

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**

**Departamento de Química Orgánica I**



**SENSORES DE TEMPERATURA, pH Y DETERGENTES  
PARA CONTROL MEDIOAMBIENTAL CON UN  
PROTOTIPO QUE UTILIZA FIBRA ÓPTICA Y  
LUMINISCENCIA CON RESOLUCIÓN DE FASE**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR**

**PRESENTADA POR**

Nelia Bustamante Álvarez

Bajo la dirección del doctor

Guillermo Orellana Moraleda

**Madrid, 2001**

**ISBN: 84-669-1815-9**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**  
**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÁNICA I**



Sensores de temperatura, pH y detergentes  
para control medioambiental con un prototipo  
que utiliza fibra óptica y luminiscencia con  
resolución de fase

Director:  
**Dr. Guillermo Orellana Moraleda**  
*Profesor Titular de la U.C.M.*

**NELIA BUSTAMANTE ÁLVAREZ**

**Madrid, 2001**

*El trabajo que se recoge en esta Memoria ha sido realizado en la empresa Tecnología y Gestión de la Innovación (T.G.I.) y en el laboratorio de Fotoquímica Aplicada de la Facultad de CC. Químicas en la Universidad Complutense de Madrid, bajo la dirección del Prof. Dr. Guillermo Orellana, a quien quiero expresar mi más sincero agradecimiento por todos los conocimientos que de forma admirable me ha transmitido durante la realización de esta Tesis Doctoral.*

*Quiero agradecer a los Directores del Dpto. de Química Orgánica, el Prof. Antonio García Martínez y el Prof. Diego Armesto, su acogida en el mismo.*

*Agradezco asimismo al Ministerio de Educación y Cultura la concesión de una beca F.P.I. para la realización de la Tesis Doctoral.*

*Mi especial reconocimiento a Jesús Delgado y a Maxi Bedoya, de Grupo Interlab, responsables del resto de sensores que forman parte del Proyecto en el que se incluye esta Tesis, por la ayuda prestada en las medidas realizadas con el equipo DEMODE, así como en la caracterización analítica de los sensores.*

*A mis compañeros de T.G.I., actualmente formando parte de Grupo Interlab, los ingenieros Ernesto García Ares y José Luis García Alonso, quiero agradecerles lo mucho que he aprendido de optoelectrónica y felicitarles desde aquí por haber conseguido sacar adelante el equipo que nació al mismo tiempo que esta Tesis y con el que se han realizado gran parte de las medidas. Al Dr. Íñigo de Vicente y al resto de compañeros de T.G.I. que han colaborado de algún modo en sacar adelante el Proyecto (Esther Hidalgo, José Luis Ruiz, Alfonso Tichell y Cristina Viguera, entre otros) les agradezco asimismo su ayuda y su acogida en la empresa.*

*Mi gratitud a la Prof. M. Cruz Moreno-Bondi por contribuir con sus conocimientos en la faceta más analítica de este trabajo y a la Prof. Concepción Pérez Conde (Dpto. Química Analítica, UCM) por permitirme utilizar los espectrofluorímetros con los que se caracterizaron los indicadores ópticos y donde se llevaron a cabo algunas medidas adicionales.*

*Me gustaría dar las gracias a la Dra. Rocío Cuervo (Dpto. Química Orgánica, UCM) por su ayuda en la inmovilización de las sondas sintetizadas en los polímeros de metacrilato, así como a la Dra. Araceli González Cortés (Dpto. Química Analítica, UCM) por la ayuda prestada en la realización de las voltamperometrías cíclicas que se recogen en la Memoria.*

*A Elena Sánchez y a Susana Martínez les quiero agradecer el estupendo trabajo que realizaron en su Tesina de Licenciatura y su Proyecto fin de carrera, respectivamente, los cuales han formado parte de esta Tesis Doctoral.*

*A mis compañeros de laboratorio, con los que he compartido tantos buenos ratos y a quienes debo el montón de anécdotas divertidas que puedo recordar. A Emi, Ana, Jesús, Santi, Moli, Joseillo, David García y Cristina, mis compañeros de Orgánica, a Arantxa, la bioquímica y a Maxi, Elena BP, Susana, Loli y Fernando, los analíticos. A M. Paz, David Verano, David Ayala, Jaime, Paula, Pamela, Edu, Alicia, Guille, Carmen Gutiérrez, Marta, Hassan, Karen, Carmen Nieto, Alfonso... a todos los que pasaron por aquí y que se convirtieron en amigos y, en especial, a los que supieron escuchar en los momentos difíciles.*

*A Mar y a África, por estar siempre dispuestas a echarme una mano.*

*A Inés, Bárbara y al resto de amigos que han estado conmigo siempre. Espero tener más tiempo libre ahora para compartir con vosotros.*

*Y, finalmente, como recuerdo más especial, quiero agradecer a mi familia su paciencia (que sé que ha sido mucha) y su apoyo. A mis padres y a mis hermanos, gracias por todo.*

*A Miguel Ángel, por su confianza en mí, su apoyo constante y, sobre todo, por ayudarme a ver siempre el lado positivo de la vida.*

**ABREVIATURAS****ECUACIONES****PRÓLOGO** ..... 1**ANTECEDENTES GENERALES**

1. Sensores: Definición, propiedades y clasificación. ....	5
2. Sensores de fibra óptica (SFO). ....	7
2.1. Ventajas e inconvenientes de los optodos. ....	8
2.2. Clasificación de los SFO. ....	11
2.3. Instrumentación empleada en la fabricación de optodos.	
2.3.1. Fuentes de radiación. ....	15
2.3.2. Selectores de longitud de onda. ....	18
2.3.3. Fibras ópticas. ....	20
2.3.4. Detectores ópticos de radiación. ....	22
2.4. Métodos ópticos de medida.	
2.4.1. Absorbancia. ....	26
2.4.2. Luminiscencia. ....	27
2.5. Construcción del terminal sensible.	
2.5.1. Indicadores ópticos. Propiedades. ....	33
2.5.2. Soportes. Métodos de inmovilización. ....	36
2.6. Aplicaciones de los sensores de fibra óptica. ....	42
3. Complejos luminiscentes de Ru(II).	
3.1. Características generales. ....	47
3.2. Propiedades estructurales. ....	48
3.3. Niveles de energía y estados excitados. ....	49
3.4. Propiedades espectroscópicas.	
3.4.1. Espectros de absorción. ....	52
3.4.2. Espectros de emisión. ....	53
3.5. Propiedades electroquímicas. ....	56
3.6. Aplicaciones. Sensores de fibra óptica. ....	57

**DETECCIÓN SENSIBLE A LA FASE. SISTEMA DEMODE**

1. Luminiscencia con resolución temporal y con detección sensible a la fase. ....	59
2. Dispositivo instrumental para medidas con resolución de fase: equipo DEMODE. ....	62

