel HEMA-co-MMA polymers had to be synthesised. It was concluded that an increase in the hydrophilicity of the polymer provides an increase in the sensitivity, determining that copolymers with an amount of HEMA higher than 23.7 mol% provided membranes with good mechanical properties, appropriate hydrophilicity and a good microenvironmental pH for the immobilisation of FC1.

The experimental results demonstrate that FC1 preserves its sensing ability, displaying intense fluorescence in the presence of mercury(II) after being immobilized in P30. It responds to Hg²⁺ concentrations in water at pH 7 (20 mM phosphate buffer) between 0.9 and 12 μM, with a detection limit of 0.3 μM Hg²⁺. Further investigation should be developed in order to improve the sensitivity; as a proposal, the use of nanotechnology could help to improve it.

The high selectivity of the sensing film has also been shown as only Ag^+ ion provided a detectable luminescence signal and MeHg^+ provoked a similar signal to that of Hg^{2+} . Therefore, the proposed sensing film could be used for the development of screening tests for detecting Hg^{2+} and MeHg^+ in water samples.

The applicability of the sensing film has been demonstrated by analysing two real samples (tap and mineral waters) with satisfactory results.

Acknowledgements

The authors are grateful to the Ministerio de Economía y Competitividad of Spain (Project CTQ2011-25388), the Junta de Andalucía (projects P07-FQM-2625 and P07-FQM-2738) and the Gobierno de Extremadura (Consolidation Project of Research Group FQM003, Project GR1003), both co-financed by European FEDER Funds.

References

1. Culzoni, M. J.; Muñoz de la Peña, A.; Machuca, A.; Goicoechea, H. C.; Babiano, R., Rhodamine and BODIPY chemodosimeters and chemosensors for the detection of Hg^{2+} , based on fluorescence enhancement effects. *Analytical Methods* **2013**, 5 (1), 30-49.
2. National Primary Drinking Water Regulations MCL booklet. *United States Environmental Protection Agency* **2009**, EPA 816-F-09-004.
3. Syversen, T.; Kaur, P., The toxicology of mercury and its compounds. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* **2012**, 26 (4), 215-226.
4. Bohoyo Gil, D.; Rodríguez-Cáceres, M. I.; Hurtado-Sánchez, M. d. C.; Muñoz de la Peña, A., Fluorescent Determination of Hg^{2+} in Water and Fish Samples Using a Chemodosimeter Based in a Rhodamine 6G Derivative and a Portable Fiber-Optic Spectrofluorimeter. *Applied Spectroscopy* **2010**, 64 (5), 520-527.
5. Council Directive 98/83/EC of 3 November 1998 on the quality of water intended for human consumption as amended by Regulations 1882/2003/EC and 596/2009/EC.
6. (a) Gao, Y.; Shi, Z.; Long, Z.; Wu, P.; Zheng, C.; Hou, X., Determination and speciation of mercury in environmental and biological samples by analytical atomic spectrometry. *Microchemical Journal* **2012**, 103 (0), 1-14; (b) Shah, A. Q.; Kazi, T. G.; Baig, J. A.; Afridi, H. I.; Arain, M. B., Simultaneously determination of methyl and inorganic mercury in fish species by cold vapour generation atomic absorption spectrometry. *Food Chemistry* **2012**, 134 (4), 2345-2349.
7. (a) Djedjibegovic, J.; Larssen, T.; Skrbo, A.; Marjanović, A.; Sober, M., Contents of cadmium, copper, mercury and lead in fish from the Neretva river (Bosnia and Herzegovina) determined by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS). *Food Chemistry* **2012**, 131 (2), 469-476; (b) Kenduzler, E.; Ates, M.; Arslan, Z.; McHenry, M.; Tchounwou, P. B., Determination of mercury in fish otoliths by cold vapor generation inductively coupled plasma mass spectrometry (CVG-ICP-MS). *Talanta* **2012**, 93 (0), 404-410.
8. Zhao, Y.; Zheng, J.; Fang, L.; Lin, Q.; Wu, Y.; Xue, Z.; Fu, F., Speciation analysis of mercury in natural water and fish samples by using capillary electrophoresis-inductively coupled plasma mass spectrometry. *Talanta* **2012**, 89 (0), 280-285.

9. (a) Jia, X.; Han, Y.; Liu, X.; Duan, T.; Chen, H., Speciation of mercury in water samples by dispersive liquid-liquid microextraction combined with high performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* **2011**, *66* (1), 88-92; (b) Rodrigues, J. L.; de Souza, S. S.; de Oliveira Souza, V. C.; Barbosa Jr, F., Methylmercury and inorganic mercury determination in blood by using liquid chromatography with inductively coupled plasma mass spectrometry and a fast sample preparation procedure. *Talanta* **2010**, *80* (3), 1158-1163.
10. (a) Alizadeh, T.; Ganjali, M. R.; Zare, M., Application of an Hg²⁺ selective imprinted polymer as a new modifying agent for the preparation of a novel highly selective and sensitive electrochemical sensor for the determination of ultratrace mercury ions. *Analytica Chimica Acta* **2011**, *689* (1), 52-59; (b) Gholivand, M. B.; Mohammadi, M.; Rofouei, M. K., Optical sensor based on 1,3-di(2-methoxyphenyl)triazene for monitoring trace amounts of mercury(II) in water samples. *Materials Science and Engineering: C* **2010**, *30* (6), 847-852; (c) Alizadeh, K.; Parooi, R.; Hashemi, P.; Rezaei, B.; Ganjali, M. R., A new Schiff's base ligand immobilized agarose membrane optical sensor for selective monitoring of mercury ion. *Journal of Hazardous Materials* **2011**, *186* (2-3), 1794-1800; (d) Sun, Z.; Jin, L.; Zhang, S.; Shi, W.; Pu, M.; Wei, M.; Evans, D. G.; Duan, X., An optical sensor based on H-acid/layered double hydroxide composite film for the selective detection of mercury ion. *Analytica Chimica Acta* **2011**, *702* (1), 95-101; (e) Meng, Q.; Zhang, X.; He, C.; Zhou, P.; Su, W.; Duan, C., A hybrid mesoporous material functionalized by 1,8-naphthalimide-base receptor and the application as chemosensor and absorbent for Hg²⁺ in water. *Talanta* **2011**, *84* (1), 53-59; (f) Sumiya, S.; Sugii, T.; Shiraishi, Y.; Hirai, T., A benzoxadiazole-thiourea conjugate as a fluorescent chemodosimeter for Hg(II) in aqueous media. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* **2011**, *219* (1), 154-158; (g) Cheng, X.; Li, S.; Zhong, A.; Qin, J.; Li, Z., New fluorescent probes for mercury(II) with simple structure. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2011**, *157* (1), 57-63.
11. Fernández-Sánchez, J. F.; Cannas, R.; Spichiger, S.; Steiger, R.; Spichiger-Keller, U. E., Optical CO₂-sensing layers for clinical application based on pH-sensitive indicators incorporated into nanoscopic metal-oxide supports. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2007**, *128* (1), 145-153.
12. Dansby-Sparks, R. N.; Jin, J.; Mechery, S. J.; Sampathkumaran, U.; Owen, T. W.; Yu, B. D.; Goswami, K.; Hong, K.; Grant, J.; Xue, Z.-L., Fluorescent-Dye-Doped Sol-Gel Sensor for Highly Sensitive Carbon Dioxide Gas Detection below Atmospheric Concentrations. *Analytical Chemistry* **2009**, *82* (2), 593-600.
13. Li, H.; Wang, L., NaYF₄:Yb³⁺/Er³⁺ nanoparticle-based upconversion luminescence resonance energy transfer sensor for mercury(II) quantification. *Analyst* **2013**, *138* (5), 1589-1595.
14. Lee, H.; Lee, H.-S.; Reibenspies, J. H.; Hancock, R. D., Mechanism of "Turn-on" Fluorescent Sensors for Mercury(II) in Solution and Its Implications for Ligand Design. *Inorganic Chemistry* **2012**, *51* (20), 10904-10915.
15. (a) Chen, X.; Pradhan, T.; Wang, F.; Kim, J. S.; Yoon, J., Fluorescent Chemosensors Based on Spiroring-Opening of Xanthenes and Related Derivatives. *Chemical Reviews* **2011**, *112* (3), 1910-1956; (b) Zhang, L.-F.; Zhao, J.-L.; Zeng, X.; Mu, L.; Jiang, X.-K.; Deng, M.; Zhang, J.-X.; Wei, G., Tuning with pH: The selectivity of a new rhodamine B derivative chemosensor for Fe³⁺ and Cu²⁺. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2011**, *160* (1), 662-669; (c) Quang, D. T.; Kim, J. S., Fluoro- and Chromogenic Chemodosimeters for Heavy Metal Ion Detection in Solution and Biospecimens. *Chemical Reviews* **2010**, *110* (10), 6280-6301; (d) Wang, H.-H.; Xue, L.; Yu, C.-L.; Qian, Y.-Y.; Jiang, H., Rhodamine-based fluorescent sensor for mercury in buffer solution and living cells. *Dyes and Pigments* **2011**, *91* (3), 350-355; (e) Ahamed, B. N.; Ghosh, P., An integrated system of pyrene and rhodamine-6G for selective colorimetric and fluorometric sensing of mercury(II). *Inorganica Chimica Acta* **2011**, *372* (1), 100-107; (f) Yan, F.; Cao, D.; Yang, N.; Yu, Q.; Wang, M.; Chen, L., A selective turn-on fluorescent chemosensor based on rhodamine for Hg²⁺ and its application in live cell imaging. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2012**, *162* (1), 313-320; (g) Kim, H.;

- Kim, S.-H.; Lee, D.-H.; Son, Y.-A., Design and synthesis of novel chemosensor based on rhodamine 6G monitoring heavy metal ions. *Supramolecular Chemistry* **2012**, 25 (2), 87-91.
16. (a) Lozano, V. A.; Escandar, G. M.; Mahedero, M. C.; Muñoz de la Peña, A., A novel nylon membrane-rhodamine 6G spirocyclic phenylthiosemicarbazide derivative system as a fluorimetric probe for mercury(II) ion. *Analytical Methods* **2012**, 4 (7), 2002-2008; (b) Yang, Y.-K.; Yook, K.-J.; Tae, J., A Rhodamine-Based Fluorescent and Colorimetric Chemodosimeter for the Rapid Detection of Hg²⁺ Ions in Aqueous Media. *Journal of the American Chemical Society* **2005**, 127 (48), 16760-16761; (c) Ko, S.-K.; Yang, Y.-K.; Tae, J.; Shin, I., In Vivo Monitoring of Mercury Ions Using a Rhodamine-Based Molecular Probe. *Journal of the American Chemical Society* **2006**, 128 (43), 14150-14155.
17. Dujols, V.; Ford, F.; Czarnik, A. W., A Long-Wavelength Fluorescent Chemodosimeter Selective for Cu(II) Ion in Water. *Journal of the American Chemical Society* **1997**, 119 (31), 7386-7387.
18. Yang, Y.-K.; Ko, S.-K.; Shin, I.; Tae, J., Synthesis of a highly metal-selective rhodamine-based probe and its use for the in vivo monitoring of mercury. *Nat. Protocols* **2007**, 2 (7), 1740-1745.
19. Yang, X.-F.; Guo, X.-Q.; Zhao, Y.-B., Development of a novel rhodamine-type fluorescent probe to determine peroxynitrite. *Talanta* **2002**, 57 (5), 883-890.
20. (a) Wang, X.; Li, Z.; Wei, B.; Yang, J., Synthesis of 2-(4-Methoxyphenyloxy-acetylamido)-5-aryloxymethyl-1,3,4-oxadiazoles under microwave irradiation *Synthetic Communications* **2002**, 32 (7), 1097-1103; (b) Zou, X.; Jin, G., Synthesis of pyridazinone-substituted 1,3,4-thiadiazoles, -1,3,4-oxadiazoles and -1,2,4-triazoles. *Journal of Heterocyclic Chemistry* **2001**, 38 (4), 993-996.
21. (a) Meng, Q.; He, C.; Su, W.; Zhang, X.; Duan, C., A new rhodamine-chitosan fluorescent material for the selective detection of Hg²⁺ in living cells and efficient adsorption of Hg²⁺ in natural water. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2012**, 174 (0), 312-317; (b) Dhanya, S.; Joy, J.; Rao, T. P., Fabrication and characterization of rhodamine 6G entrapped sol-gel film test strip for virtually specific and sensitive sensing of nitrite. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2012**, 173 (0), 510-516.
22. Medina-Castillo, A. L.; Fernández-Sánchez, J. F.; Segura-Carretero, A.; Fernández-Gutiérrez, A., Design and synthesis by ATRP of novel, water-insoluble, lineal copolymers and their application in the development of fluorescent and pH-sensing nanofibres made by electrospinning. *Journal of Materials Chemistry* **2011**, 21 (18), 6742-6750.
23. Hu, J.; Li, C.; Liu, S., Hg²⁺-Reactive Double Hydrophilic Block Copolymer Assemblies as Novel Multifunctional Fluorescent Probes with Improved Performance. *Langmuir* **2009**, 26 (2), 724-729.
24. Liu, H.; Yu, P.; Du, D.; He, C.; Qiu, B.; Chen, X.; Chen, G., Rhodamine-based ratiometric fluorescence sensing for the detection of mercury(II) in aqueous solution. *Talanta* **2010**, 81 (1-2), 433-437.

Capítulo 4

A word cloud of scientific terms related to microfiber-based Hg²⁺ sensing. The most prominent words are 'microfibre', 'electrospinning', 'sensing', and 'nonwoven'. Other significant terms include 'Hg²⁺-selective', 'mat', 'nanotechnology', 'FC1', 'polymeric blends', 'fluorescence', 'detection', 'sensitivity', 'selectivity', 'homogeneous', 'response', 'emission', 'mechanical', 'chemodosimeter', 'Hg²⁺-sensing', 'insoluble', 'Polym-B2', 'Polym-B1', 'Polym-B3', 'novel', 'film', 'polymer', 'immobilised', 'sensor', 'signal', 'analysis', 'consistency', 'spirocyclic', 'support', 'incorporation', 'MeHg⁺', 'materials', 'hydrophilic', 'flexibility', 'encapsulation', 'rhodamine 6G', 'luminescence', 'intensity', 'strength', and 'homogeneous'.

luminescence **microfibre** polymeric blends
flexibility hydrophilic fluorescence incorporation
encapsulation detection rhodamine 6G **electrospinning** MeHg⁺
sensitivity **Hg²⁺-selective** novel Polym-B3 materials
selectivity **sensing** support film polymer
nonwoven analysis consistency spirocyclic sensor immobilised
homogeneous **mat** **Hg²⁺** Polym-B2 insoluble **FC1** **Hg²⁺-sensing**
response fibre emission
intensity Polym-B1 mechanical
strength chemodosimeter
nanotechnology

Capítulo 4

A sensing microfibre mat produced by electrospinning for the turn-on luminescence determination of Hg²⁺ in water samples

In collaboration with:

Department of Analytical Chemistry, University of Granada, Avd. Fuentenueva s/n, 18071 Granada, Spain.

NanoMyP®, Nanomateriales y Polimeros S.L., Spin-Off company of the UGR, BIC building, Avd. Innovacion 1, E-18100, Granada, Spain.

Department of Analytical Chemistry, University of Extremadura, 06006, Badajoz, Spain.

A sensing microfibre mat produced by electrospinning for the turn-on luminescence determination of Hg²⁺ in water samples

Abstract

A novel turn-on fluorescent microfibre mat with high selectivity towards Hg²⁺ has been prepared for determining and quantifying Hg²⁺ in water samples. It is based on the use of electrospinning for encapsulating a spirocyclic Rhodamine 6G phenyl-thiosemicarbazide derivative (called FC1) into polymeric microfibrils and the well-known spirolactam (non fluorescent) to ring opened amine (fluorescent) equilibrium of Rhodamine derivatives as recognition mechanism. The fluorescence intensity was proportional to Hg²⁺ concentration in a linear range from 0.4 to 4.0 μM with a detection limit (S/N = 3) of 0.1 μM.