## SENSOR ÓPTICO DE TEMPERATURA

1. Introducción. ....	69
2. Sensores ópticos de temperatura. ....	70
2.1. Termómetros ópticos luminiscentes. ....	73
2.2. Influencia de la temperatura en la luminiscencia de los complejos de Ru(II). ....	78
3. Planteamiento y objetivos. ....	83
4. Resultados y discusión.	
4.1. Selección del indicador. ....	85
4.2. Caracterización fotoquímica del indicador óptico en medio homogéneo. ...	95
4.3. Inmovilización de la sonda. Construcción del terminal sensible. ....	98
4.4. Caracterización fotoquímica del indicador óptico en medio microheterogéneo (PCA).	
4.4.1. Intensidad de luminiscencia. ....	103
4.4.2. Tiempo de vida de emisión. ....	105
4.5. Evaluación analítica del sensor.	
4.5.1. Intensidad de emisión. ....	107
4.5.2. Detección sensible a la fase. ....	109
a) Frecuencia óptima de modulación del LED de excitación. ....	111
b) Tiempo de vida aparente de la sonda inmovilizada. ....	113
c) Efecto de la concentración de indicador en el soporte. Repetibilidad, reproducibilidad y tiempo de respuesta del sensor ....	115
d) Interferencia del oxígeno disuelto. ....	119
5. Parte experimental.	
5.1. Reactivos y materiales empleados. ....	121
5.2. Procedimientos de inmovilización. ....	124
5.3. Dispositivo de medida. ....	126
5.4. Métodos y equipos empleados para la realización de las medidas.	
5.4.1. Selección del indicador. Medidas en disolución. ....	127
5.4.2. Caracterización de los terminales sensibles.	
a) Selección del soporte idóneo para la sonda. ....	128
b) Variación de las propiedades fotofísicas del indicador durante el proceso de inmovilización en el soporte. ....	129

c) Determinación de los tiempos de vida de emisión del complejo en fase sólida. ....	130
d) Respuesta del sensor de temperatura. Intensidad de emisión. ..	130
e) Validación del optodo en el dispositivo optoelectrónico desarrollado. ....	131
6. Conclusiones. ....	133

## SENSOR ÓPTICO DE pH

1. Introducción. ....	135
2. Fundamento y aspectos generales del pH. ....	136
3. Sensores ópticos de pH.	
3.1. Soportes y tipos de unión. ....	139
3.2. Clasificación de los optodos de pH.	
3.2.1. Absorbancia-reflectancia. ....	141
3.2.2. Fluorescencia. ....	144
3.2.3. Transferencia de energía resonante. ....	147
3.4. Complejos de Ru(II) en optodos de pH. ....	147
4. Planteamiento y objetivos. ....	159
5. Resultados y discusión. ....	161
5.1. Diseño molecular de los indicadores ópticos. ....	162
5.2. Síntesis, purificación y caracterización estructural de los indicadores. ....	165
5.2.1. Ligandos heterocíclicos. ....	166
5.2.2. Bis-quelatocomplejos de Ru(II). ....	167
5.2.3. Quelatocomplejos de Ru(II).	
a) [Tris(5-perfluorooctanamida-1,10-fenantrolina)]rutenio(II) [Ru(F15ap) <sub>3</sub> ] <sup>2+</sup> . ....	170
b) [Tris(5-perfluorooctanamida-1,10-fenantrolina)]rutenio(II) [Ru(F15ap) <sub>3</sub> ] <sup>2+</sup> . ....	173
c) [Bis(4,4'-disulfo-2,2'-bipiridina)(5-perfluorooctanamida-1,10-fenantrolina)]rutenio(II), [Ru(s2b) <sub>2</sub> (F15ap)] <sup>2-</sup> . ....	176
d) [Bis(1,10-fenantrolina)(5-amino-1,10-fenantrolina)]rutenio(II) [Ru(phen) <sub>2</sub> (5-NH <sub>2</sub> p)] <sup>2+</sup> . ....	178
e) [Bis(1,10-fenantrolina-4,7-di(fenilsulfonato)(2-(2'-piridil)imidazol)]rutenio(II), [Ru(s2d) <sub>2</sub> (pyim)] <sup>2-</sup> . ....	181

5.3.	Caracterización de los indicadores en disolución.	
5.3.1.	Parámetros espectroscópicos. ....	184
5.3.2.	Caracterización electroquímica. ....	187
5.3.3.	Comportamiento ácido-base en disolución. Selección de los indicadores. ....	188
	a) Constante de acidez en el estado fundamental. ....	193
	b) Constante de acidez en el estado excitado. ....	196
	c) Variación de los tiempos de vida de emisión con el pH. ....	199
5.4.	Inmovilización de los indicadores. Selección del soporte.	
5.4.1.	Inmovilización covalente: amino-PG. ....	207
5.4.2.	Adsorción: poli(tetrafluoroetileno) hidrofílico (H-PTFE). ....	208
5.4.3.	Inmovilización electrostática.	
	a) Membranas de Nafion®. ....	210
	b) Membranas catiónicas comerciales. ....	212
5.5.	Tiempo de vida de emisión de $[\text{Ru}(\text{s2d})_2(\text{pyim})]^{2-}/\text{Nylon}^+$ . ....	218
5.6.	Evaluación analítica del sensor $[\text{Ru}(\text{s2d})_2(\text{pyim})]^{2-}/\text{Nylon}^+$ . ....	220
5.6.1.	Influencia de la cantidad de indicador inmovilizada. ....	221
5.6.2.	Influencia de la fuerza iónica. ....	223
5.6.3.	Influencia de la disolución reguladora. ....	225
5.6.4.	Influencia de la temperatura. ....	227
5.6.5.	Influencia del oxígeno disuelto. ....	228
5.6.6.	Caracterización analítica. ....	230
5.6.7.	Frecuencia óptima de modulación de la luz de excitación. ....	231
6.	Parte experimental.	
6.1	Reactivos y materiales empleados. ....	233
6.2	Procedimientos de síntesis. ....	237
6.2.1.	Ligandos. ....	238
6.2.2.	Bisquelato complejos de Ru(II). ....	240
6.2.3.	Quelato complejos de Ru(II).	
	a) $[\text{Ru}(\text{F15ap})_3]^{2+}$ . ....	244
	b) $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{F15ap})]^{2+}$ . ....	246
	c) $[\text{Ru}(\text{s2b})_2(\text{F15ap})]^{2-}$ . ....	248
	d) $[\text{Ru}(\text{phen})_2(5\text{-NH}_2\text{p})]^{2+}$ . ....	250
	e) $[\text{Ru}(\text{s2d})_2(\text{pyim})]^{2-}$ . ....	252



6.3	Caracterización en disolución de los indicadores sintetizados. ....	254
6.4	Selección del indicador. Determinación del $pK_a$ en disolución. ....	257
6.5	Métodos de inmovilización.	
6.5.1.	Inmovilización covalente: amino-PG. ....	259
6.5.2.	Adsorción: poli(tetrafluoroetileno) hidrofílico. ....	259
6.5.3.	Inmovilización electrostática.	
	a) Membranas de Nafion®. ....	260
	b) Membranas catiónicas comerciales. ....	260
6.6	Respuesta del sensor al pH.	
6.6.1.	Dispositivo de medida. ....	261
6.6.2.	Intensidad de emisión. ....	261
6.6.3.	Medidas con resolución temporal. ....	262
6.6.4.	Medidas por detección sensible a la fase. ....	263
7.	Conclusiones. ....	265

## SENSOR ÓPTICO DE DETERGENTES

1.	Introducción. ....	269
2.	Métodos para la determinación de detergentes. ....	271
2.1.	Métodos ópticos.	
2.1.1.	Colorimétricos. ....	272
2.1.2.	Luminiscentes. ....	274
3.	Planteamiento y objetivos. ....	279
4.	Resultados y discusión.	
4.1.	Síntesis, purificación y caracterización estructural de los indicadores. ....	283
4.1.1.	Ligandos. ....	284
4.1.2.	Bisquelato complejos de Ru(II). ....	285
4.1.3.	Complejos heterolépticos de Ru(II) con dppz. ....	286
	a) $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{dppz})]^{2+}$ . ....	287
	b) $[\text{Ru}(\text{s2b})_2(\text{dppz})]^{2-}$ . ....	291
	c) $[\text{Ru}(\text{s2b})_2(\text{dppz})]^{2-}$ . ....	293
4.2.	Caracterización de los indicadores en disolución.	
4.2.1.	Parámetros espectroscópicos. ....	296
4.2.2.	Influencia de la concentración en las propiedades ópticas de los indicadores. ....	299
4.3.	Caracterización de los indicadores en medio micelar.	

4.3.1. Surfactante aniónico: SDS. ....	302
4.3.2. Surfactante catiónico: CTAB. ....	307
4.3.3. Surfactante neutro: TRITON X-100. ....	311
4.3.4. Tiempo de vida de emisión de los indicadores en medio micelar. ..	312
5. <b>Parte experimental.</b>	
5.1. <b>Reactivos y materiales empleados.</b> .....	315
5.2. <b>Procedimientos de síntesis.</b>	
5.2.1. Síntesis de ligandos. ....	318
5.2.2. Síntesis de bis-quelatocomplejos de Ru(II).....	320
5.2.3. Síntesis de quelatocomplejos de Ru(II) con dppz.	
a) Preparación de $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{pq})]^{2+}$ . ....	320
b) Preparación de $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{dppz})]^{2+}$ . ....	322
c) Preparación de $[\text{Ru}(\text{s2b})_2(\text{pq})]^{2-}$ y $[\text{Ru}(\text{s2d})_2(\text{pq})]^{2-}$ . ....	324
d) Preparación de $[\text{Ru}(\text{s2b})_2(\text{dppz})]^{2-}$ y $[\text{Ru}(\text{s2d})_2(\text{dppz})]^{2-}$ . ....	326
5.3. <b>Caracterización en disolución de los indicadores sintetizados.</b> .....	328
5.3.1. Variación de las propiedades ópticas de los indicadores en presencia de surfactantes. ....	330
6. <b>Conclusiones.</b> .....	333
 <b>TÉCNICAS Y EQUIPOS EMPLEADOS</b>	
1. Técnicas cromatográficas. ....	337
2. Microanálisis. ....	337
3. Espectroscopía de absorción infrarroja. ....	338
4. Espectroscopía de resonancia magnética nuclear. ....	338
5. Espectrometría de masas. ....	338
6. Espectroscopía de absorción ultravioleta-visible. ....	339
7. Espectroscopía de emisión en estado estacionario. ....	339
8. Espectroscopía de emisión con resolución temporal. ....	340
9. Voltametría cíclica. ....	340
 <b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	343

## LISTA DE ABREVIATURAS

$\theta$	Temperatura, en ° C
[bpy]	Hexafluorofosfato de [tris(2,2'-bipiridina)]rutenio(II), [Ru(bpy) <sub>3</sub> ](PF <sub>6</sub> ) <sub>2</sub> .
[bpz]	Hexafluorofosfato de [tris(2,2'-bipirazina)]rutenio(II), [Ru(bpz) <sub>3</sub> ](PF <sub>6</sub> ) <sub>2</sub> .
[dip]	Hexafluorofosfato de [tris(4,7-difenil-1,10-fenantrolina)]rutenio(II), [Ru(dip) <sub>3</sub> ](PF <sub>6</sub> ) <sub>2</sub> .
[phCl]	Cloruro de [bis(1,10-fenantrolina)(4-cloro-1,10-fenantrolina)]rutenio(II), [Ru(phen) <sub>2</sub> (4-Clp)]Cl <sub>2</sub> .
[phOH]	Hexafluorofosfato de [bis(1,10-fenantrolina)(4-hidroxi-1,10-fenantrolina)]rutenio(II), [Ru(phen) <sub>2</sub> (4-OHp)](PF <sub>6</sub> ) <sub>2</sub> .
[Ru(bpy) <sub>2</sub> (ddz)] <sup>2+</sup>	[Bis(2,2'-bipiridina)(dibenzo[h,j]dipirido[3,2-a:2',3'-c]fenazina)]rutenio(II)
[Ru(bpy) <sub>2</sub> (dppz)] <sup>2+</sup>	[Bis(2,2'-bipiridina)(dipirido(3,2-a:2',3'-c)fenazina)]rutenio(II),
[Ru(bpy) <sub>3</sub> ] <sup>2+</sup>	[Tris(2,2'-bipiridina)]rutenio(II)
[Ru(dip) <sub>3</sub> ] <sup>2+</sup>	[Tris(4,7-difenil-1,10-fenantrolina)]rutenio(II)
[Ru(F15ap) <sub>3</sub> ] <sup>2+</sup>	[Tris(5-perfluorooctanamida-1,10-fenantrolina)]rutenio(II)
[Ru(phen) <sub>2</sub> (5-NH <sub>2</sub> p)] <sup>2-</sup>	[Bis(1,10-fenantrolina)(5-amino-1,10-fenantrolina)]rutenio(II)
[Ru(phen) <sub>2</sub> (dppz)] <sup>2+</sup>	[Bis(1,10-fenantrolina)(dipirido[3,2-a:2',3'-c]fenazina)]rutenio(II)
[Ru(phen) <sub>2</sub> (F15ap)] <sup>2+</sup>	[Bis(1,10-fenantrolina)(5-perfluorooctanamida-1,10-fenantrolina)]rutenio(II)
[Ru(phen) <sub>2</sub> (tanphen)] <sup>4+</sup>	[Bis(1,10-fenantrolina)(4-(1',5',9'-triazanonil-1,10-fenantrolina)]rutenio(II)
[Ru(phen) <sub>3</sub> ] <sup>2+</sup>	[Tris(1,10-fenantrolina)]rutenio(II)
[Ru(pzth) <sub>3</sub> ] <sup>2+</sup>	[Tris(2-(2-pirazinil)-1,3-tiazol)]rutenio(II)
[Ru(s2b) <sub>2</sub> (dppz)] <sup>2-</sup>	[Bis(4,4'-disulfo-2,2'-bipiridina)(dipirido[3,2-a:2',3'-c]fenazina)]rutenio(II)
[Ru(s2b) <sub>2</sub> (F15ap)] <sup>2-</sup>	[Bis(4,4'-disulfo-2,2'-bipiridina)(1,10-fenantrolina-5-perfluorooctanamida)]rutenio(II)
[Ru(s2d) <sub>2</sub> (dppz)] <sup>2-</sup>	[Bis(4,7-di(sulfofenil)-1,10-fenantrolina)(dipirido[3,2-a:2',3'-c]fenazina)]rutenio(II)
[Ru(s2d) <sub>2</sub> (pyim)] <sup>2-</sup>	[Bis(4,7-di(sulfofenil)-1,10-fenantrolina)(2-(2'-piridil)imidazol)]rutenio(II)
[Ru(s2d) <sub>2</sub> (tdap)] <sup>2-</sup>	[Bis(4,7-di(sulfofenil)-1,10-fenantrolina)(5-tetradecanamida-1,10-fenantrolina)]rutenio(II)
<sup>13</sup> C-RMN	Resonancia magnética nuclear de <sup>13</sup> C
<sup>1</sup> H-RMN	Resonancia magnética nuclear de <sup>1</sup> H
4-Clp	4-cloro-1,10-fenantrolina
4-OHp	4-hidroxi-1,10-fenantrolina