Keywords: Optical sensor, Hg²⁺, Water analysis, Electrospinning, Rhodamine derivative.

1. Introduction

Mercury is considered as one of the most hazardous pollutants¹. It is widely distributed in air, water and soils through different processes², and it is present in the environment in several different forms³. Inorganic mercury can cause a wide range of diseases such as digestive, heart, kidney and especially neurological disorders³. Therefore, it is important to monitor Hg²⁺ levels in aquatic ecosystems as a potential source of contamination⁴.

Recently, the usual methods for determining Hg²⁺ and the necessity to develop chemical sensors for determining and quantifying Hg²⁺ in water samples have been pointed out by our research group⁵. The use of optical sensors offers potential advantages over electrochemical ones such as, electrical isolation, reduced noise interference, the possibility of miniaturisation and remote sensing⁶. In addition, they are often inexpensive and can be mass-produced as disposable materials⁷. Among other methods, the fluorescence-based sensors represent a simple but sensitive technique for fast controlling Hg²⁺ in many samples^{5, 8} and turn-on responses are preferred due to the ubiquitous nature of fluorescence quenching, enhanced sensitivity and practical utility⁹.

Although the number of examples of molecular probes reported for Hg²⁺ in solution is high, there are only few examples of probes immobilised in solid supports that concern Hg²⁺ detection. Hu et al.¹⁰ proposed a double hydrophilic block co-polymer, composed of poly(ethylene oxide)-b-poly(N-isopropylacrylamide-co-RhBHA) bearing Rhodamine B-based Hg²⁺

reactive moieties, as multifunctional chemosensors to pH, temperature and Hg^{2+} ions. This optical sensor showed a detection limit of 1.6 ng mL^{-1} but the running temperature is high ($40 \text{ }^\circ\text{C}$), obstructing its easy applicability to real samples. Liu et al.¹¹ proposed novel fluorescent silica nanoparticles, formed by quantum dot SiO_2 -Rhodamine nanoparticles, with high selectivity towards Hg^{2+} and with a detection limit of 0.52 ng mL^{-1} which is excellent for analysing Hg^{2+} in drinking water, but it is a complex and expensive system from an industrial point of view.

To solve these inconveniences, Orriach-Fernández et al.⁵ proposed the use of a spirocyclic phenylthiosemicarbazide Rhodamine 6G derivative (called FC1) immobilised into poly(2-hydroxyethyl methacrylate-co-methyl methacrylate), providing a highly selective chemosensor for Hg^{2+} ion in water. It works at room temperature and the production is simple and cheaper, but its sensitivity is not so good (LOD of $0.3 \text{ } \mu\text{M}$). In this report the authors proposed the use of pre-concentration steps, which are time-consuming, or the use of nanotechnology for improving it.

Electrospinning is a highly versatile method to process solutions or melts, mainly of polymers, into continuous fibres with diameters ranging from few nanometers to few micrometers. Electrospinning fundamentals are reviewed in several extensive articles¹² and books¹³. The resulting fibres are characterised by their large surface areas and they are being successfully incorporated in multitude of different areas¹⁴ such as: sensors¹⁵, filters and selective removal, tissue engineering, batteries, smart textiles, catalysis, self-cleaning, composites, cosmetics and pharmaceuticals, but always in applications where high value products are needed. The effort for commercialising fibre based products is supported by many companies which have come out with different strategies for the up-scaling of the electrospinning technique¹³.

In this work, we proposed the encapsulation of the FC1 chemodosimeter into microfibre nonwoven mats produced by electrospinning in order to improve its sensitivity, allowing the development of an optical sensing mat that meets the discharge limit for industrial wastewater according to the U.S. EPA standard¹⁶ and the China SA standard¹⁷.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals and reagents

Polymeric hydrophilic blends Polym-B1, Polym-B2 and Polym-B3 with average molecular weights higher than 400 kDa and with different % of hydroxyl monomers in the polymeric chains: Polym-B1 < Polym-B2 < Polym-B3 (nanoMyP®, Granada, Spain, www.nanomyp.com; 99%), DMF (Panreac, Barcelona, Spain; HPLC-grade), glycerol (Scharlau, Barcelona, Spain; 86–88%), and potassium tetrakis(4-chlorophenyl)borate (KTpClPB, Fluka, Madrid, Spain; 98%) were used as received. KTpClPB is an alkaline lipophilic salt, which was incorporated into the membrane for reasons of electroneutrality.

For the characterisation of the sensing films, the following salts were used as received: HgCl₂ (Sigma, Madrid, Spain; >99.5%), Ag₂SO₄ (Sigma, Madrid, Spain; >99%), Pb(NO₃)₂ (Panreac, Barcelona, Spain; 97%), Cd(NO₃)₂·4H₂O (Sigma, Madrid, Spain; <99%) and CH₃HgCl (Fluka, Madrid, Spain; <99%).

FC1 was synthesised following the procedure described by Bohoyo et al.⁴, based in a combination of the procedure of Yang et al.¹⁸ and Dujols et al.¹⁹, following the detailed described two steps protocol^{5, 20}. Briefly, in a first step, to 0.4 g of Rhodamine 6G dissolved in 15 mL of ethanol, an excess of hydrazine hydrate (0.5 mL) was added and then the reaction solution was refluxed until the pink colour disappeared. After that, the cooled reaction solution was poured into distilled water and extracted with ethyl acetate (6 × 25 mL). The combined extracts were dried with anhydrous sodium sulphate, filtered, and then evaporated. The solvent yielded 0.48 g (92%) of Rhodamine 6G hydrazide. In a second step, the Rhodamine 6G hydrazide (200 mg, 0.47 mmol) in DMF (1.5 mL) was added to a solution of phenyl isothiocyanate (0.1 mL, 0.65 mmol) in DMF (1.5 mL). The reaction mixture was stirred for 6 h at room temperature. After the solvent was evaporated under reduced pressure, the crude product was column chromatographed on silica gel (elution with hexane/EtOAc/CH₂Cl₂ = 4:1:1) to give 166 mg (67%) of FC1.

2.2. Instrumentation and apparatus

The fluorescence characterisation was developed with a Fluorescence spectrometer Varian Cary Eclipse (Agilent Technologies Inc., Loveland, CO, USA) coupled with an optical fibre accessory and a fibre optic probe (Agilent Technologies Inc., Loveland, CO, USA).

A homemade cell was designed to couple the tip of the optical fibre with the sensing film. It is equipped with a support with a metrical screw to regulate the distance between the solid phase and the optical fibre which transports and collects the light from the spectrometer to the sample and vice versa. The optimal distance between optical fibre and the sensing mat was 1 mm. Figure 1 shows pictures of the measuring system and the homemade cell. The fibre optical probe consists on a perpendicular end. It is well-known that it is not the best optical architecture to be used in fluorescence²¹ but this is just a preliminary set-up to analyse the sensing nanofibre mat. Therefore, its analytical figures of merit could be improved by optimising the optical architecture of the sensor.

Commercial electrospinning equipment, Electrospinner 2.2.D-500 (Yflow S.L., Malaga, Spain), was employed to fabricate the nonwoven mats.

MicropH2000 Crison pHmeter (Crison Instruments, Alella, Spain) was used to adjust the pH of the employed solutions.

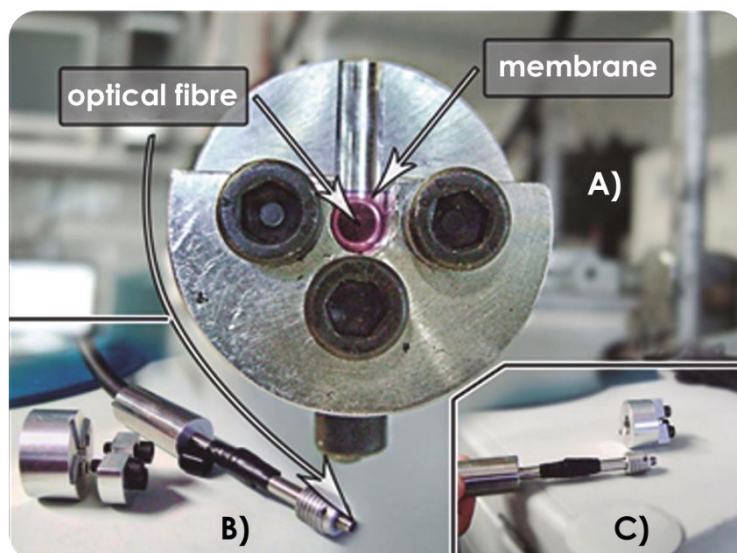


Figure 1. Photographs of the measurement device. A) home-made cell with a sensing film; B and C) Picture of the tip of the optical fibre and home-made cell.

2.3. Fabrication and characterisation of Hg(II)-sensitive microfibre mats

Table 1 shows the cocktail solutions used for producing the Hg²⁺-sensitive fibre mats. They were loaded into 5 ml Teflon syringes (Norm-Ject® HSW) and extruded through a stainless steel capillary tube with outer and inner diameters of 1.5 mm and 1.1 mm, respectively. Table 2 shows the working parameters of the electrospinning process. The flow rates and voltages were selected in order to allow the collection of dry fibres in nonwoven mats. In all cases, the process was run to collect 20 cm diameter rounded mats of microfibrils onto a flat static collector. Then, they were dried in a vacuum oven at room temperature during 12 hours to remove any residual solvent. Figure 2 shows pictures of the processed mats.

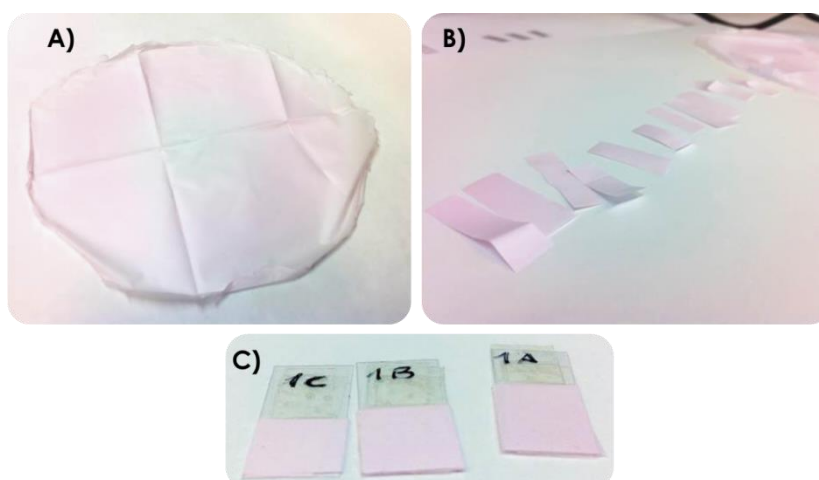


Figure 2. Pictures of the A) processed mat, B) pieces of 2 cm² of nanofibre mat, C) final disposition of the nonwoven mat fixed in a 1 x 2 cm thin layer of polyethylene terephthalate (PET).

Table 1. Composition of the cocktails for obtaining the nonwoven mats.

Name	Polymeric Blend (g)	Glycerol (mg)	FC1 (mg)	KTpCIPB (mg)	DMF (g)	
NWM-B1	B1	1.12	0	9.5	18.5	6.3
NWM-B2	B2	1.12	0	9.5	18.5	6.3
NWM-B3	B3	1.12	0	9.5	18.5	6.3
NWM-G1	B3	1.12	0	9.5	18.5	6.3
NWM-G2	B3	1.12	57	9.5	18.5	6.3
NWM-G3	B3	1.12	100	9.5	18.5	6.3
NWM-G4	B3	1.12	156	9.5	18.5	6.3
NWM-F1	B3	1.12	76	4.8	18.5	6.3
NWM-F2	B3	1.12	76	7.2	18.5	6.3
NWM-F3	B3	1.12	76	9.5	18.5	6.3
NWM-F4	B3	1.12	76	14.5	18.5	6.3
NWM-K1	B3	1.12	76	9.5	13.2	6.3
NWM-K2	B3	1.12	76	9.5	18.5	6.3
NWM-K3	B3	1.12	76	9.5	22.8	6.3

Table 2. Working parameters for the electrospinning process.

Name	Flow rate (mL · h ⁻¹)	Injector voltage (kV)	Collector voltage (kV)	Distance between electrodes (cm)	Operation time (h)
NWM-B1	0.5	8.0	-3.2	34	2.0
NWM-B2	0.5	5.8	-3.2	20	2.0
NWM-B3	0.5	8.5	-3.2	34	2.0
NWM-G1	0.5	8.5	-3.2	34	2.0
NWM-G2	0.5	8.0	-3.2	34	2.0
NWM-G3	0.5	8.0	-3.2	34	2.0
NWM-G4	0.5	8.0	-3.2	34	2.0
NWM-F1	0.5	6.5	-3.2	20	2.0
NWM-F2	0.5	6.5	-3.2	20	2.0
NWM-F3	0.5	6.0	-3.2	20	2.0
NWM-F4	0.5	6.0	-3.2	34	2.0
NWM-K1	0.5	6.5	-3.2	20	2.0
NWM-K2	0.5	6.0	-3.2	20	2.0
NWM-K3	0.5	8.0	-3.2	20	2.0
NWM-T1	0.5	6.0	-3.2	20	0.5
NWM-T2	0.5	6.0	-3.2	20	1.0
NWM-T3	0.5	6.0	-3.2	20	2.0
NWM-T4	0.5	6.0	-3.2	20	3.0

For fluorescence characterisation, 2 cm² of microfibre mat was cut and fixed in a 1 cm × 2 cm thin layer of polyethylene terephthalate (PET). The luminescence measurements of the sensing mats were developed at $\lambda_{exc/em} = 540/562$ nm, excitation and emission slit widths of 5/5 nm and at two detector voltages, 550 and 500 V. The sensing response ($I_x - I_0$) was considered as the difference between I_x , which corresponds with the luminescence intensity of the membrane in the presence of Hg²⁺, and I_0 , which is the luminescence intensity of the membrane in absence of Hg²⁺; the membranes were submerged into each solution during 15 min. The blank solution contained the same chemical composition than the standard solution but without Hg²⁺. All the experiments were carried out in triplicate for error estimation.

2.4. Solution and samples preparation

Aqueous solutions were prepared using doubly distilled water obtained from a Milli-Q Plus 185 ultrapure water system (Millipore, Billerica, USA). Stock Hg²⁺ solutions were done with doubly distilled water. Stock and working standard solutions of Hg²⁺ were stored in amber glass bottles at 4 °C.

One drinking (tap) and one mineral water samples were used for demonstrating the applicability of the sensing mat. After analysing the samples, it was observed that Hg²⁺ ion was not detected, so they were spiked at 1 and 4 μ M Hg²⁺ concentrations.

The tap water sample was previously treated to eliminate the chlorine because it interferes in the determination of Hg²⁺. To eliminate chlorine the water samples were heated at 85 °C during 5 min and then were kept in an open flask during two-days⁵. After that, water samples were prepared by adding up to 20 mM phosphate buffer solution at pH 7.00.

The mineral water samples were prepared by adding to the water sample up to 20 mM phosphate buffer solution at pH 7.00.

3. Results and discussion

3.1. Selection of the polymeric support

As it was demonstrated by Orriach-Fernández et al.⁵, the polymer to immobilise FC1 has to be (1) water-insoluble but hydrophilic, with a good water absorption capacity; and (2) it should provide a microenvironmental pH higher than 5.0 because the FC1 is degraded at pH below 5⁴. In addition, the molecular weight of the polymer should be high enough to avoid the use of any binder that supports the electrospinnability of the polymeric cocktail.