5-NH <sub>2</sub> p	5-amino-1,10-fenantrolina
A	Absorbancia
AA	Ácido acrílico
AAS	Absorción atómica
AF	Aminofluorescencia
bpy	2,2'-bipiridina
BSA	Albúmina de suero bovino
BTB	Azul de bromotimol
CAG	Control automático de ganancia
CAI	Centros de apoyo a la investigación
CCD	<i>Charge coupled device</i> (dispositivo de carga acoplada)
CCF	Cromatografía en capa fina
CI	Conversión interna
CIS	Cruce inter sistemas
cmc	Concentración micelar crítica
CM-Sephadex <sup>®</sup>	Carboximetil Sephadex <sup>®</sup>
CP	Carbonato de propileno
CPG	<i>Controlled Pore Glass</i> (vidrio de poro controlado)
CTAB	Bromuro de hexadeciltrimetilamonio (cetiltrimetilamonio)
DBO	Demanda bioquímica de oxígeno
ddz	Dibenzo[h,j]dipirido[3,2-a:2',3'-c]fenazina
deaeap	4-(4'-dietilaminoetilamino)-1,10-fenantrolina
dip	4,7-difenil-1,10-fenantrolina
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamida
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dppz	Dipirido(3,2-a:2',3'-c)fenazina
DQO	Demanda química de oxígeno
EM	Espectrometría de masas
ENH	Electrodo normal de hidrógeno
EPA	<i>Environmental Protection Agency</i> (Agencia de Protección del Medioambiente)
ESI	<i>Electrospray ionization</i> (ionización por electropulverización)
F15ap	5-perfluorooctanamida-1,10-fenantrolina
FOCS óptica)	<i>Fiber Optical Chemical Sensors</i> (sensores químicos de fibra
FRET	<i>Fluorescence resonance energy transfer</i> (transferencia de energía de fluorescencia resonante)
GC	Cromatografía de gases
HEMA	Metacrilato de 2-hidroxietilo

HMMA	Metacrilato de hidroximetilo
HOMO	<i>Highest occupied molecular orbital</i> (orbital molecular ocupado de mayor energía)
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta resolución
H-PTFE	poli(tetrafluoroetileno) hidrofóbico
HPTS	1-hidroxipireno-3,6,8-trisulfonato sódico
$I_{em}$	Intensidad de emisión
IL	Intra ligando
IR	Infrarrojo
LD	<i>laser diode</i> (diodo láser)
Led	<i>Light emitting diode</i> (diodo fotoemisor)
LMCT	<i>Ligand-to-metal charge transfer</i> (transferencia de carga del ligando al metal)
LUMO	<i>Lowest occupied molecular orbital</i> (orbital molecular ocupado de menor energía)
MB	Azul de metileno
MC	<i>Metal centered</i> (centrado en el metal)
MLCT	<i>Metal-to-ligand charge transfer</i> (transferencia de carga del metal al ligando)
MS	Espectrometría de masas
NIR	<i>Near Infrared</i> (infrarrojo cercano)
P	Productos
PCA	Poli(cianoacrilato de etilo)
PDA	<i>Photodiode array</i> (fotodiodos en hilera)
PG	<i>Porous glass</i> (vidrio poroso)
phen	1,10-fenantrolina
Phhp	4-(2'-fenilhidrazina)-1,10-fenantrolina
PM	Peso molecular
PMMA	Poli(metacrilato de metilo)
PMT	<i>Photomultiplier tube</i> (tubo fotomultiplicador)
pp	Páginas
ppb	Partes por billón
ppm	Partes por millón
pq	fenantrolinaquinona
PT	Promoción térmica
PTFE	Poli(tetrafluoroetileno)
PVA	Poli(alcohol vinílico)
PVC	poli(cloruro de vinilo)

pyim	2-(2'-piridil)imidazol
pzth	2-(2-pirazinil)-1,3-tiazol
Ru	Rutenio
RV	Relajación vibracional
S <sub>0</sub>	Estado fundamental singlete
s2b	4,4'-disulfo-2,2'-bipiridina
s2d	4,7-di(sulfofenil)-1,10-fenantrolina
SDS	Dodecil sulfato sódico
SEPI	Sociedad Estatal de Participaciones Industriales
SFO	Sensores de fibra óptica
S <sub>n</sub>	Estado excitado singlete n ( $n \geq 1$ )
SNARF	Seminaftorodaminas
SP-Sephadex <sup>®</sup>	Sulfopropil Sephadex <sup>®</sup>
<i>t</i>	Tiempo
<i>T</i>	Temperatura, en K
T <sub>1</sub>	Estado excitado triplete
tanphen	4-(1',5',9'-triazanonil)-1,10-fenantrolina
tap	1,4,7,8-tetraazafenantreno
TBPE	Tetrabromofenoltaleína
TC-SPC	<i>Time-correlated single photon counting</i> (conteo de fotones individuales correlacionados con el tiempo).
tdap	5-tetradecanamida-1,10-fenantrolina
TGI	Tecnología y Gestión de la Innovación
TOC	<i>Total organic carbon</i> (carbono orgánico total)
tpphz	tetrapiridofenazina
TRH	Hidrazida del Rojo Texas
Triton X-100	Octilfenoxi-polietoxietanol
TRS	<i>Time-resolved spectroscopy</i> (espectroscopía con resolución temporal)
u.a.	Unidades arbitrarias
UCM	Universidad Complutense de Madrid
UV-VIS	Ultravioleta-visible

## LISTADO DE ECUACIONES

pág.

1.  $A_\lambda = \log \frac{I_0}{I_T} = \varepsilon_\lambda l c$  26
2.  $I = 2.3 \times I_0 \times \Phi \times \varepsilon \times c \times l \times k$  29
3.  $I_d/I_Q = 1 + K_{SV} [Q]$  30
4.  $\tau_d/\tau_Q = 1 + K_{SV} [Q]$  32
5.  $\Phi_{em} = \Phi_{CIS} \times \eta_r$  53
6.  $\tau = \frac{1}{\sum_i k_i} = \frac{1}{k_r + k_{nr}}$  54
7.  $I(t) = I_0 \exp(-t/\tau)$  59
8.  $I(t) = \sum_i \alpha_i \exp(-t/\tau_i)$  60
9.  $\tau_M = \frac{\sum_i \alpha_i \tau_i}{\sum_i \alpha_i} \quad \langle \tau \rangle = \frac{\sum_i \alpha_i \tau_i^2}{\sum_i \alpha_i \tau_i}$  60
10.  $\tau_\phi = \frac{\tan \phi}{\omega} \quad (\omega = 2\pi f)$  61
11.  $\tau_m = \frac{[(1/m^2 - 1)]^{1/2}}{\omega}$  61
12.  $\tau_\phi^{ap} = \frac{\sum_i \alpha_i \tau_i^2 / (1 + \omega^2 \tau_i^2)}{\sum_i \alpha_i \tau_i / (1 + \omega^2 \tau_i^2)}$  61
13.  $k_{obs} = k_0 + k_t(T)$  80
14.  $k_0 = k_r + k_{nr} = A80$
15.  $k_t(T) = B \exp(-\Delta E/kT)$  80
16.  $\tau_{obs} = \frac{1}{k_{obs}} = \frac{1}{A + B \exp(-\Delta E/kT)}$  81
17.  $S(T) = -\frac{d\tau_{obs}/dT}{\tau_{obs}} \times 100 = \frac{Q(\Delta E/kT^2) \exp(-\Delta E/kT)}{1 + Q \exp(-\Delta E/kT)} \times 100$  81

18.  $\tau = 1/k_{obs} = A + B_1 \exp(-\Delta E_1 / kT) + B_2 \exp(-\Delta E_2 / kT)$  85

19.  $\tau = \frac{\bar{\xi}_1 - \bar{\xi}_2}{\sqrt{\Sigma^2 \left( \frac{1}{v_1} + \frac{1}{v_2} \right)}}$        $\Sigma = \frac{(v_1-1)\sigma_1^2 + (v_2-1)\sigma_2^2}{v_1+v_2-2}$  117

20. pH = -log a<sub>H+</sub> 136

21. a<sub>H+</sub> = γ<sub>H+</sub> [H<sup>+</sup>] 137

22. pH ≈ -log[H<sup>+</sup>] 137

23. \_\_\_\_\_ 137

24. \_\_\_\_\_ 137

25. \_\_\_\_\_ 137

26. \_\_\_\_\_ 138

27. \_\_\_\_\_ 138

28. \_\_\_\_\_ 138

29. \_\_\_\_\_ 200

30. \_\_\_\_\_ 255

31. \_\_\_\_\_ 256

32. \_\_\_\_\_ 257



33.	—————	258
34.	———	258
35.	—— —	300
36.		341



Durante décadas, los esfuerzos de la comunidad científica se han centrado en la búsqueda de nuevas tecnologías con el fin de mejorar la *calidad de vida* de los seres humanos. Sin embargo, la progresiva industrialización de los países más avanzados se ha llevado a cabo, en muchos casos, sin tener en cuenta las consecuencias negativas que este proceso traería sobre el medio ambiente. Problemas como el deterioro de la capa de ozono, la lluvia ácida o el vertido incontrolado de sustancias contaminantes en nuestros ríos, despertaron la voz de alarma tanto en los países desarrollados responsables del deterioro sistemático del ecosistema, como en aquellos indirectamente perjudicados por éstos.