Polymeric blends Polym-B1, Polym-B2 and Polym-B3 have all of these features. They are insoluble in water and in hydrophobic solvents such as toluene, n-hexane, vegetal oil, n-octanol, etc., but soluble (30–40%, w/w) in organic solvents (DMF, DMSO, THF, etc.) at high concentration (25–30%, w/w). These blends have hydrophilic properties and thus a high capacity of water absorption: $Q = 2$ ($Q = \text{mass of absorbed water}/\text{mass of polymeric material}$), its microenvironmental pH is higher than 5.0, and the molecular weights of the copolymers that form these blends are higher than 400 kDa. Therefore, they were selected as polymeric support to immobilise FC1.

To select the best polymeric support, several microfibre mats (NWM-B1, NWM-B2 and NWM-B3) were prepared by varying the polymeric blends, i.e. the amount of OH groups; see Table 1 and Table 2 for composition and electrospinning conditions, respectively. The three tested polymeric blends provide microfibre mats with very high specific surfaces, excellent mechanical properties (easily manipulated, high mechanical strength, high consistency and high flexibility), and they have an adequate hydrophilic/hydrophobic balance to avoid the lixiviation of FC1. In addition, the precipitation of FC1 was not observed in any of them, and when they were immersed in free- Hg^{2+} water, FC1 was not lixiviated and none of them showed luminescence emission. Therefore, it is possible to conclude that polymeric blends Polym-B1, Polym-B2 and Polym-B3 have the appropriate properties to develop microfibre mats with excellent mechanical properties and adequate physicochemical properties for the immobilisation of FC1.

To analyse the sensitivity to Hg^{2+} , they were immersed in $1 \mu\text{M}$ Hg^{2+} water solution during 15 min and the sensing responses $I_x - I_0$ were recorded; where I_x is the luminescence intensity in the presence of Hg^{2+} and I_0 is the luminescence emission in absence of Hg^{2+} . Figure 3 shows the experimental results. It is possible to conclude that the amount of OH groups in the polymeric structure does not affect the sensing response but affect the reproducibility (error) of the measurement. It is well known that the increasing of the OH-groups increases the hydrophilicity of the cocktail, and therefore the conductivity is also increased. The increase of conductivity provides a decrease of the whipping and delivers more homogeneous microfibre mats. Thus polymeric blend Polym-B3 was selected as optimum polymeric support.

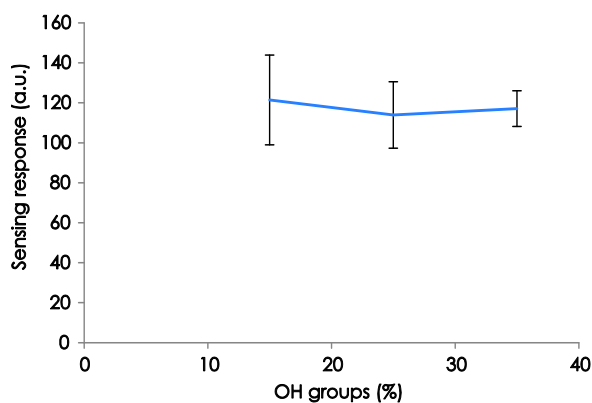


Figure 3. Effect of the amount of OH group in the polymeric structure.

3.2. Effect of plasticiser

Our research group⁵ tested the effect of several plasticisers over the sensing response of FC1 solubilised into MMA-co-HEMA. They determined that glycerol (50 wt%) provided the best analytical signal. In order to test the effect of glycerol in our system, several microfibre mats with amounts of glycerol up to 15 wt% (NWM-G1, NWM-G2, NWM-G3 and NWM-G4) were prepared; see Table 1 and Table 2 for composition and electrospinning conditions, respectively.

The experimental results (see Figure 4) show that the amount of glycerol does not affect the sensing response between 0 and 15 wt% unlike what appears in literature for classical polymeric sensing films. It could be due to the microfibre structure of the proposed mats. In the classical polymeric sensing films glycerol should act increasing the diffusion of Hg^{2+} into the polymeric membrane, but in this case, due to the microstructure nature of the fibre mats, this diffusion is faster. Thus, the sensing response is not affected by the presence of glycerol. It is corroborated with the decreasing in the response time of the proposed microfibre mats compared with the classical membranes (see below).

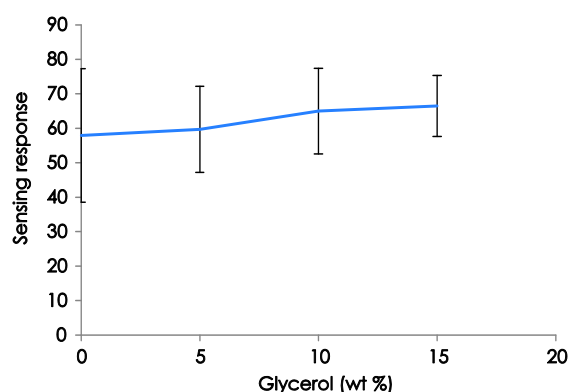


Figure 4. Effect of the concentration of glycerol.

On the other hand, it was determined that the addition of glycerol affects the electrospinning procedure. The incorporation of glycerol provides a more stable and reproducible Taylor cone which provides more homogeneous fibre mats and therefore, the error in the Hg^{2+} determination is decreased. 8 wt% of glycerol was selected for the rest of the experimental work.

3.3. Effect of the concentration of FC1 and lipophilic salt

To test the effect of the concentration of FC1, several microfibre mats containing 0.50, 0.75, 1.00 and 1.5 wt% FC1 (NWM-F1, NWM-F2, NWM-F3 and NWM-F4, respectively) were prepared and evaluated at three levels of concentration (0.5, 1.0 and 4.0 μM Hg^{2+}); see Table 1 and Table 2 for composition and electrospinning conditions, respectively.

Figure 5 shows the normalised experimental results and Figure 6 shows the real signal measurements. It is possible to conclude that the optimum concentration of FC1 into de nonwoven mat should be set attending to a requested Hg^{2+} concentration: if the Hg^{2+} concentration is $0.5 \mu\text{M}$ the optimum concentration of FC1 is $1.0 \text{ wt}\%$ while if the concentration of Hg^{2+} is $4.0 \mu\text{M}$ the optimum FC1 concentration is $0.5 \text{ wt}\%$. The main aim of the work is to increase the sensitivity of the luminescent dye, thus, $1.0 \text{ wt}\%$ was selected as optimum.

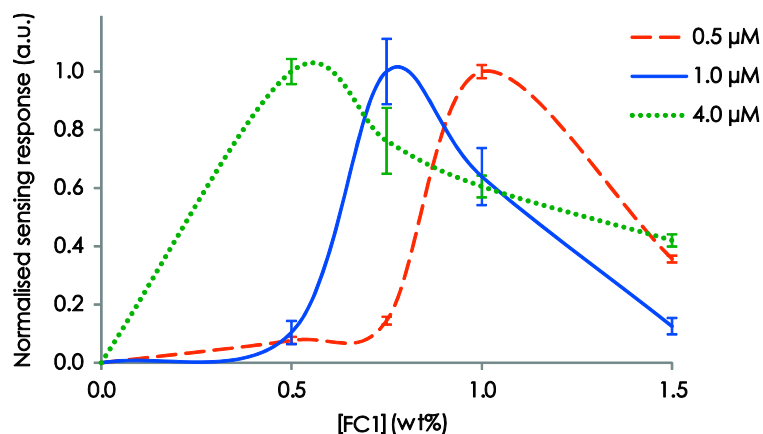


Figure 5. Effect of the concentration of FC1 on the sensing response at different concentrations of Hg^{2+} . The signals have normalised for an easier comparison; see Figure 6 for real values. $\lambda_{\text{exc/em}} = 540/562 \text{ nm}$, excitation and emission slit widths of $5/5 \text{ nm}$, detector voltages of 550 V for $0.5 \mu\text{M-Hg}^{2+}$ and 500 V for 1.0 and $4.0 \mu\text{M}$; exposition time 15 min .

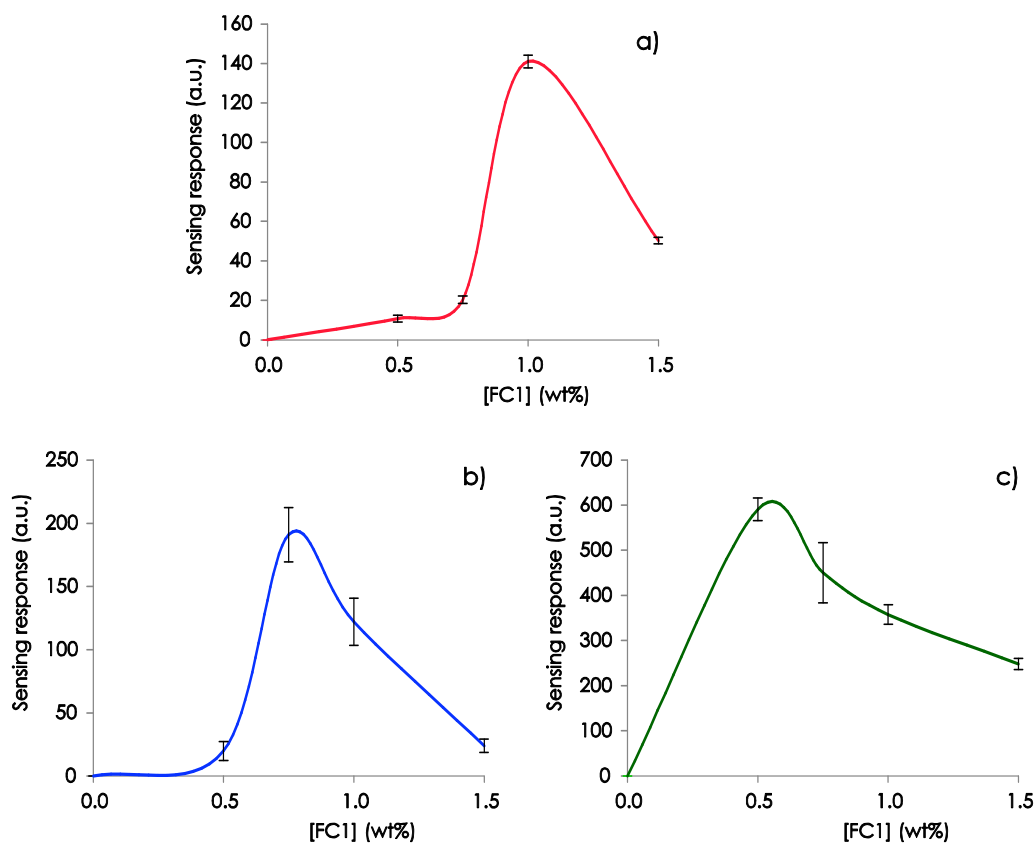


Figure 6. Effect of the concentration of FC1 at several concentration of Hg^{2+} : a) $0.5 \mu\text{M}$, b) $1.0 \mu\text{M}$ and c) $4.0 \mu\text{M}$.

To test the effect of the concentration of the lipophilic salt, several microfibre mats with different amounts of KTpCIPB (NWM-K1, NWM-K2 and NWM-K3) were prepared and evaluated; see Table 1 and Table 2 for composition and electrospinning conditions, respectively. The experimental results (see Figure 7) show that the best sensing response was obtained when the concentration of KTpCIPB was 2.0 wt%, thus it was set for the rest of the experimental work.

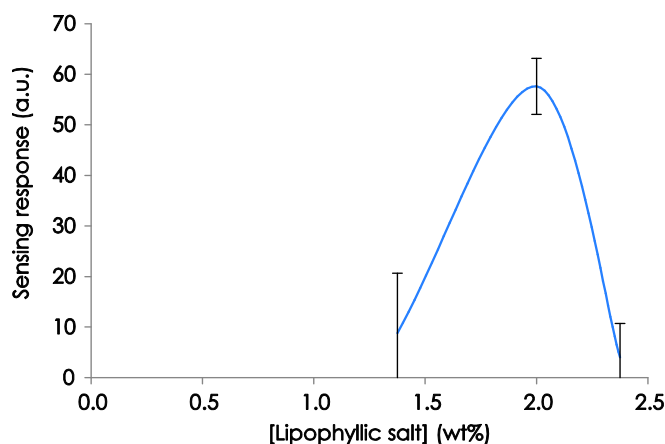


Figure 7. Effect of the concentration of lipophilic salt.

3.4. Effect of the mat thickness

To test the effect of the mat thickness, the optimum cocktail composition (1.12 g of polymeric blend B-3, 0.08 g of glycerol, 9.5 mg of FC1 and 18.5 mg KTpCIPB solubilised into 6.3 g DMF) was processed during 0.5, 1.0, 2.0 and 3.0 h (NWM-T1, NWM-T2, NWM-T3 and NWM-T4, respectively); see Table 2 for electrospinning conditions.

Figure 8 shows the experimental results; the sensing response increases with the deposition time up to 2.0 h. After that, an increase of the deposition time provides a decrease on the sensing response. Thus, the optimum deposition time was set as 2.0 h which correspond with a thickness of $50 \pm 10 \mu\text{m}$ determined by 5 measurements made in 3 different cross-sectional SEM pictures of a mat previously cut in a liquid nitrogen bath (total of 15 measurements).

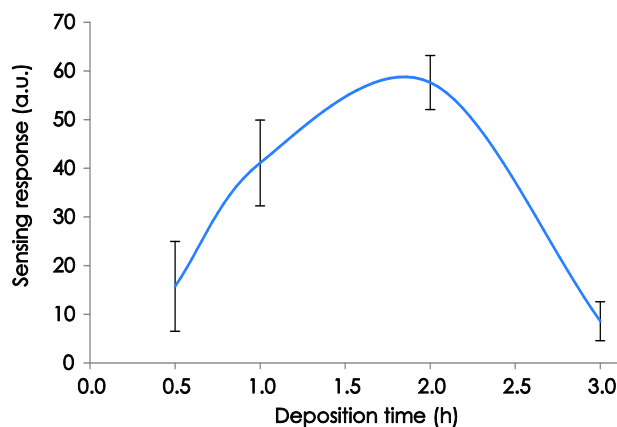


Figure 8. Effect of the thickness.

Figure 9 shows SEM pictures of the optimum Hg^{2+} -sensing nonwoven mat. It shows homogenous, defect-free and highly porous mats (see Figure 9c and d). The fibres are 1 μm in diameter with a very narrow size distribution (Figure 9a). Figure 9b shows a slightly rough but nonporous fibre surface. Contact points between fibres are partially welded so that fraying does not occur and an easy handling of the mats is favoured.

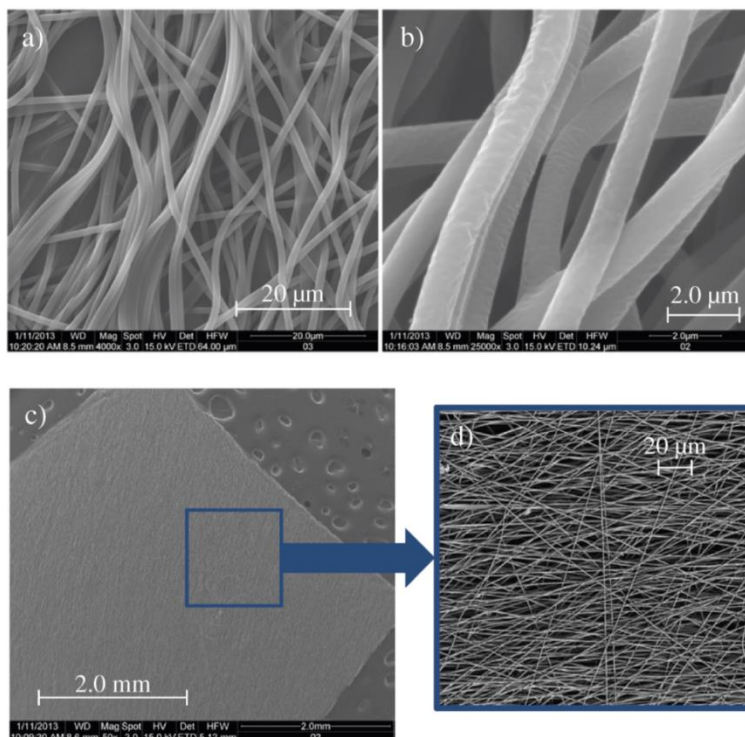


Figure 9. SEM pictures of the optimum nonwoven sensing mat.

3.5. Optical properties and analytical figures of merit

Figure 10 shows the emission spectra of the optimum Hg^{2+} -sensing microfibre mat in the presence and in the absence of Hg^{2+} .

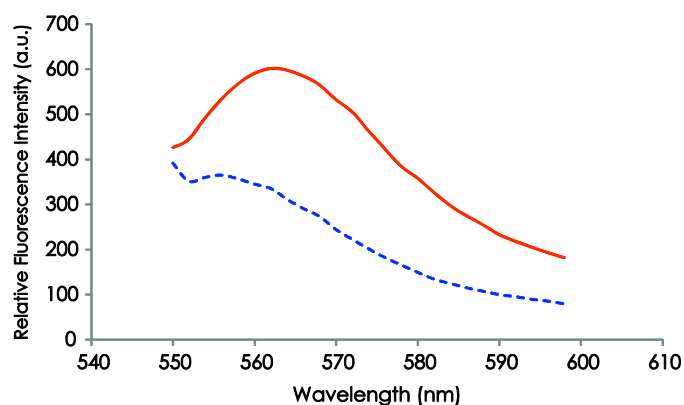


Figure 10. Emission spectra of the optimum $\text{Hg}(\text{II})$ -sensitive nonwoven mats in the absence (dashed line, ---) and in the presence (solid line, ---) of Hg^{2+} . $\lambda_{\text{exc}} = 540 \text{ nm}$, excitation and emission slit widths of 5/5 nm, detector voltage of 500 V, exposition time 15 min and $[\text{Hg}^{2+}] = 4 \mu\text{M}$.

The luminescence intensity of the sensing films at different concentrations of Hg^{2+} (see Figure 11) indicates a linear concentration range from 0.4 to 1.0 μM for detector voltage of 550 V and from 1.0 to 4.0 for detector voltage of 500 V. Table 3 summarises the analytical figures of merits of the proposed sensing microfibre mat.

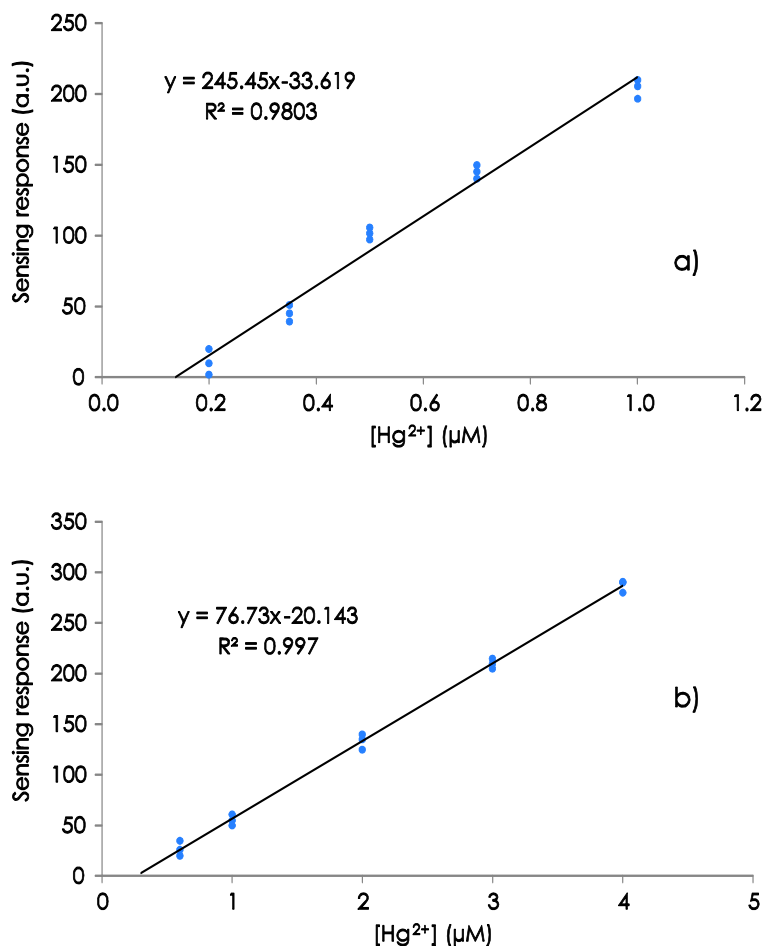


Figure 11. Calibrations curves at a detector voltage of a) 550 v and b) 500 v.

Comparing these analytical features with those of the FC1-classical polymeric sensing films⁵, the use of electrospinning decreases the detection limit 2.6 times but it also reduces the linear concentration range.

The response time, determined as the time that the sensing film has to be submerged into the Hg^{2+} solution, is determined to be 15 min for the proposed sensing mats while the incorporation of FC1 into classical polymeric sensing films provide a response time of 50 min⁵. Therefore, it is possible to conclude that the use of electrospinning for encapsulating FC1 decreases substantially the response time and therefore reduces the cost of the analysis. It should be due to the increase on the effective surface area; it provides an increase of the diffusion speed of Hg^{2+} into the sensing films and therefore a decrease on the response time.

Table 3. Analytical figures of merit of the proposed sensing microfibre mat.

Parameter	550 V	500 V
Slope (μM^{-1})	245	77
s_b	9	1
Intercept	-34	-20
s_b	6	3
r^2	0.9873	0.9970
F	647	4285
p-value	1.8×10^{-12}	0.000
Linear range	0.4–1.0	1.0–4.0
s_0	9.018	7.845
LOD (μM)	0.1	0.3
LOQ (μM)	0.4	1.0
Precision RSD (%)		
	0.4 μM 12.9	1.0 μM 10.0
	0.5 μM 4.2	2.0 μM 5.7
	0.7 μM 3.4	3.0 μM 2.4
	1.0 μM 3.3	4.0 μM 2.1

3.6. Study of interferences

The three metal ions that have demonstrated a higher interference in the determination of Hg²⁺ by using FC1⁵ (Ag⁺, Pb²⁺ and Cd²⁺) and one cation containing Hg²⁺ (MeHg⁺; monomethylmercury(II)) were selected as interfering ions in order to check the selectivity of the Hg²⁺-sensing microfibre mat (see Figure 12). It presents that Ag⁺, Pb²⁺ and Cd²⁺ ions provoked negligible signals whereas MeHg⁺ ion provided a detectable luminescence signal with regard to Hg²⁺ ion signal. Therefore, it can be concluded that only MeHg⁺ ion produced a positive interference in the determination of Hg²⁺ ion and it has to be taking into account for practical applications.

In comparison with FC1-classical polymeric sensing film, the proposed sensing mat is more selective because Cd²⁺, Pb²⁺ and Ag⁺ do not interfere the determination of Hg²⁺. It could be due to the reduction of the response time, as the decreasing of the time that the sensing mat has to be submerged into the sample should also decreases the diffusion of interferents into the sensing films.

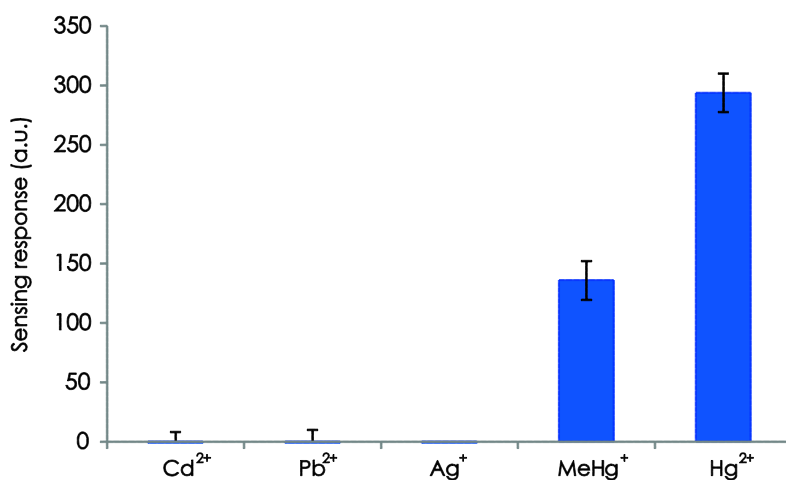


Figure 12. Interference study. [Hg²⁺] = 4 μM, [interference ions] = 10 μM. $\lambda_{exc/em}$ = 540/562 nm, excitation and emission slit widths of 5/5 nm, detector voltage of 500 V; exposition time 15 min.

3.7. Application of the sensing film

To test the predictive ability of our microfibre sensing mat, two real water samples were evaluated: one sample of tap drinking water from the city of Granada (Andalusia, Spain) and one mineral water sample commercialised in Spain. Due to both samples did not contain Hg²⁺, they were spiked at two Hg²⁺ concentration levels (see Table 4).

The samples were prepared by following the sample preparation procedure. The microfibre sensing mats were exposed to the sample and luminescence was measured at $\lambda_{exc/em}$ = 540/562 nm, excitation and emission slit widths of 5/5 nm, detector voltages of 550 V for 1.0 μM and 500 V for 4.0 μM and exposition time of 15 min. The results are set out in Table 4. In all cases the detection and quantification rates of the optical sensor were highly satisfactory, showing recovery percentages between 89.0 and 106.2% with relative standard deviations lower than 8%.

Table 4. Analysis of Hg²⁺ in water samples.

Sample	Hg ²⁺ added (μM)	Hg ²⁺ detected (μM)	Recovery percentage (%)
Tap water	1.00	1.06 ± 0.05	106.2
	4.00	3.56 ± 0.38	89.0
Mineral water	1.00	1.05 ± 0.03	105.3
	4.00	3.85 ± 0.35	96.2

4. Conclusions

This paper describes a highly selective Hg²⁺-sensing microfibre mat based on the encapsulation of a spirocyclic phenilthiosemicarbazide Rhodamine derivative (called FC1) into polymeric microfibrils produced by electrospinning.

The Hg²⁺-selective microfibre mat possess very high specific surface and excellent mechanical properties: it is easily manipulated and it has high mechanical strength, high consistency and high flexibility. In addition, it is highly hydrophilic but insoluble in aqueous media as well as in nonpolar solvents. Furthermore, the encapsulated FC1 preserves its sensing ability, displaying intense turn-on fluorescence in the presence of Hg²⁺. It responds to Hg²⁺ concentrations in water between 0.4 and 4 μM, with a detection limit of 0.1 μM Hg²⁺ which is 2.6 times better than those of the same chemodosimeter immobilised into a classical polymeric sensing film. Finally, the response time of the proposed mat is 15 min, which is lower than the response time provided by FC1-classical polymeric sensing film (50 min). Therefore, it is possible to conclude that the use of electrospinning increases the sensitivity and decreases the response time in the use of FC1 to determine Hg²⁺.

Acknowledgements

The authors are grateful to the Ministerio de Economía y Competitividad of Spain (Project CTQ2011-25388 and PTQ-11-04904), the Junta de Andalucía (projects P07-FQM-2625 and P07-FQM-2738) and the Gobierno de Extremadura (Consolidation Project of Research Group FQM003, Project GR1003), co-financed by European FEDER Funds.

References

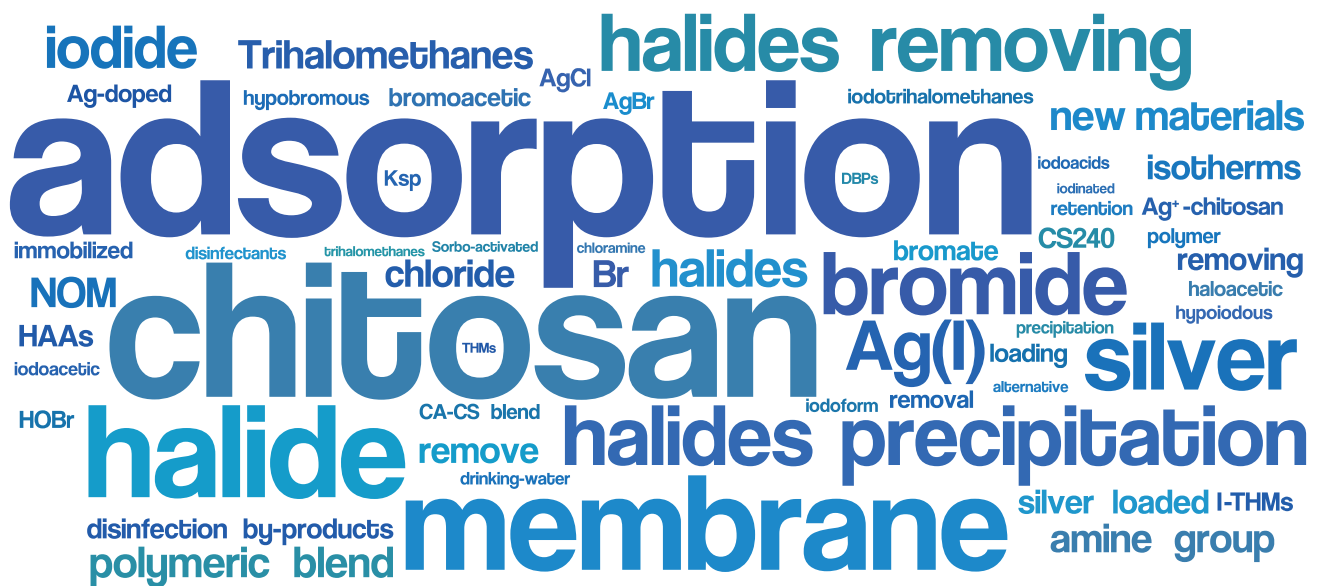
1. Culzoni, M. J.; Muñoz de la Peña, A.; Machuca, A.; Goicoechea, H. C.; Babiano, R., Rhodamine and BODIPY chemodosimeters and chemosensors for the detection of Hg²⁺, based on fluorescence enhancement effects. *Analytical Methods* **2013**, *5* (1), 30-49.
2. (a) National Primary Drinking Water Regulations MCL booklet. *United States Environmental Protection Agency* **2009**, EPA 816-F-09-004; (b) Council Directive 98/83/EC of 3 November 1998 on the quality of water intended for human consumption as amended by Regulations. **1998**, 1882/2003/EC and 596/2009/EC.
3. Syversen, T.; Kaur, P., The toxicology of mercury and its compounds. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* **2012**, *26* (4), 215-226.
4. Bohoyo-Gil, D.; Rodríguez-Cáceres, M. I.; Hurtado-Sánchez, M. d. C.; Muñoz de la Peña, A., Fluorescent Determination of Hg²⁺ in Water and Fish Samples Using a Chemodosimeter Based in a Rhodamine 6G Derivative and a Portable Fiber-Optic Spectrofluorimeter. *Applied Spectroscopy* **2010**, *64* (5), 520-527.
5. Orriach-Fernández, F. J.; Medina-Castillo, A.; Fernández-Sánchez, J. F.; Muñoz de la Peña, A.; Fernández-Gutiérrez, A., Hg²⁺-selective sensing film based on the incorporation of a rhodamine 6G