La irrefrenable lucha por mantenerse a la cabeza de los países más industrializados, junto al inevitable desembolso económico que conlleva la recuperación del medio dañado, dificultaron el establecimiento de normativas que obligaran a estos países a reconducir radicalmente su industria, priorizando la **protección del medio ambiente**. A pesar de ello, la gran preocupación existente a nivel mundial queda patente ya en el IV programa *Marco* de Investigación y Desarrollo, donde el Parlamento Europeo y el Consejo de la Unión Europea subrayaron la necesidad de llevar a cabo un control de la contaminación provocada por instalaciones industriales, remarcando la necesidad de búsqueda de nuevas tecnologías instrumentales que permitieran la observación, vigilancia y control ambiental.\*

El **agua**, elemento básico tanto en la industria como para el consumo humano, se ha convertido en el principal afectado por la contaminación doméstica e industrial. Varias normativas europeas están dedicadas exclusivamente a la protección del medio acuático, estableciendo el control exhaustivo de las aguas expuestas a efluentes potencialmente contaminantes. A pesar de que en el momento actual los métodos para la determinación de dichas sustancias en aguas se encuentran en continua evolución, la mayoría de ellos requieren la toma de muestra previa al análisis en el laboratorio, lo que excluye la detección inmeditada de situaciones de alarma. Se hace necesario, por tanto, la fabricación de **sensores** que permitan establecer *in situ* y en tiempo real la calidad del agua.

---

\* Decisión nº 1110/94/CE. *Diario oficial de las Comunidades Europeas*, nº L 126/1, 18-Mayo-1994.

El desarrollo y posterior validación de sensores para medidas de campo requiere la exposición del sensor a condiciones reales, así como su evaluación durante un período de tiempo prolongado que garantice medidas fiables y reproducibles. Estos dispositivos deben idealmente cumplir los requerimientos imprescindibles en medidas medioambientales (especificidad, sensibilidad, robustez...) siendo a la vez competitivos en cuanto a complejidad del sistema de medida y costes de mercado.

La gran potencialidad de los **sensores químicos de fibra óptica**, compatible con instrumentación de relativo bajo coste, ha impulsado su desarrollo en las dos últimas décadas, conduciendo al establecimiento de novedosos métodos ópticos para el análisis de contaminantes, tanto atmosféricos como en medio acuático. Sin embargo, sólo en contadas ocasiones alguno de estos sensores ha dado el salto del laboratorio a la industria, básicamente debido a un ensayo llevado a cabo en costosos equipos de laboratorio de prestaciones incomparables con los utilizados en medidas de campo. Esto, unido a la especificidad del método empleado, que impide la determinación de analitos diferentes con la misma técnica y, por consiguiente, con el mismo dispositivo instrumental, ha dificultado el desarrollo de estos sensores en el mundo “real” .

El proyecto bajo el que se ha realizado esta Tesis Doctoral, pretende eliminar las diferencias aparentemente insalvables entre la investigación básica y la escala industrial, construyendo un único **equipo multiparamétrico** basado en medidas de luminiscencia por *detección sensible a la fase*, cuyos componentes electrónicos de bajo coste permitan su comercialización en un futuro próximo. Para llevar a cabo este objetivo, es imprescindible combinar conocimientos en síntesis orgánica, fotoquímica, optoelectrónica e ingeniería medioambiental, que permitan el desarrollo de una familia de sensores ópticos basados en un único principio de medida, posibilitando así la fabricación de un dispositivo instrumental de componentes ópticos económicos. La puesta en el mercado de este equipo, no sólo requiere una intensa labor de investigación y desarrollo, sino que precisa una exhaustiva validación analítica de campo, exponiendo a condiciones reales los sensores optimizados en el laboratorio. Por todo ello, se constituyó en el origen de esta Tesis un consorcio mixto universidad-empresa formado por el Laboratorio de Fotoquímica Aplicada del Prof. G. Orellana (Departamento de Química Orgánica, Facultad de CC. Químicas, **Universidad Complutense** de

Madrid), el área de Ingeniería Electrónica de la empresa Tecnología y Gestión de la Innovación, S. A. (**TGI-grupo SEPI**, Madrid)<sup>#</sup> y **Grupo Interlab, S. A.** (Madrid). Cada uno de ellos ha aportado su gran experiencia en el campo de los sensores ópticos, la electrónica e instrumentación industrial y la medición de parámetros medioambientales, respectivamente, todos ellos pilares fundamentales para la realización del proyecto, parte del cual da cuenta esta Memoria.

---

<sup>#</sup> Durante la redacción de esta Memoria, se ha producido la desaparición de la Sección de Electrónica Industrial de T.G.I. y su incorporación a Grupo Interlab, S.A., en donde actualmente continúa el desarrollo de sensores ópticos y del equipo optoelectrónico, produciéndose en noviembre de 2000 la comercialización del mismo. Una versión más moderna de la que aquí se describe se encuentra disponible en la actualidad (OPTOSEN<sup>®</sup>).



## 1. SENSORES: DEFINICIÓN, PROPIEDADES Y CLASIFICACIÓN.<sup>1</sup>

A pesar del gran auge experimentado por los sensores en el campo analítico durante las dos últimas décadas, la comunidad científica aún no ha conseguido englobar la magnitud de este término en una única definición, que refleje las propiedades que les han conducido al lugar privilegiado en el que se encuentran hoy en día y que revelan un futuro prometedor. Básicamente, se denomina *sensor* al **dispositivo analítico capaz de responder en continuo, *in situ*, en tiempo real y de modo reversible a los cambios producidos en un parámetro físico o en la concentración de una especie química.**

Los sensores constan, en esencia, de tres partes: un **terminal sensible**, elemento de reconocimiento del sistema que responde selectivamente a los cambios que se producen en el analito objetivo, un **transductor** encargado de transformar las variaciones detectadas por el anterior en señales físicas, amplificadas y procesadas a continuación por un **sistema electrónico.**

La gran versatilidad que presentan los sensores es fácilmente atribuible al conjunto de **propiedades** que idealmente deben poseer todos ellos:

- **Pequeño tamaño.** Requisito imprescindible para la fabricación de sistemas de medida portátiles, necesarios en medidas de campo, facilitando al mismo tiempo el contacto entre el terminal sensible y la muestra en lugares de difícil acceso.
- **Sensibilidad, selectividad, precisión y exactitud** en las medidas. Parámetros fundamentales en cualquier procedimiento analítico.
- **Durabilidad.** El sensor debe mantenerse activo, es decir, sin perder ninguna de sus propiedades, el mayor tiempo posible. No obstante, una menor durabilidad del sensor puede verse compensada, en ocasiones, con la fabricación de terminales de corto tiempo operacional pero económicamente rentables.
- **Bajo coste.** Depende fundamentalmente de la electrónica de los equipos de medida y, generalmente, constituye un obstáculo insalvable para la comercialización de sensores ya optimizados a nivel de laboratorio.
- **Reversibilidad.** Idealmente un sensor debe ser completamente reversible, es decir, tras la interacción con el analito de interés debe ser capaz de recuperar las condiciones iniciales. Este requisito no constituye, sin embargo, una limitación

---

<sup>1</sup> Valcácel, M. y Luque de Castro, M. D., a) *Analyst*, **1993**, 118. b) "Flow-through Chemical Sensors", *Techniques and Instrumentation in Analytical Chemistry*, vol 16, Elsevier Science, Amsterdam (Holanda), **1994**.

para sistemas fácilmente regenerables e incluso en aquellos completamente irreversibles cuyo bajo coste permita la fabricación de sensores desechables.