- derivative into a novel hydrophilic water-insoluble copolymer. *Analytical Methods* **2013**, 5 (23), 6642-6648.
6. Fernández-Sánchez, J. F.; Cannas, R.; Spichiger, S.; Steiger, R.; Spichiger-Keller, U. E., Optical CO₂-sensing layers for clinical application based on pH-sensitive indicators incorporated into nanoscopic metal-oxide supports. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2007**, 128 (1), 145-153.
 7. Dansby-Sparks, R. N.; Jin, J.; Mechery, S. J.; Sampathkumaran, U.; Owen, T. W.; Yu, B. D.; Goswami, K.; Hong, K.; Grant, J.; Xue, Z.-L., Fluorescent-Dye-Doped Sol-Gel Sensor for Highly Sensitive Carbon Dioxide Gas Detection below Atmospheric Concentrations. *Analytical Chemistry* **2009**, 82 (2), 593-600.
 8. Li, H.; Wang, L., NaYF₄:Yb³⁺/Er³⁺ nanoparticle-based upconversion luminescence resonance energy transfer sensor for mercury(II) quantification. *Analyst* **2013**, 138 (5), 1589-1595.
 9. Lee, H.; Lee, H.-S.; Reibenspies, J. H.; Hancock, R. D., Mechanism of "Turn-on" Fluorescent Sensors for Mercury(II) in Solution and Its Implications for Ligand Design. *Inorganic Chemistry* **2012**, 51 (20), 10904-10915.
 10. Hu, J.; Li, C.; Liu, S., Hg²⁺-Reactive Double Hydrophilic Block Copolymer Assemblies as Novel Multifunctional Fluorescent Probes with Improved Performance. *Langmuir* **2009**, 26 (2), 724-729.
 11. Liu, H.; Yu, P.; Du, D.; He, C.; Qiu, B.; Chen, X.; Chen, G., Rhodamine-based ratiometric fluorescence sensing for the detection of mercury(II) in aqueous solution. *Talanta* **2010**, 81 (1-2), 433-437.
 12. (a) Persano, L.; Camposeo, A.; Tekmen, C.; Pisignano, D., Industrial Upscaling of Electrospinning and Applications of Polymer Nanofibers: A Review. *Macromolecular Materials and Engineering* **2013**, 298 (5), 504-520; (b) Reneker, D. H.; Yarin, A. L.; Zussman, E.; Xu, H., Electrospinning of Nanofibers from Polymer Solutions and Melts. In *Advances in Applied Mechanics*, Hassan, A.; Erik van der, G., Eds. Elsevier: **2007**; Vol. Volume 41, pp 43-346.
 13. (a) Wendorff, J. H.; Agarwal, S.; Greiner, A., Electrospinning: Materials, Processing, and Applications. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim, **2012**; (b) Pisignano, D., *Polymer Nanofibers: Building Blocks for Nanotechnology*. The Royal Society of Chemistry: **2013**.
 14. Nguyen, L. T. H.; Chen, S.; Elumalai, N. K.; Prabhakaran, M. P.; Zong, Y.; Vijila, C.; Allakhverdiev, S. I.; Ramakrishna, S., Biological, Chemical, and Electronic Applications of Nanofibers. *Macromolecular Materials and Engineering* **2013**, 298 (8), 822-867.
 15. (a) Lin, Q.; Li, Y.; Yang, M., Polyaniline nanofiber humidity sensor prepared by electrospinning. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2012**, 161 (1), 967-972; (b) Miao, Y.-E.; He, S.; Zhong, Y.; Yang, Z.; Tjiu, W. W.; Liu, T., A novel hydrogen peroxide sensor based on Ag/SnO₂ composite nanotubes by electrospinning. *Electrochimica Acta* **2013**, 99 (0), 117-123; (c) Wang, B.; Luo, L.; Ding, Y.; Zhao, D.; Zhang, Q., Synthesis of hollow copper oxide by electrospinning and its application as a nonenzymatic hydrogen peroxide sensor. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2012**, 97 (0), 51-56; (d) Xue, M.; Li, F.; Wang, Y.; Cai, X.; Pan, F.; Chen, J., Ultralow-limit gas detection in nano-dumbbell polymer sensor via electrospinning. *Nanoscale* **2013**, 5 (5), 1803-1805.
 16. Regulatory Impact Analysis of the Final Clean Air Mercury Rule. *Environmental Protection Agency, Research Triangle Park, NC. Office of Air Quality Planning and Standards*. **2005**, EPA-452/R-05-003.
 17. Integrated Wastewater Discharge Standard. *Standardization Administration (SA) of the People's Republic of China* **1996**, GB 8978(1996).
 18. Yang, Y.-K.; Yook, K.-J.; Tae, J., A Rhodamine-Based Fluorescent and Colorimetric Chemodosimeter for the Rapid Detection of Hg²⁺ Ions in Aqueous Media. *Journal of the American Chemical Society* **2005**, 127 (48), 16760-16761.
 19. Dujols, V.; Ford, F.; Czarnik, A. W., A Long-Wavelength Fluorescent Chemodosimeter Selective for Cu(II) Ion in Water. *Journal of the American Chemical Society* **1997**, 119 (31), 7386-7387.
 20. Yang, Y.-K.; Ko, S.-K.; Shin, I.; Tae, J., Synthesis of a highly metal-selective rhodamine-based probe and its use for the in vivo monitoring of mercury. *Nat. Protocols* **2007**, 2 (7), 1740-1745.

21. García Moreda, F. J.; Arregui, F. J.; Achaerandio, M.; Matias, I. R., Study of indicators for the development of fluorescence based optical fiber temperature sensors. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2006**, *118* (1-2), 425-432.

Tercer Bloque

Capítulo 5



Capítulo 5

The development of cellulose acetate-chitosan blend membranes loaded with silver for halides removing

In collaboration with:

Department of Analytical Chemistry, University of Granada, Avd. Fuentenueva s/n, 18071 Granada, Spain.

Department of Inorganic Chemistry, University of Granada, Avd. Fuentenueva s/n, 18071 Granada, Spain.

Artículo en redacción

The development of cellulose acetate-chitosan blend membranes loaded with silver for halides removing

Abstract

We describe the development of cellulose acetate-chitosan blend membranes loaded with silver, for halides removing from the media by halide precipitation on the membrane surface. These membranes have been chemically and texturally characterized using N₂ adsorption at 77 K, mercury porosimetry, determination of the pH of the point of zero charge (pH_{PZC}), X-ray diffraction (XRD), and X-ray photoelectron spectroscopy (XPS). Results show a higher adsorption capacity for halides as well as dissolved organic matter than a conventional activated carbon (Sorbo-Norit) which is a widely used material in drinking-water treatment plants.

1. Introduction

Disinfection of drinking water supplies is accomplished with disinfectants such as chlorine, chlorine dioxide, chloramines or ozone, in order to eliminate pathogenic micro-organisms which involve a high risk to human health. However, due to the ubiquitous presence of bromide and iodide ions in natural waters¹, these strong oxidants can produce brominated and iodinated disinfection by-products (DBPs)² by reacting with natural organic matter (NOM). Since Rook³ reported about these compounds and the adverse effects on health⁴ in 1974, hundreds of potentially toxic disinfection by-products have been identified⁵.

Bromide ions are considered as nontoxic since they are natural components of all natural waters. However the presence of these ions is potentially dangerous since they can react with a wide variety of common disinfectants⁶, such as chlorine, chloramine or ozone to yield brominated disinfection by-products. When bromide containing water is disinfected with chlorine or chloramines, bromide ions react with natural organic matter and undergo oxidation to yield brominated trihalomethanes (THMs), as well as brominated haloacetic acids (HAAs). When oxidized by ozone⁷ or hydroxyl groups, bromide ions generate bromate ions which have been classified as possibly carcinogenic to humans (Group 2B) by International Agency for Research on Cancer (IARC), and according to the World Health Organization (WHO), 25 µg/L is the maximum concentration permitted in drinking water⁸.

During oxidative drinking water treatment, chlorine and chloramines react quickly with bromide as well as iodide ions, by oxidizing them to hypobromous acid⁹ (HOBr) and hypoiodous acid¹⁰ (HOI) respectively. Their further reaction with natural dissolved organic matter¹¹ (NOM) can lead to the formation of haloacetic acids (HAAs) as well as trihalomethanes (THMs)¹². Among

them iodotrihalomethanes (I-THMs; in particular iodoform CHI_3) have a low organoleptic threshold concentration causing bad taste and odor problems in drinking waters.

Recent studies have reported the discovery of iodoacids¹³ for the first time. They were found in finished drinking water when only chloramines were used for disinfection treatment. There is an emerging concern regarding these new iodoacids by-products, because recently studies have shown that iodoacetic acid is 2-fold more genotoxic and 3-fold more cytotoxic than bromoacetic acid¹⁴ (which is the most potent genotoxin/cytotoxin of the chloro/bromo acetic acids).

Trihalomethanes and haloacetic acids are the most abundant disinfection by-products present in treated drinking water. Therefore, the best prevention strategy to avoid the uncontrolled formation of these undesired by-products is to remove the precursors prior to disinfection treatment.

Several alternatives¹⁵ have been proposed for the removal of halides from drinking water sources. The removal techniques can be broadly classified into three categories, namely electrochemical¹⁶, membrane¹⁷ and adsorptive techniques¹⁸.

Based on several works leading with immobilized silver on chitosan¹⁹ membranes, we have developed cellulose acetate-chitosan blend membranes loaded with silver ions, for halides removing from the media by halide precipitation on the membrane surface. According with the literature²⁰, hydrogen interactions between two different macromolecules are stronger than between the macromolecules of the same polymer. Thus, hydrogen interactions between chitosan and cellulose acetate (last one provides physical strength), is prone to form.

Metallic cations, such as Ag(I) , are mainly attached by amine group on chitosan macromolecules via chelating mechanism²¹. Generally, positive ions interact with chitosan at high pH values, because the chitosan amine groups are non-protonated and therefore their electron pair are available for bonding silver ions. On the other hand, at low pH values, the amine groups of the chitosan are protonated and, therefore, a reduction of the pH could be used for the regeneration of the membranes.

In this work, several cellulose acetate-chitosan blend membranes loaded with silver have been synthesized and characterized for halides removing.

2. Experimental

2.1. Chemicals and reagents

Cellulose acetate ($M_n \sim 50,000$ by GPC), chitosan (medium molecular weight) and formic acid (>95%) were supplied by Sigma-Aldrich. They were used as received.

Silver nitrate (99.9%; ACS) was supplied by ABCr and it was also used as received.

2.2. Instrumentation and apparatus

Dissolved NOM was measured using a Shimadzu TOC-5000A unit with an experimental error of $\pm 5\%$.

Demineralisation of activated carbons with HCl and HF was carried out using procedures proposed by Morgan et al.²²

The surface area of carbon samples was determined from the BET equation applied to the N₂ adsorption isotherms at 77 K, which were obtained using a Micromeritics Gemini 2370 adsorption unit. The volumes of macropores (V_3) and wider mesopores (V_2) were determined by mercury porosimetry using a Quantachrome Autoscan 60 apparatus.

The pH of the point of zero charge (pH_{PZC}) of carbons was determined following the pH drift tests reported elsewhere²³. The determination of acid and basic groups was carried out following the method proposed by Boehm²⁴. Elemental analysis of the carbons used was performed with a Fison's Instruments Model 1108 CHS elemental analyser.

2.3. Synthesis of the membranes

The membranes were prepared by using the phase inversion method²⁵. Different amounts of chitosan and cellulose acetate (see Table 1) were dissolved in 4.68 mL of formic acid using magnetic stirring overnight. The obtained viscous and homogeneous solutions were maintained without stirring for 2 h to eliminate any trapped air bubbles. Then, the membranes were soaked for 2 h in a coagulation bath containing 3% NaOH where the phase inversion occurs. This process was repeated twice. Finally the membranes were washed three times in a bath of cool water for 1 hour each time to ensure the removal of the solvents and to improve the stability of the structure of the final membrane. Each membrane was synthesized by triplicate.

Table 1. Membranes composition.

Sample	CS (mg)	CA (mg)	% CS	% CA
CS0	0	300	0,00%	100,00%
CS20	20	280	6,67%	93,33%
CS40	40	260	13,33%	86,67%
CS60	60	240	20,00%	80,00%
CS90	90	210	30,00%	70,00%
CS240	240	60	80,00%	20,00%

The loading of silver ions was developed by following the procedure described by Ma^{19a}. The membranes were immersed into 100 mL of 100 mg/L silver nitrate at pH 6 and 25 °C for 2 hours. During the reaction process, the vessels were isolated from light to prevent the reduction of silver ions to metallic silver particles and they were stirred at 150 rpm to facilitate the reaction between the amine groups of the chitosan with the Ag(I) ions²⁶.

2.4. Adsorption study

2.4.1. Adsorption study under static conditions

Adsorption isotherms were obtained by adding 0.1 g of material to Erlenmeyer flasks containing 100 mL of increasing concentrations of sodium chloride, bromide and iodide (0–10 $\mu\text{mol/L}$). The flasks were immersed and agitated in a thermostatic bath at 298 K for 7 days (time required to reach the equilibrium). All experiments were performed in Milli-Q water with no addition of buffer, in order to avoid interference problems. The pH values in experiments for the determination of kinetics and adsorption isotherms ranged from 6.5 to 7.

2.4.2. Influence of chloride ions and organic matter on the adsorption of bromide and iodide

In order to study the effect of chloride ions over the adsorption of bromide and iodide on the material, adsorption isotherms were obtained in the presence of chloride ions as described in previous section. A chloride concentration of 40 mg/L was selected due to it is the usual concentration in superficial water.

The influence of organic matter on the adsorption of bromide and iodide was analyzed by determining the adsorption isotherms as described above, using surface waters with varying concentrations of dissolved organic carbon (NOM). Water samples were collected from Lake Zurich (Switzerland) ([NOM]=1.4 mg/L, [Alkalinity]=2.6 mM HCO_3^-) and Lake Greifensee (Switzerland) ([NOM]=3.4 mg/L, [Alkalinity]=3.6mM HCO_3^-).

2.5. Analytical methods

The retention membranes samples were texturally and chemically characterized using N_2 adsorption at 77 K, mercury porosimetry, determination of the pH of the point of zero charge (pH_{PZC}), X-ray diffraction (XRD), and X-ray photoelectron spectroscopy (XPS). These techniques have been described in detail elsewhere²⁷. Chloride, bromide and iodide concentrations were measured by selective electrodes. The dissolved organic carbon was determined using Shimadzu TOC-5000A equipment.

3. Results and discussion

3.1. Chemical and textural characterization of the membranes

Table 2 shows the textural characterization of the prepared membranes. These results display that prepared membranes were characterized by low mesoporosity (V_2) and macroporosity (V_3). It is interesting to note that modification in polymer proportions does not affect the textural features of samples. Actually, all samples display similar values of surface area and meso- and macroporous volume.

Table 2. Textural characterization of prepared materials.

Sample	SN_2^a (m ² /g)	V_2^b (cm ³ /g)	V_3^c (cm ³ /g)
CS0	15	0.01	0.03
CS20	12	0.02	0.02
CS40	17	0.02	0.03
CS60	16	0.03	0.02
CS90	13	0.02	0.03
CS240	15	0.03	0.03

a) Surface area determined by applying BET equation to N₂ adsorption isotherms at 77 K.

b) Volume of pores with diameter of 50–6.6 nm determined by mercury porosimetry.

c) Volume of pores with diameter above 50 nm determined by mercury porosimetry.

Chemical characterization of the membranes was accomplished by determining the pH of the point of zero charge (pH_{PZC}), X-ray diffraction (XRD), and X-ray photoelectron spectroscopy (XPS). The corresponding results are shown in Table 3.

Table 3. Chemical characterization of prepared materials.