- **Cortos tiempos de respuesta.** Al contrario que otras técnicas analíticas que requieren una toma de muestra previa al análisis en el laboratorio, los sensores permiten detectar situaciones de alarma en tiempo real.
- **Sencillez.** El sistema de medida y la fabricación del sensor deben facilitar un correcto manejo del mismo por personal de baja cualificación, permitiendo al mismo tiempo la construcción de terminales sensibles reproducibles.
- **Robustez.** Tanto del principio de medida, que debe permanecer inalterable, como del terminal sensible, imprescindible en medidas de campo donde el sensor se enfrenta en numerosas ocasiones a medios hostiles.

Dada la enorme magnitud que abarca el campo de los sensores, intentar clasificar estos sistemas de manera simple es prácticamente imposible. En el siguiente cuadro-resumen se han clasificado los sensores atendiendo a distintos criterios de actuación y configuración. En epígrafes posteriores se desarrollará con más detalle alguno de ellos.

**Tabla 1.** Clasificación general de los sensores, basada en diversos criterios de actuación y configuración, propuesta por Valcárcel y colaboradores.<sup>1b</sup>

CRITERIOS DE CLASIFICACIÓN							
	A	B	C	D	E	F	G
SENSOR	Químico Bioquímico Físico	Óptico Eléctrico Térmico Másico ...	Activo Pasivo	Integrado Conectado	Con separación Sin separación	Reversible Irreversible ( <i>sonda</i> <sup>2</sup> ): • Regenerable • Desechable	Tipo sonda Planos Tipo célula de flujo

A: Parámetro medible.

B: Tipo de transductor empleado.

C: En función de la existencia de reacción química entre la fase sensible y el analito.

D: Configuración fase sensora-transductor.

E: Cuando se requiere un proceso adicional.

F: Dependiendo de si la fase reactiva recupera las condiciones iniciales.

G: Configuración del sensor durante el proceso de medida.

<sup>2</sup> Wolfbeis, O. S., *Fresenius J. Anal. Chem.*, **1990**, 337, 522.

El término *sonda* se utiliza a menudo a nivel comercial, sin que implique necesariamente irreversibilidad.



## 2. SENSORES DE FIBRA ÓPTICA (SFO).<sup>3,4</sup>

El mundo de las telecomunicaciones ha experimentado un enorme crecimiento en los últimos años. Los continuos avances que se producen en el campo de la optoelectrónica han impulsado el desarrollo de los novedosos *sensores (químicos) de fibra óptica*, dispositivos de medida que evolucionan al ritmo de los últimos avances científico-tecnológicos.

Esta particular clase de sensores se caracteriza por poseer una **fase sensible**, donde en ocasiones se encuentra inmovilizado un **indicador**, cuyas **propiedades ópticas** se modifican en función de la concentración de *analito* (parámetro o especie objeto de la determinación) presente en la muestra. La señal óptica así generada es conducida a continuación a través de una **fibra óptica** hasta un detector, para más tarde ser amplificada y procesada convenientemente.

Los sensores de fibra óptica son más conocidos dentro de la comunidad científica como **optodos** u *optodos*. El primer término, utilizado originalmente en 1975 por los investigadores alemanes Optiz y Lübbers haciendo referencia a un sistema óptico de medida de CO<sub>2</sub>, procede en sus orígenes del griego *camino óptico* (*οπτιχοσ οδοσ*). La denominación *optodo*, a pesar de estar ampliamente aceptada, proviene del término “*optical electrode*”, lingüísticamente incorrecto ya que estos sensores no analizan una señal eléctrica como los electrodos, sino óptica. Por este motivo a lo largo de la presente Memoria adoptaremos el término *optodo* en referencia a estos sensores, al igual que la forma abreviada SFO.<sup>§</sup>

---

<sup>3</sup> Wolfbeis, O. S., *Fiber Optic Chemical Sensors and Biosensors*, vol I y II, CRC Press, Boca Raton, Florida (EE.UU.), 1991.

<sup>4</sup> Cánara, C. Moreno-Bondi, M. C. y Orellana, G., *Chemical Sensing with Fiberoptic Devices*, en *Biosensors with Fiberoptics*, Wise, D. L. y Wingard, L. B. (eds.), Humana Press, Clifton, Nueva Jersey (EE.UU.), 1991; cap. 2, 29.

<sup>§</sup> Dado que la inmensa mayoría de los optodos son químicos, en la bibliografía encontramos a menudo la abreviatura FOCS (*fiber optical chemical sensors*). En esta Memoria los denominaremos, sin embargo, SFO para no excluir con el término a los sensores físicos.

## 2.1. VENTAJAS E INCONVENIENTES DE LOS OPTODOS.

Los sensores de fibra óptica presentan las mismas ventajas atribuibles al resto de los sensores, a las que se unen adicionalmente algunas propiedades características de los optodos que los hace particularmente atractivos en áreas tan dispares como la biotecnología, el medio ambiente, la química clínica o el control de procesos industriales:

- **No requieren señal de referencia.** Al contrario que, por ejemplo, los sensores electroquímicos que miden diferencias absolutas de potencial, los optodos no necesitan una señal de referencia, lo que aumenta la estabilidad de la medida y reduce los costes en la fabricación de la instrumentación.
- **Posibilidad de aumentar la distancia analito-sensor.** La utilización de fibras ópticas de baja pérdida como guías de luz posibilita la medida a grandes distancias, facilitando el acceso del sensor a los lugares de medida. Las grandes profundidades en lagos o medios expuestos a interferencias electromagnéticas o radiación ionizante, al contrario que en sensores eléctricos convencionales, no constituyen un problema para los *SFO*, ya que la distancia entre el terminal sensible y el transductor puede adaptarse a las condiciones de medida sin que ello suponga pérdida de información. En química clínica, la utilización de este tipo de sensores evita la conexión directa del paciente al equipo eléctrico y, al no interferir sobre las fibras la radiación externa, son especialmente útiles en radioterapia.
- **Análisis multiparamétrico.** Las fibras ópticas pueden transmitir mucha más información que los cables eléctricos, debido a su mayor *ancho de banda*. Las señales ópticas originadas por la presencia de diferentes analitos en la muestra pueden diferir unas de otras en longitud de onda, fase, modulación de intensidad o polarización. Todas estas características de la señal pueden ser transmitidas simultáneamente por una misma fibra, posibilitando la detección de distintos analitos a la vez (*multiplexado*).
- **Terminales sensibles fácilmente intercambiables.** El análisis multiparamétrico puede llevarse a cabo también por intercambio de terminales sensibles específicos, cuyos indicadores basados en el mismo principio de medida permitan la utilización de un solo dispositivo instrumental. Esta ventaja de los sensores químicos de fibra óptica es particularmente útil en Química Clínica, ya

que facilita la esterilización de los terminales y posibilita la utilización de sensores desechables.

• **Utilización de fibras ópticas flexibles y de gran resistencia.** La flexibilidad de las guías de luz, junto a la separación física que éstas introducen entre el terminal sensible y el transductor y el hecho de que soportan medios hostiles como la presencia de radiaciones electromagnéticas o ionizantes, condiciones extremas de temperatura o el ataque de ácidos o bases presentes en las muestras, posibilitan la utilización de los optodos en multitud de procesos industriales.