Sample	pH_{PZC}	Ag (%)	O (%)	N (%)	C (%)	(-C=O)	(-C-O)
						533.9 ±0.2eV (%)	533.9 ±0.2eV (%)
CS0	4.5	0	21	4	75	89	11
CS20	4.3	10	22	5	63	91	9
CS40	4.2	9	23	5	63	92	8
CS60	4.3	9	23	5	63	78	22
CS90	4.6	8	21	4	67	84	16
CS240	4.8	9	22	6	63	82	18

The pH_{PZC} values revealed an elevated surface acidity ($pH_{PZC} \approx 4.5$). Indeed, XPS analyses showed a high concentration of surface oxygen (O=21-23%) in all samples. Deconvolution of the O1s spectrum of each sample showed that the surface oxygen was mainly found as carboxylic groups ($-C=O$).

The XRD results showed a wide dispersion of the metal on the membrane surface, since no diffraction peaks were observed in any case. Furthermore, it is remarkable that XPS analysis of these samples revealed that the silver on the membrane surface was in oxidation state +1 and that the surface percentage ranged from 0 % for CS0 (membrane without chitosan) to 8-10 % for the rest of membranes which contain chitosan.

3.2. Adsorption of chloride, bromide and iodide on the membranes

3.2.1. Adsorption kinetics

Adsorption kinetics of chloride, bromide and iodide on sample CS240 are represented in Figure 1. Results indicate that the adsorption rate is independent of the studied anion.

Kinetic constants were obtained for each anion from the results in Figure 1, using a first-order model. The values were 0.0341, 0.040, and 0.041 h^{-1} for Cl^- , Br^- , and I^- , respectively. To determine whether the halide adsorption kinetics was influenced by the diffusion of anions on the adsorbent surface, the Weisz-Prater (C_{WP}) coefficient was determined by

$$C_{WP} = \frac{(-r_M)\rho_p R_p^2}{D_E C_M} \quad (\text{Equation 1})$$

where $(-r_M)$ is the anion adsorption rate (mol/L s), ρ_p is the particle density (g/cm³), R_p is the particle radius (0.05–0.08 cm), D_E is the effective diffusivity (cm²/s), and C_M is the anion concentration (mol/L).

The C_{WP} values obtained were much lower than 1 ($C_{WP} \ll 1$), indicating that the adsorption process of anions on membranes is not influenced by their diffusion on the CS240 membrane surface. These results would indicate that the Ag^+ -chitosan coordination compound formed is quite strong, since time required to reach the maximum removal equilibrium of halides is high, despite of the membranes are non-porous.

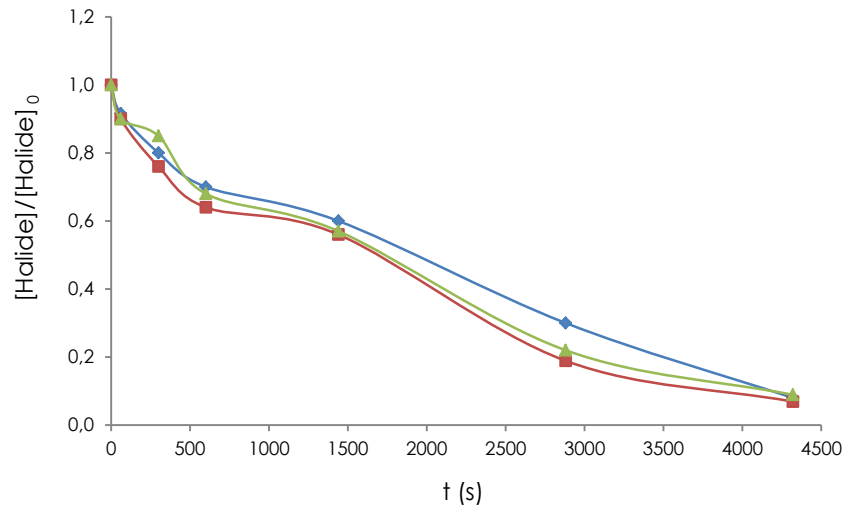


Figure 1. Adsorption kinetics of halides on sample CS240. pH 7, [Halide]=100 $\mu\text{g/L}$, $T=25\text{ }^\circ\text{C}$. (\blacklozenge) chloride, (\blacksquare) bromide, and (\blacktriangle) iodide.

3.2.2. Halide adsorption under static conditions: adsorption isotherms

Figure 2 shows the adsorption isotherms of chloride, bromide and iodide anions on sample CS240; X_m is the adsorption capacity and C_e is the concentration of the halide in the aqueous equilibrium.

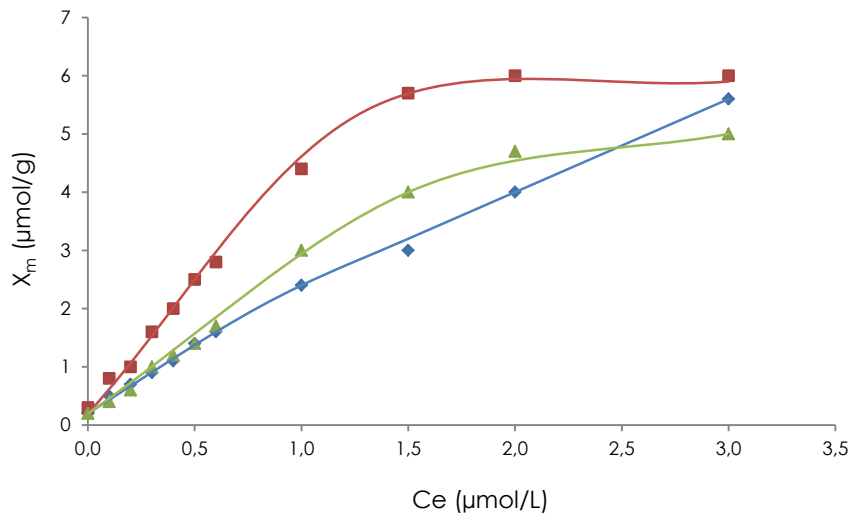


Figure 2. Adsorption isotherms of halides on CS240. pH 7, $T=25\text{ }^\circ\text{C}$. (\blacklozenge) chloride, (\blacksquare) bromide, and (\blacktriangle) iodide.

The results presented in Figure 2 show that sample CS240 has a large capacity for adsorbing halide anions. Since the solution pH remained constant in the range 6.5–7 during the adsorption processes and was higher than the pH_{PZC} of the membrane (4.5), the charge density of the membrane surface in these processes was negative, so that repulsive electrostatic interactions were established between membrane surface and halide anions. This does not favor the adsorption process. Therefore, the adsorption of these ions must take place via interactions

that overcome these electrostatic repulsions. Thus, the high adsorption capacity of the membrane may be due to the presence of Ag(I) on its surface, with the formation of the corresponding Ag halides (reactions 1-3), motivated by their low solubility (AgCl, AgBr and AgI). The solubility products (K_{sp}) of these compounds range from 10^{-10} for AgCl to 10^{-17} for AgI. Consequently, the corresponding halides in solution are then retained on the membrane surface by a chemisorption process with much stronger adsorbent–adsorbate interactions than expected for a physisorption processes.



Figure 3 shows results obtained from the adsorption of Br^- on membranes with increasing contents of chitosan. An increase in the concentration of chitosan produced a considerable increase in the adsorption capacity of the material (Figure 3). On the other hand, Table 3 shows that the amount of Ag(I) is practically the same in all the membranes containing chitosan. Thus the increase of the Br^- adsorption when CS is increased might be related with the capacity of the membrane to retain Ag(I) in its surface. Thus, an increase of the CS should provide a more effective retention of Ag(I) and therefore a decrease of the Ag(I) lixiviation or it can be also related with the migration of the Ag(I) into the polymeric structure of the membrane. Therefore, further experiments have to be carried out to demonstrate the effect of the concentration of CS over the adsorption capacity.

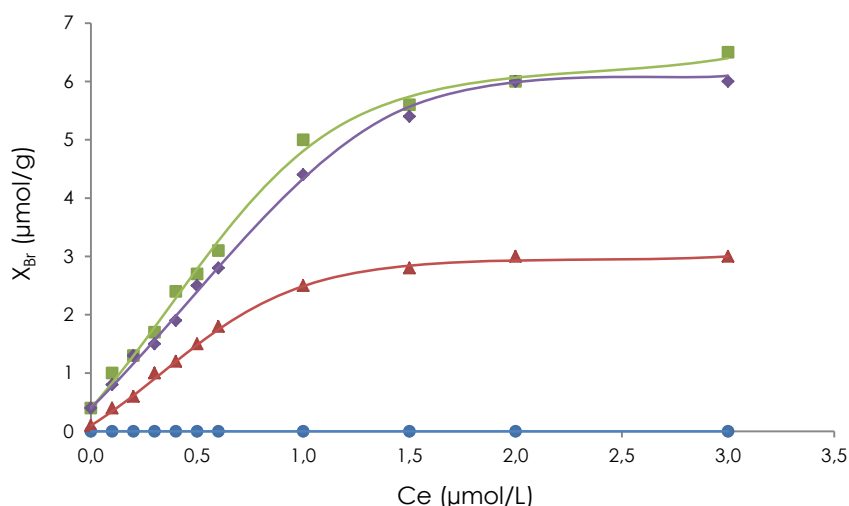


Figure 3. Adsorption isotherms of bromide on membranes doped with increasing content of Ag. pH 7, $T=25^\circ\text{C}$. (●) CS0; (▲) CS20, (■) CS60; (◆) CS240.

In addition, Figure 3 displays that the membrane sample prepared in absence of chitosan, does not have the capacity to remove bromide from the medium. It confirms that adsorption of halides takes place as a result of specific Ag(I)–halide interactions at the surface of the membrane.

Results presented in Figure 2 show that the order of adsorption capacity on CS240 membrane was $\text{Br}^- > \text{Cl}^- > \text{I}^-$. When these results were related to the chemical characteristics of the anions studied it was observed that the adsorption capacity (X_m) and affinity of adsorbent for adsorbate (BX_m) increased (i) with a reduction in ionic radius of the anion and (ii) with an increasing of its polarizing power. The fact that the adsorption capacity is reduced with an increase in the anion radius may indicate the presence of steric impediments in the chemisorption process of halides to Ag-doped membranes. Thus, when the halide radius increases, there is a reduction in the number of accessible adsorption sites, reducing the amount adsorbed. Due to the polarizing power of these anions is inversely related to their radius, the adsorption capacity of the membrane increases proportionally to that polarizing power.

3.2.3. Influence of natural organic matter (NOM) and chloride on adsorption of Br^- and I^-

Two essential parameters can considerably affect the adsorptive capacity of materials in the removal process of halides from water, namely (i) the competition of chloride anions for the same adsorption sites and (ii) blocking of the porosity, caused by adsorption of dissolved organic matter on the membrane surface, limiting the halides access to surface adsorption sites.

Figure 4 depicts, as an example, the adsorption isotherms of bromide in presence of chloride. Thus, it can be observed that the presence of Cl^- reduced the adsorption capacity of Br^- and I^- . These results would confirm that Cl^- competes for the same adsorption sites on the membrane surface and that their presence therefore reduces the adsorption efficiency of Br^- and I^- .

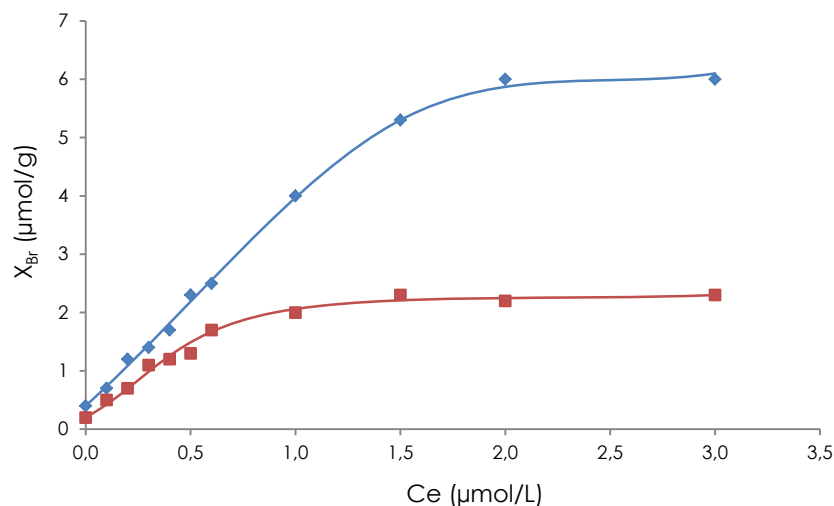


Figure 4. Influence of chloride on bromide adsorption process. pH 7, $T=25^\circ\text{C}$, $[\text{Cl}^-]=40\text{ mg/L}$. (■) in presence of Cl^- and (♦) in absence of Cl^- .

Figure 5 depicts the results for sample CS240 of the adsorption of bromide in natural waters from Lake Zurich and Lake Greifensee (Switzerland), whose chemical characteristics were described in the Experimental Section.

It can be deduced from the results in Figure 5 that an increase in the NOM concentration produces a reduction in the adsorption capacity of Br^- . This may be due to the blocking of membrane pores produced by adsorption of the organic matter present in the waters. Determination of the concentration of NOM, once adsorption equilibrium was attained, corroborated this fact, since the concentration determined was zero regardless of the water considered. Interestingly, Figure 5 shows that adsorption isotherms in presence of waters with different organic carbon contents showed an increase in the minimum concentration of bromide, after which their adsorption on the membrane started. This finding, as commented above, may be due to the blocking of the porosity of the material by adsorption of NOM.

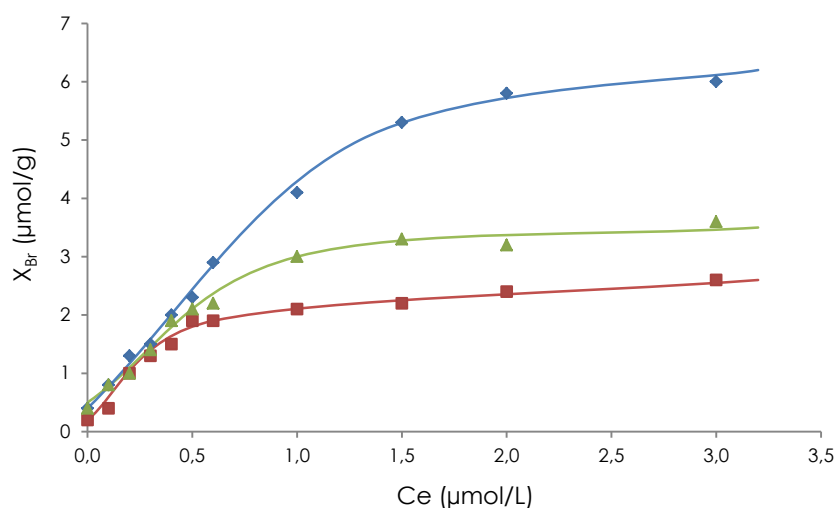


Figure 5. Influence of organic matter on bromide adsorption process. pH 7, $T=25$ °C. (♦) Milli-Q water; (▲) Lake Zurich water ([NOM]= 1.4 mg/L); and (■) Lake Greifensee water ([NOM]=3.6 mg/L).

The results presented in Figure 4 and Figure 5 indicate that the presence of Cl^- and organic matter in the system reduces the efficiency of Ag-doped membranes in removing bromide and iodide from aqueous solution. However, the reduction in NOM concentration during their adsorption process may be highly beneficial to the system, since besides removing bromide and iodide anions, adsorption of dissolved organic matter is also occurring. Both effects are beneficial for water treatment and may lead to a significant reduction in the formation of undesired halogenated disinfection by-products.

3.2.4. Comparison between membranes and conventional activated carbon for bromide adsorption

Figure 6 show the results obtained from the adsorption of Br^- on Sorbo-Norit commercial activated carbon and on membrane (CS240) using water from Lake Zurich. These findings show

that the membrane (CS240) has a high adsorption capacity compared to the Sorbo activated carbon.