A pesar de las enormes ventajas que poseen los sensores ópticos, para poder optimizar un método basado en este tipo de medidas es necesario tener en cuenta una serie de factores limitantes, de difícil solución en algunos casos pero no insalvables, gracias a los continuos avances de la técnica y la química:

□ **Interferencia de la luz externa.** La señal óptica detectada por el equipo de medida debe proceder única y exclusivamente del indicador, ya que es esta señal la que se encuentra en relación directa con la concentración de la sustancia determinante. Por este motivo, debe evitarse la exposición del terminal sensible a la luz ambiente, o bien modular la señal procedente del indicador con objeto de poder diferenciarla de la luz externa.

□ **Lavado o fotodegradación de los indicadores.** La exposición durante horas del sensor a fuentes de luz puede provocar la fotodegradación de los indicadores. Por otro lado, éstos se encuentran generalmente inmovilizados en membranas o soportes poliméricos en los que, en algunas ocasiones, puede producirse lavado. Los avances introducidos en el campo de los sensores ópticos han subsanado estos dos inconvenientes introduciendo nuevos métodos de medida en los que la cantidad de analito presente en la muestra no depende de la cantidad de indicador inmovilizado en el terminal sensible (sensores basados en medidas de la cinética de luminiscencia del indicador). En el resto de métodos ópticos se evita, en la medida de lo posible, la influencia de estos factores mejorando los procedimientos de inmovilización, utilizando indicadores fotoestables o bien con la oportuna calibración del sensor.

□ **Tiempos de respuesta, en ocasiones, elevados.** El soporte (membrana o matriz polimérica) donde se encuentra alojado el indicador, constituye junto con éste la base de los sensores ópticos. De ellos dependen, generalmente, el *tiempo de respuesta* del sensor (determinado por la accesibilidad del analito a la molécula sensible) y la *selectividad* del mismo, gracias a la impermeabilidad de la membrana hacia las sustancias interferentes.

□ **Irreversibilidad.** La existencia de pocos procesos en los que la interacción analito-indicador sea completamente reversible condiciona el carácter desechable o de obligada regeneración del sensor.

□ **Dependencia de la concentración de analito.** Una de las principales desventajas que presentan los optodos de electrolitos o pH, es que no miden actividad (como los electrodos), sino concentración, siendo por ello su señal analítica fuertemente dependiente de la fuerza iónica del medio.

□ **Interferencias o limitaciones introducidas por la fibra óptica.** Algunas fibras ópticas comerciales poseen algunas impurezas que pueden originar fenómenos de absorción, emisión o dispersión Raman. El material con que se fabrican estas fibras (plástico, vidrio o cuarzo) determina el intervalo útil de medida.

□ **Dependencia del método de la optoelectrónica del equipo.** Los SFO requieren fuentes de luz estables, de larga duración, económicas y de pequeño tamaño, además de fibras que no presenten interferencias en la región de medida y detectores de luz suficientemente sensibles y de coste aceptable. Por todo ello, el progreso en el campo de los optodos avanza paralelamente al de la optoelectrónica.

## 2.2. CLASIFICACIÓN DE LOS SENSORES DE FIBRA ÓPTICA.<sup>1b,3</sup>

Al igual que sucede con los sensores en general, no existe una única forma sencilla de clasificar los optodos. Probablemente, todos los SFO pueden ser ubicados en grupos diferentes a la vez, dada su gran versatilidad. Por este motivo, se detalla a continuación una clasificación basada en diversos criterios, procurando no excluir a ninguno de ellos.

- Atendiendo a la **naturaleza del parámetro objetivo**:
  - ❑ (BIO)QUÍMICOS: detectan especies químicas o bioquímicas (pH, O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, bacterias...).
  - ❑ FÍSICOS: responden a parámetros físicos, tales como la temperatura, presión, espesor, tamaño de partícula...etc.
- Dependiendo de la **propiedad óptica medida** (ampliamente desarrollado en el epígrafe dedicado a los métodos ópticos):
  - ❑ Sensores de ABSORBANCIA.
  - ❑ Sensores de REFLECTANCIA.
  - ❑ Sensores de LUMINISCENCIA.
    - a) Fluorescencia.
    - b) Fosforescencia.
    - c) (Bio)quimioluminiscencia.
- De modo general, los sensores de fibra óptica se pueden clasificar atendiendo a **la naturaleza del terminal sensible**:
  - ❑ QUÍMICOS: no involucran especies biológicas en la medida.
  - ❑ BIOSENSORES: la fase reactiva está constituida por biomoléculas o microorganismos (enzimas, anticuerpos, células...).
- Considerando la **función de la fibra óptica** en el sensor y la **configuración del terminal sensible**:
  - ❑ Sensores **EXTRÍ NSECOS**: optodos en los que la fibra óptica actúa únicamente como guía de luz.
    - a) DIRECTOS (de **1ª generación**, de *terminal desnudo*, o *pasivos*): el sistema detecta una propiedad óptica del analito mismo, proporcional a su concentración y directamente medible.

b) **INDIRECTOS** (*semiactivos*): la sustancia objeto de la determinación no posee ninguna propiedad óptica intrínseca que pueda ser medida directamente.

– de **2ª generación**: en un extremo de la fibra óptica se sitúa una fase sensible, la cual aloja un indicador (transductor) cuyas propiedades ópticas se modifican en función de la concentración del analito presente en la muestra.

– de **3ª generación**: el sensor requiere la presencia de una biomolécula que, o bien es generada por el analito y es detectada por el indicador, o de lo contrario interacciona con la sustancia a determinar para que ésta pueda detectarse.

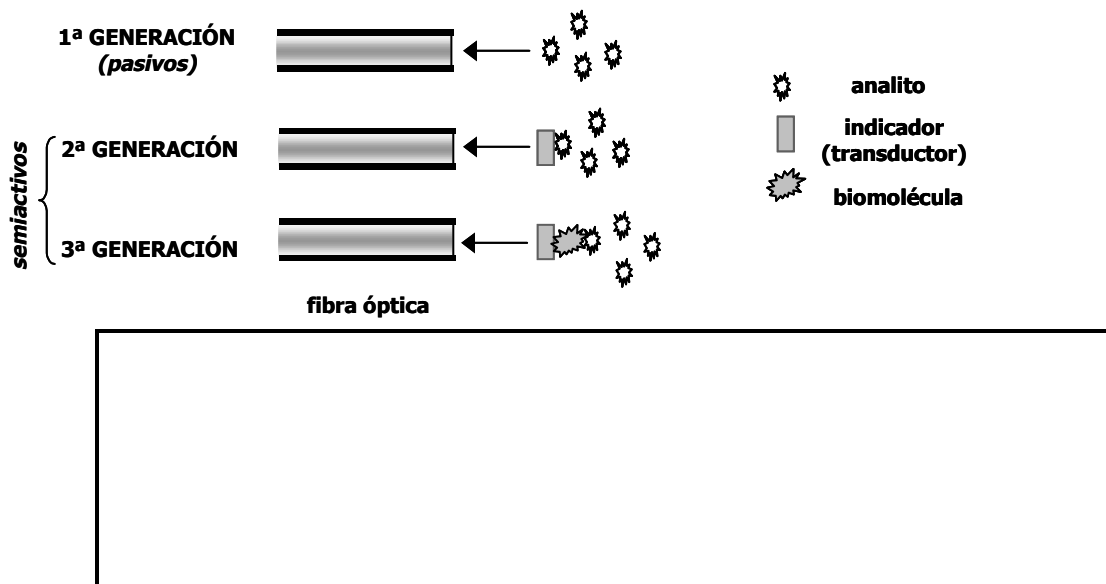


Figura 1. Representación esquemática de las tres configuraciones posibles que pueden adoptar los optodos extrínsecos.