Sorbo-activated carbon is widely used in drinking-water treatment plants due to its high adsorbent capacity. It is characterized by a large surface area ($S_{N_2}=1182 \text{ m}^2/\text{g}$), elevated mesoporosity ($V_2=0.085 \text{ cm}^3/\text{g}$) and macroporosity ($V_3=0.481 \text{ cm}^3/\text{g}$), and, especially, by a high surface basicity ($\text{pH}_{\text{PZC}}=12.1$). Sorbo carbon presents a positive surface density charge ($\text{pH}_{\text{solution}} < \text{pH}_{\text{PZC}}$) at the working pH (pH 7). Therefore, the electrostatic interactions between the positively charged carbon surface and negatively charged bromide anions must be attractive, favoring the adsorption process. Nevertheless, the obtained results indicate that the adsorption capacity for bromide on this activated carbon is much lower than that of the Ag-doped membranes. These findings support the hypothesis that the adsorption of bromide ions on Ag-doped membranes is not controlled by electrostatic interactions but rather by a chemical interaction with Ag(I).

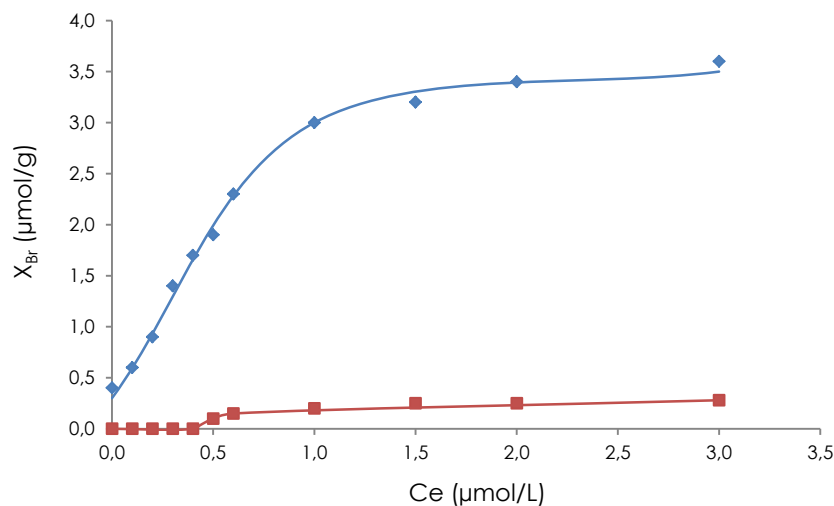


Figure 6. Comparison between capacities of CS240 membrane (◆) and Sorbo-activated carbon (■) to remove bromide from Lake Zurich waters. T=25 °C, pH 7.

4. Conclusions

New membrane for halides removing from water samples have been synthesized and characterized. These membranes are based on cellulose acetate-chitosan polymer blend produced by phase inversion method and then loaded with Ag(I) in order to provide the precipitation of the halides on the membrane surface.

The obtained results show a higher adsorption capacity for halides than a conventional activated carbon (Sorbo-Norit) which is a widely used material in drinking-water treatment plants. Anyway, they also reveal the further experiments have to be carried out in order to obtain more information about the effect of the different parameters on the adsorption capacity.

Acknowledgements

The authors are grateful to the Ministerio de Economía y Competitividad of Spain (Project CTQ2011-25388), the Junta de Andalucía (projects P07-FQM-2625 and P07-FQM-2738) co-financed by European FEDER Funds.

References

1. (a) Agus, E.; Voutchkov, N.; Sedlak, D. L., Disinfection by-products and their potential impact on the quality of water produced by desalination systems: A literature review. *Desalination* **2009**, 237 (1–3), 214–237; (b) Valero, F.; Arbós, R., Desalination of brackish river water using Electrodialysis Reversal (EDR): Control of the THMs formation in the Barcelona (NE Spain) area. *Desalination* **2010**, 253 (1–3), 170–174.
2. Hua, G.; Reckhow, D. A.; Kim, J., Effect of Bromide and Iodide Ions on the Formation and Speciation of Disinfection Byproducts during Chlorination. *Environmental Science & Technology* **2006**, 40 (9), 3050–3056.
3. Rook, J. J., Formation of haloforms during chlorination of natural waters. *J. Water Treat. Exam.* **1974**, 23, 234–243.
4. (a) Richardson, S. D.; Plewa, M. J.; Wagner, E. D.; Schoeny, R.; DeMarini, D. M., Occurrence, genotoxicity, and carcinogenicity of regulated and emerging disinfection by-products in drinking water: A review and roadmap for research. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* **2007**, 636 (1–3), 178–242; (b) Myllykangas, T.; Nissinen, T. K.; Mäki-Paakkanen, J.; Hirvonen, A.; Vartiainen, T., Bromide affecting drinking water mutagenicity. *Chemosphere* **2003**, 53 (7), 745–756.
5. (a) Woo, Y.-T.; Lai, D.; McLain, J. L.; Manibusan, M. K.; Dellarco, V., Use of mechanism-based structure-activity relationships analysis in carcinogenic potential ranking for drinking water disinfection by-products. *Environmental Health Perspectives* **2002**, 110 (Suppl 1), 75–87; (b) Richardson, S. D., Disinfection by-products and other emerging contaminants in drinking water. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2003**, 22 (10), 666–684; (c) Sadiq, R.; Rodriguez, M. J., Empirical Models to Predict Disinfection By-products (DBPs) in Drinking Water. In *Encyclopedia of Environmental Health*, Nriagu, J. O., Ed. Elsevier: Burlington, **2011**; pp 282–295; (d) Richardson, S. D.; Thruston, A. D.; Rav-Acha, C.; Groisman, L.; Popilevsky, I.; Juraev, O.; Glezer, V.; McKague, A. B.; Plewa, M. J.; Wagner, E. D., Tribromopyrrole, Brominated Acids, and Other Disinfection Byproducts Produced by Disinfection of Drinking Water Rich in Bromide. *Environmental Science & Technology* **2003**, 37 (17), 3782–3793.
6. Myllykangas, T.; Nissinen, T. K.; Hirvonen, A.; Rantakokko, P.; Vartiainen, T., The Evaluation Of Ozonation and Chlorination On Disinfection By-Product Formation for a High-Bromide Water. *Ozone: Science & Engineering* **2005**, 27 (1), 19–26.
7. (a) von Gunten, U., Ozonation of drinking water: Part II. Disinfection and by-product formation in presence of bromide, iodide or chlorine. *Water Research* **2003**, 37 (7), 1469–1487; (b) Arvai, A.; Jasim, S.; Biswas, N., Bromate Formation in Ozone and Advanced Oxidation Processes. *Ozone: Science & Engineering* **2012**, 34 (5), 325–333.
8. García-Villanova, R. J.; Oliveira Dantas Leite, M. V.; Hernández Hierro, J. M.; de Castro Alfageme, S.; García Hernández, C., Occurrence of bromate, chlorite and chlorate in drinking waters disinfected with hypochlorite reagents. Tracing their origins. *Science of The Total Environment* **2010**, 408 (12), 2616–2620.
9. Zhai, H.; Zhang, X., Formation and Decomposition of New and Unknown Polar Brominated Disinfection Byproducts during Chlorination. *Environmental Science & Technology* **2011**, 45 (6), 2194–2201.

10. Bichsel, Y.; von Gunten, U., Oxidation of Iodide and Hypoiodous Acid in the Disinfection of Natural Waters. *Environmental Science & Technology* **1999**, *33* (22), 4040-4045.
11. Smith, E. M.; Plewa, M. J.; Lindell, C. L.; Richardson, S. D.; Mitch, W. A., Comparison of Byproduct Formation in Waters Treated with Chlorine and Iodine: Relevance to Point-of-Use Treatment. *Environmental Science & Technology* **2010**, *44* (22), 8446-8452.
12. Bichsel, Y.; von Gunten, U., Formation of Iodo-Trihalomethanes during Disinfection and Oxidation of Iodide-Containing Waters. *Environmental Science & Technology* **2000**, *34* (13), 2784-2791.
13. Krasner, S. W.; Weinberg, H. S.; Richardson, S. D.; Pastor, S. J.; Chinn, R.; Scilimenti, M. J.; Onstad, G. D.; Thruston, A. D., Occurrence of a New Generation of Disinfection Byproducts†. *Environmental Science & Technology* **2006**, *40* (23), 7175-7185.
14. (a) Plewa, M. J.; Wagner, E. D.; Richardson, S. D.; Thruston, A. D.; Woo, Y.-T.; McKague, A. B., Chemical and Biological Characterization of Newly Discovered Iodoacid Drinking Water Disinfection Byproducts. *Environmental Science & Technology* **2004**, *38* (18), 4713-4722; (b) Richardson, S. D.; Fasano, F.; Ellington, J. J.; Crumley, F. G.; Buettner, K. M.; Evans, J. J.; Blount, B. C.; Silva, L. K.; Waite, T. J.; Luther, G. W.; McKague, A. B.; Miltner, R. J.; Wagner, E. D.; Plewa, M. J., Occurrence and Mammalian Cell Toxicity of Iodinated Disinfection Byproducts in Drinking Water. *Environmental Science & Technology* **2008**, *42* (22), 8330-8338.
15. (a) Mohapatra, M.; Anand, S.; Mishra, B. K.; Giles, D. E.; Singh, P., Review of fluoride removal from drinking water. *Journal of Environmental Management* **2009**, *91* (1), 67-77; (b) Watson, K.; Farré, M. J.; Knight, N., Strategies for the removal of halides from drinking water sources, and their applicability in disinfection by-product minimisation: A critical review. *Journal of Environmental Management* **2012**, *110* (0), 276-298.
16. (a) Kimbrough, D. E.; Suffet, I. H., Electrochemical removal of bromide and reduction of THM formation potential in drinking water. *Water Research* **2002**, *36* (19), 4902-4906; (b) Ying, T.-Y.; Yang, K.-L.; Yiaccoumi, S.; Tsouris, C., Electrosorption of Ions from Aqueous Solutions by Nanostructured Carbon Aerogel. *Journal of Colloid and Interface Science* **2002**, *250* (1), 18-27; (c) Oren, Y., Capacitive deionization (CDI) for desalination and water treatment — past, present and future (a review). *Desalination* **2008**, *228* (1-3), 10-29; (d) Xu, P.; Drewes, J. E.; Heil, D.; Wang, G., Treatment of brackish produced water using carbon aerogel-based capacitive deionization technology. *Water Research* **2008**, *42* (10-11), 2605-2617.
17. (a) Chellam, S., Effects of Nanofiltration on Trihalomethane and Haloacetic Acid Precursor Removal and Speciation in Waters Containing Low Concentrations of Bromide Ion. *Environmental Science & Technology* **2000**, *34* (9), 1813-1820; (b) Harrison, C.; Le Gouellec, Y.; Cheng, R.; Childress, A., Bench-Scale Testing of Nanofiltration for Seawater Desalination. *Journal of Environmental Engineering* **2007**, *133* (11), 1004-1014; (c) Zhao, L.; Chang, P. C. Y.; Ho, W. S. W., High-flux reverse osmosis membranes incorporated with hydrophilic additives for brackish water desalination. *Desalination* **2013**, *308* (0), 225-232; (d) Wiśniewski, J. A.; Kabsch-Korbutowicz, M.; Łakomska, S., Ion-exchange membrane processes for Br⁻ and BrO₃⁻ ion removal from water and for recovery of salt from waste solution. *Desalination* **2014**, *342* (0), 175-182; (e) Zhao, L.; Ho, W. S. W., Novel reverse osmosis membranes incorporated with a hydrophilic additive for seawater desalination. *Journal of Membrane Science* **2014**, *455* (0), 44-54; (f) Deng, D.; Aouad, W.; Braff, W. A.; Schlumpberger, S.; Suss, M. E.; Bazant, M. Z., Water purification by shock electrodialysis: Deionization, filtration, separation, and disinfection. *Desalination* **2015**, *357* (0), 77-83.
18. (a) Chubar, N.; Kanibolotskyy, V.; Strelko, V.; Kouts, V.; Shaposhnikova, T., Adsorption of anions onto sol-gel generated double hydrous oxides. In *Soil and Water Pollution Monitoring, Protection and Remediation*, Twardowska, I.; Allen, H.; Häggblom, M.; Stefaniak, S., Eds. Springer Netherlands: **2006**; Vol. 69, pp 323-338; (b) Sánchez-Polo, M.; Rivera-Utrilla, J.; Salhi, E.; von Gunten, U., Removal of bromide and iodide anions from drinking water by silver-activated carbon aerogels. *Journal of Colloid and Interface Science* **2006**, *300* (1), 437-441; (c) Liang, L.; Li, L., Adsorption behavior of calcined layered double hydroxides towards removal of iodide contaminants. *J Radioanal Nucl Chem* **2007**, *273* (1), 221-226; (d)

- Mianowski, A.; Owczarek, M.; Marecka, A., Surface Area of Activated Carbon Determined by the Iodine Adsorption Number. *Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization, and Environmental Effects* **2007**, *29* (9), 839-850; (e) Lv, L.; Wang, Y.; Wei, M.; Cheng, J., Bromide ion removal from contaminated water by calcined and uncalcined MgAl-CO₃ layered double hydroxides. *Journal of Hazardous Materials* **2008**, *152* (3), 1130-1137; (f) Sánchez-Polo, M.; Rivera-Utrilla, J.; Méndez-Díaz, J.; López-Peñalver, J., Metal-Doped Carbon Aerogels. New Materials for Water Treatments. *Industrial & Engineering Chemistry Research* **2008**, *47* (16), 6001-6005; (g) Chubar, N., New inorganic (an)ion exchangers based on Mg-Al hydrous oxides: (Alkoxide-free) sol-gel synthesis and characterisation. *Journal of Colloid and Interface Science* **2011**, *357* (1), 198-209; (h) Ikari, M.; Matsui, Y.; Suzuki, Y.; Matsushita, T.; Shirasaki, N., Removal of iodide from water by chlorination and subsequent adsorption on powdered activated carbon. *Water Research* **2015**, *68* (0), 227-237; (i) Ge, F.; Shu, H.; Dai, Y., Removal of bromide by aluminium chloride coagulant in the presence of humic acid. *Journal of Hazardous Materials* **2007**, *147* (1-2), 457-462; (j) Ge, F.; Zhu, L., Effects of coexisting anions on removal of bromide in drinking water by coagulation. *Journal of Hazardous Materials* **2008**, *151* (2-3), 676-681; (k) Liang, L.; Wang, Y.; Wei, M.; Cheng, J., Bromide ion removal from contaminated water by calcined and uncalcined MgAl-CO₃ layered double hydroxides. *Journal of Hazardous Materials* **2008**, *152* (3), 1130-1137; (l) Hsu, S.; Singer, P. C., Removal of bromide and natural organic matter by anion exchange. *Water Research* **2010**, *44* (7), 2133-2140; (m) Ding, L.; Deng, H.; Wu, C.; Han, X., Affecting factors, equilibrium, kinetics and thermodynamics of bromide removal from aqueous solutions by MIEX resin. *Chemical Engineering Journal* **2012**, *181-182* (0), 360-370.
19. (a) Ma, Y.; Zhou, T.; Zhao, C., Preparation of chitosan-nylon-6 blended membranes containing silver ions as antibacterial materials. *Carbohydrate Research* **2008**, *343* (2), 230-237; (b) Zhu, X.; Bai, R.; Wee, K.-H.; Liu, C.; Tang, S.-L., Membrane surfaces immobilized with ionic or reduced silver and their anti-biofouling performances. *Journal of Membrane Science* **2010**, *363* (1-2), 278-286; (c) Vimala, K.; Mohan, Y. M.; Sivudu, K. S.; Varaprasad, K.; Ravindra, S.; Reddy, N. N.; Padma, Y.; Sreedhar, B.; MohanaRaju, K., Fabrication of porous chitosan films impregnated with silver nanoparticles: A facile approach for superior antibacterial application. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2010**, *76* (1), 248-258; (d) Ali, S. W.; Rajendran, S.; Joshi, M., Synthesis and characterization of chitosan and silver loaded chitosan nanoparticles for bioactive polyester. *Carbohydrate Polymers* **2011**, *83* (2), 438-446; (e) Das, S.; Das, M. P.; Das, J., Fabrication of porous chitosan/silver nanocomposite film and its bactericidal efficacy against multi-drug resistant (MDR) clinical isolates. *Journal of Pharmacy Research* **2013**, *6* (1), 11-15; (f) Gaafar, M. R.; Mady, R. F.; Diab, R. G.; Shalaby, T. I., Chitosan and silver nanoparticles: Promising anti-toxoplasma agents. *Experimental Parasitology* **2014**, *143* (0), 30-38; (g) Lavorgna, M.; Attianese, I.; Buonocore, G. G.; Conte, A.; Del Nobile, M. A.; Tescione, F.; Amendola, E., MMT-supported Ag nanoparticles for chitosan nanocomposites: Structural properties and antibacterial activity. *Carbohydrate Polymers* **2014**, *102* (0), 385-392; (h) Liu, C. X.; Zhang, D. R.; He, Y.; Zhao, X. S.; Bai, R., Modification of membrane surface for anti-biofouling performance: Effect of anti-adhesion and anti-bacteria approaches. *Journal of Membrane Science* **2010**, *346* (1), 121-130.
20. González, V.; Guerrero, C.; Ortiz, U., Chemical structure and compatibility of polyamide-chitin and chitosan blends. *Journal of Applied Polymer Science* **2000**, *78* (4), 850-857.
21. Qin, Y.; Zhu, C.; Chen, J.; Chen, Y.; Zhang, C., The absorption and release of silver and zinc ions by chitosan fibers. *Journal of Applied Polymer Science* **2006**, *101* (1), 766-771.
22. Morgan, M. E.; Jenkins, R. G.; Walker Jr, P. L., Inorganic constituents in American lignites. *Fuel* **1981**, *60* (3), 189-193.
23. Ferro-García, M. A.; Rivera-Utrilla, J.; Bautista-Toledo, I.; Moreno-Castilla, C., Adsorption of Humic Substances on Activated Carbon from Aqueous Solutions and Their Effect on the Removal of Cr(III) Ions. *Langmuir* **1998**, *14* (7), 1880-1886.

24. Boehm, H. P., Chemical Identification of Surface Groups. In *Advances in Catalysis*, D.D. Eley, H. P.; Paul, B. W., Eds. Academic Press: **1966**; Vol. Volume 16, pp 179-274.
25. Khulbe, K. C.; Feng, C. Y.; Matsuura, T., Synthetic Membranes for Membrane Processes. In *Synthetic Polymeric Membranes*, Springer Berlin Heidelberg: **2008**; pp 5-18.
26. Katarina, R. K.; Takayanagi, T.; Oshima, M.; Motomizu, S., Synthesis of a chitosan-based chelating resin and its application to the selective concentration and ultratrace determination of silver in environmental water samples. *Analytica Chimica Acta* **2006**, 558 (1-2), 246-253.
27. Rivera-Utrilla, J.; Sánchez-Polo, M., Ozonation of 1,3,6-naphthalenetrisulphonic acid catalysed by activated carbon in aqueous phase. *Applied Catalysis B: Environmental* **2002**, 39 (4), 319-329.

Conclusiones

Conclusiones

1.

Se ha sintetizado una nueva clase de rodaminas sensibles a pH, basadas en el fenómeno de transferencia electrónica fotoinducida (PET) intramolecular entre los grupos amino y el cromóforo excitado. Estas rodaminas contienen un grupo pentafluorofenilo que ha permitido su inmovilización en dos tipos de soporte sólido: poli(2-hidroxietil metacrilato) y partículas de sílice. La unión covalente se ha llevado de forma sencilla y efectiva mediante química clic (*click chemistry*). Los nuevos indicadores son adecuados para controlar el pH, tanto en estado disuelto como inmovilizados en soportes sólidos.

2.

Esta familia de rodaminas sensibles a pH se ha usado para desarrollar dos fases sensoras (inmovilizando el indicador **1** en partículas de sílice funcionalizadas con grupos mercapto y el **2** en partículas de poli(HEMA) entrecruzado, funcionalizadas con grupos amino). Ambas muestran fluorescencia brillante ($\Phi_F \approx 0.6$). Sus intervalos de trabajo encajan perfectamente con el intervalo de pH de interés para muchas aplicaciones biotecnológicas (entre 5 y 7). Además muestran buenos tiempos de respuesta ($\tau_{90} < 2$ min para los sensores basados en partículas de sílice y $\tau_{90} = 2-3$ min para los basados en poli(HEMA)), reversibilidad y estabilidad a largo plazo (una iluminación continua con un LED de 525 nm durante más de 5 horas no causó cambios en la señal de fluorescencia).

3.

Se han caracterizado tres complejos luminiscentes de Cu(I): $[\text{Cu}(\text{xantphos})(\text{dmp})]\text{PF}_6$, $[\text{Cu}(\text{xantphos})(\text{pzpy})]\text{PF}_6$ y $[\text{Cu}(\text{xantphos})_2]\text{PF}_6$ denominados CP04, CP05 y CP06 respectivamente, para la detección óptica de oxígeno, tras ser incorporados tanto en membranas clásicas de poliestireno, como sobre una matriz nanoestructurada de óxido

hidróxido de aluminio, denominada AP200/19. Todas las fases sensoras fueron estudiadas haciendo uso de herramientas avanzadas de comunicaciones para la excitación y el tratamiento de las señales de emisión obteniendo medidas de intensidad y tiempos de vida basados en cambios de fase. Las fases sensoras presentan reversibilidad completa y estabilidad a largo plazo. Además, las propiedades espectrales de estos indicadores no se ven afectadas por el soporte sólido.

4.

Las fases sensoras sensibles a oxígeno desarrolladas presentan buena sensibilidad para detectar concentraciones bajas y ultra bajas de oxígeno (por debajo de a 0.05 kPa pO₂). Las membranas más sensibles son las basadas en CP04 y CP05 inmovilizados en AP200/19 (K_{SV1} de 545 bar⁻¹ y 513 bar⁻¹, respectivamente, en el intervalo de 0-10 kPa pO₂). Concretamente el parámetro $\Delta\tau_{0.05}$ (33.55±0.37%) muestra que CP04-AP200/19 es más sensible a concentraciones ultra bajas que muchas de las fases sensoras publicadas en la literatura basadas en complejos de Ir(III), inmovilizados en el mismo tipo de soporte sólido y realizando las medidas en las mismas condiciones. Estos resultados convierten a las fases sensoras basadas en Cu(I) en una de las alternativas más baratas publicadas en la literatura para la detección de oxígeno a concentraciones ultra bajas.

5.

Se han desarrollado dos fases sensoras selectivas a mercurio, basadas en la incorporación de un indicador derivado de la rodamina espirociclo feniltiosemicarbazida, denominado FC1, en un nuevo copolímero afín al indicador. Para este fin se sintetizó un copolímero, poli(2-hidroxietil metacrilato-co-metil metacrilato), hidrofílico e insoluble en agua, sintetizado por polimerización radical por transferencia de átomo (ATRP) inversa, que se usó para desarrollar una membrana polimérica clásica y una tela de microfibras obtenidas por electrospinning de una mezcla polimérica que contenía el polímero anteriormente comentado.

6.

La fase sensora basada en la incorporación de FC1 en una membrana polimérica clásica presenta una fluorescencia intensa en presencia de mercurio (II), con un intervalo dinámico lineal comprendido entre 0.9 y 12 μM , y un límite de detección de 0.3 μM . Muestra una elevada selectividad hacia el mercurio y el metilmercurio, viéndose afectada únicamente por iones plata, que proporcionó una señal de luminiscencia detectable. La aplicabilidad de esta fase sensora se demostró analizando dos muestras reales de agua (grifo y mineral) con resultados satisfactorios (porcentajes de recuperación entre 107 y 96% con una desviación estándar menor del 5%).

7.

Haciendo uso del indicador FC1, del copolímero sintetizado y de técnicas de electrohilado, se ha desarrollado una tela no tejida compuesta por microfibras poliméricas, que incorporan en su interior al indicador FC1, selectivo a mercurio, sin modificar su capacidad de detección, pero mejorando sus características analíticas. Este nuevo material posee una elevada superficie específica, se puede manipular con facilidad y tiene alta resistencia mecánica, consistencia y flexibilidad.

Comparado con la fase sensora clásica desarrollada previamente, se ha conseguido mejorar la sensibilidad y el tiempo de respuesta, principalmente. Así, la nueva fase sensora responde selectivamente a la presencia de mercurio en medio acuoso, con un intervalo dinámico lineal comprendido entre 0.4 y 4 μM , con un límite de detección de 0.1 μM , y menor tiempo de respuesta, 15 minutos en lugar de los 50 minutos necesarios en las membranas clásicas. Por lo tanto, es posible concluir que el uso de técnicas de electrohilado aumenta la sensibilidad y disminuye el tiempo de respuesta en el uso de FC1 para determinar mercurio.

8.

Se han desarrollado nuevos materiales basados en membranas poliméricas de acetato de celulosa y quitosano, a las cuales se le han inmovilizado iones Ag para la eliminación de haluros en aguas de consumo humano. Estas membranas se han obtenido mediante el método de inversión de fases y se ha llevado a cabo su completa caracterización química y textural, además se ha demostrado su aplicabilidad en la eliminación de haluros en aguas superficiales (lago de Zurich y lago Greifensee).

9.

Se ha demostrado que la presencia de quitosano en este tipo de membranas es esencial para poder retener plata en su estructura y que un aumento de la cantidad de quitosano no afecta a la cantidad de plata retenida pero sí a la eficiencia con la que se eliminan los haluros. Además, se ha demostrado que este tipo de materiales es mucho más efectivo en la retención de haluros que las membranas clásicas que se usan en las plantas de tratamientos de agua, por lo que es interesante seguir investigando en este campo para comprender cómo afectan los diferentes parámetros sobre el poder de retención de los haluros y mejorar los prometedoros resultados obtenidos.

Conclusions

Conclusions

1.

A new class of pH-sensitive rhodamines has been synthesized. Their pH sensitivity is based on the intramolecular photoinduced electron transfer (PET) phenomena from non-protonated amino groups to the excited chromophore. These rhodamines contain a pentafluorophenyl group which enables their immobilization into two solid matrix supports: poly(2-hydroxyethyl methacrylate) and silica gel. The covalent linkage was carried out in a simple and effective way via "click" chemistry. The new dyes are suitable for pH monitoring not only in the dissolved state, but also as indicators in pH sensors.

2.

Two sensors have been developed by attaching these rhodamines in two different solid supports. **1** was linked by direct reaction with mercapto-functionalised silica gel beads, while another route involving **2** was employed for the attachment to amino-functionalised poly(HEMA) beads. Both sensors display bright fluorescence ($\Phi_F \approx 0.6$). Their sensitive range perfectly matches the pH range of interest for many biotechnological applications (i.e. pH 5–7). They also show good response times ($\tau_{90} < 2$ min for the sensor based on silica gel beads and $\tau_{90} = 2$ –3 min for the sensor based on poly(HEMA)), reversibility and long-term stability (continuous illumination with a 525 nm LED over more than 5 hours caused no changes in the fluorescence signal).

3.

Three luminescent complexes based on Cu(I) ($[\text{Cu}(\text{xantphos})(\text{dmp})]\text{PF}_6$, $[\text{Cu}(\text{xantphos})(\text{pzpy})]\text{PF}_6$ and $[\text{Cu}(\text{xantphos})_2]\text{PF}_6$ named CP04, CP05 and CP06 respectively) have been characterized for the development of optical oxygen sensors.: They have been immobilized into both a classical polystyrene membrane and an aluminium oxide-hydroxide

nanostructured matrix (AP200/19). All sensing layers were evaluated with advanced communication tools for excitation and emission signal treatment by measuring intensity and phase-based apparent lifetime. The films display full reversibility and long term stability. In addition, the spectral properties of these dyes are not affected by the solid support.

4.

The developed oxygen sensing layers show high sensitivity for the optical sensing of low and ultra-low oxygen concentrations (down to 0.05 kPa pO₂). The most sensitive sensing films are based on CP04 and CP05 immobilized into AP200/19 (K_{SV1} of 545 bar⁻¹ and 513 bar⁻¹, respectively, in the range 0-10 kPa pO₂). In particular the parameter $\Delta\tau_{0.05\%}$ (33.55±0.37%) shows that CP04-AP200/19 is more sensitive at ultra-low O₂ concentrations than films based on Ir(III) complexes immobilized into the same solid support, and performing the measurements in the same conditions. These results make the copper-based sensing films as one of the cheaper alternatives reported for ultra-low oxygen detection.

5.

Two different mercury-selective sensing layers have been developed. They are based on the incorporation of a spirocyclic phenylthiosemicarbazide rhodamine derivative (called FC1) into a novel hydrophilic water-insoluble copolymer, poly(2-hydroxyethyl methacrylate-co-methyl methacrylate), synthesized by Reverse Atom Transfer Radical Polymerization (ATRP). This new copolymer was applied for the development of a classic polymeric membrane as well as for the preparation of a microfibre nonwoven mat produced by electrospinning.

6.

The sensing layer based on the incorporation of FC1 into a classical polymeric membrane displays intense fluorescence in the presence of mercury (II), with a linear concentration range from 0.9 to 12 µM, and with a detection limit of 0.3 µM. It shows a high selectivity towards mercury (II) as well as methylmercury. Only Ag⁺ ion provided a detectable luminescence signal. The applicability of the sensing film has been demonstrated by analysing Hg²⁺ in two real samples (tap and mineral waters) with satisfactory results, showing recovery percentages between 107 and 96% with relative standard deviations lower than 5%.

7.

A nonwoven mat has been developed by combining FC1 dye, a synthesized copolymer and the electrospinning techniques. These microfibers incorporate the FC1 dye, without modifying its sensing ability and improving its analytic features. The new material possess a very

high specific surface and excellent mechanical properties: it can be easily manipulated and it has high mechanical strength, high consistency and high flexibility.

Compared with the classical polymeric membrane, the nonwoven mat displays a better sensitivity as well as a shorter response time. The new sensing layer responds with high selectivity towards mercury in a linear concentration range from 0.4 to 4.0 μM , with a detection limit of 0.1 μM , and its response time is 15 minutes, instead of 50 minutes provided by the FC1-classical polymeric sensing film. Therefore, it is possible to conclude that the use of electrospinning increases the sensitivity and decreases the response time in the use of FC1 to determine mercury.

8.

New materials have been developed for removing halides from drinking waters. These materials are based on cellulose acetate-chitosan polymer blends processed by phase inversion method and later doped with Ag ions. These membranes have been chemically and texturally characterized and their applicability for removing halides in surface waters has also been demonstrated in real samples (Lake Zurich and Lake Greifensee).

9.

It has been demonstrated that the presence of chitosan in this type of membranes is essential to retain silver into their structure as well as that an increase in the amount of chitosan does not affect the amount of silver loaded but it affects the removing efficiency. Furthermore, the obtained results show that the developed membranes have higher adsorption capacity for halides than a conventional activated carbon (Sorbo-Norit) which is a widely used material in drinking-water treatment plants. Anyway, they also reveal that further experiments have to be carried out in order to obtain more information about the effect of the different parameters on the adsorption capacity.