□ Sensores **INTRÍNSECOS** (*activos* o de *onda evanescente*): el parámetro objetivo interacciona con el núcleo o la superficie de la fibra, modificando alguna de las propiedades de ésta. En este caso el dispositivo que actúa como guía de luz es, al mismo tiempo, el propio sensor.

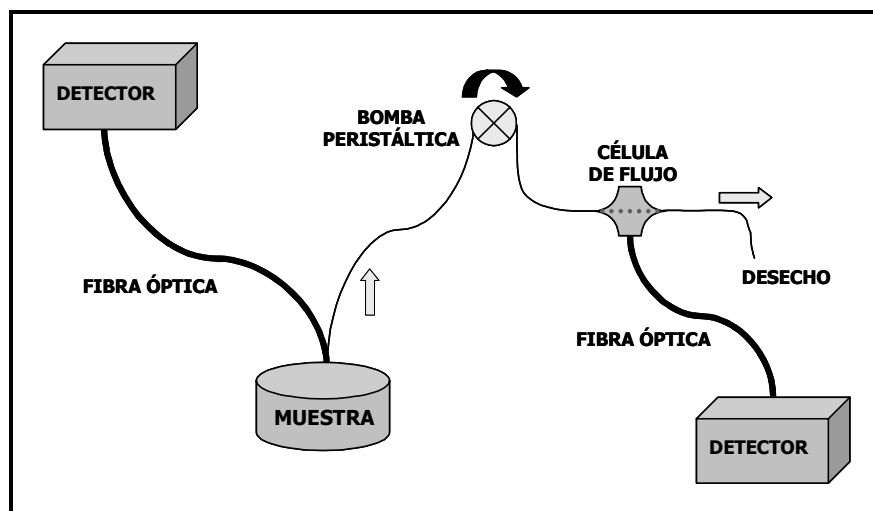
a) **Refractométricos**: la *onda evanescente*, transmitida desde el núcleo hacia el exterior de la fibra, interacciona con el analito (generalmente un

líquido) cuyo *índice de refracción* modifica las constantes de propagación de la fibra.

b) De **campo evanescente**: las características espectrales del *campo evanescente*, interfaz situada entre el núcleo y el revestimiento externo de la fibra, se ven modificadas debido a la absorción de luz por parte de moléculas situadas en él.

c) Sensores basados en la **modificación del núcleo de la fibra**: en este caso el analito modifica directamente las propiedades del núcleo, zona de mayor densidad de luz. La respuesta del sensor depende directamente de la accesibilidad del analito al núcleo.

- Teniendo en cuenta la configuración o **apariciencia externa** del sistema.
  - Sensores **tipo sonda**: la fibra óptica, con el terminal sensible en el extremo si se trata de optodos indirectos, se introduce directamente en la muestra.
  - Sensores tipo **célula de flujo**: la muestra se bombea hasta una célula de flujo, donde se encuentra la fase sensora. Estos *SFO* únicamente pueden trabajar en continuo.



**Figura 2.** Izq.: sensor tipo sonda. La fibra óptica se introduce directamente en la muestra. En los sensores tipo célula de flujo (dcha.) una bomba peristáltica conduce la muestra hasta una cubeta, donde se detecta el analito.

- Según el tipo de **interacción con el analito**:

- ❑ **REVERSIBLES:** la molécula sensible no se consume al interactuar con el analito (p. ej. sensor de pH).
- ❑ **IRREVERSIBLES:** la fase reactiva se consume durante la medida. Son conocidos como *sondas*, aunque realmente este término se utiliza a menudo sin que indique carácter de irreversibilidad.
  - a) **Regenerables:** se puede recuperar (con un reactivo adecuado) el estado inicial del sensor, por lo que son reutilizables (por ej. los inmunosensores).
  - b) **Desechables:** de un solo uso, se inactivan tras la interacción con el analito (ej. tiras de papel indicadoras de pH).
- Atendiendo a la **modificación** que el analito produce **en la señal óptica:**
  - ❑ Sensores de AMPLITUD (o modulados en intensidad): la sustancia objeto de análisis modifica la intensidad de la señal óptica observada (absorción, reflexión, luminiscencia,...).
  - ❑ Sensores INTERFEROMÉTRICOS: en este tipo de optodos se produce un cambio en el patrón de interferencia de la radiación electromagnética conducida a través de la fibra óptica.
  - ❑ Sensores de TIEMPO DE VIDA: la cinética de desactivación del estado excitado emisor del indicador situado en el terminal sensible varía en función de la concentración de analito presente en la muestra.
  - ❑ Sensores de MODULACIÓN MODAL: el transductor modula en estos optodos los rayos que viajan a distintos ángulos en la fibra.
  - ❑ Sensores POLARIMÉTRICOS: el cambio se produce en el ángulo de polarización de la luz.



## 2.3. INSTRUMENTACIÓN EMPLEADA EN LA CONSTRUCCIÓN DE OPTODOS.<sup>5</sup>

En los sensores de fibra óptica, de manera general, una **fuentes de luz** genera una radiación electromagnética, la cual se enfoca sobre un **sistema de monocromación**, encargado de seleccionar las longitudes de onda de la radiación luminosa en función de las características de la fase sensible. Una vez optimizada la señal, ésta se conduce a través de una **fibra óptica** hasta la muestra, donde se devuelve, ya modificada, hasta otro **monocromador**, responsable en este caso de hacer llegar hasta un **detector fotónico** únicamente la radiación modificada por el analito, para ser procesada y analizada posteriormente (figura 3).

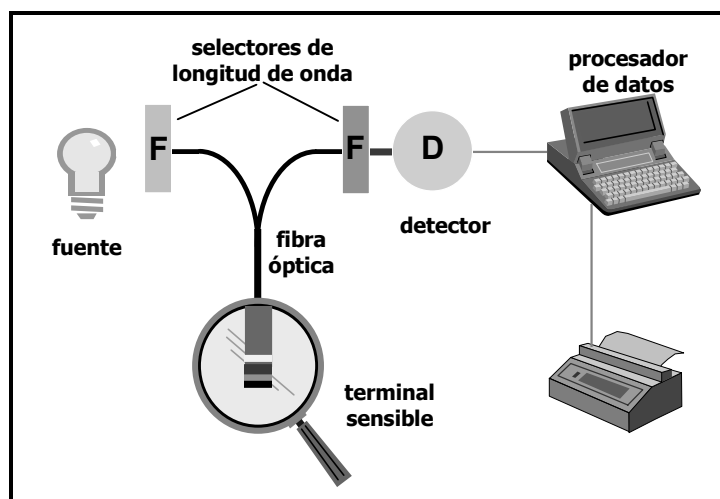


Figura 3. Esquema simplificado de los componentes de un sensor extrínseco semiactivo de fibra óptica.

### 2.3.1. FUENTES DE RADIACIÓN.

Una fuente de luz debe generar un haz de radiación con potencia suficiente para que la señal proveniente del terminal sensible se detecte con facilidad. Una de las características que ha de ser común a todas las fuentes utilizadas en la construcción de sensores ópticos es la **estabilidad** durante el periodo de tiempo de medida. La potencia de una fuente de luz varía de manera exponencial con el potencial de la fuente de alimentación eléctrica, por lo que a menudo éste debe

<sup>5</sup> Skoog, D. A. y Leary, J. J. *Análisis Instrumental* (4ª ed.), McGraw-Hill, Madrid, España, 1994.

regularse convenientemente. En algunos dispositivos de medida el problema de la estabilidad de la fuente luminosa se soluciona diseñando sistemas de doble haz que permiten recoger simultáneamente la señal de la fuente en ausencia de muestra, anulando así el efecto de las posibles fluctuaciones de la radiación electromagnética. Alternativamente, los sensores basados en el tiempo de vida de emisión de un fluoróforo indicador también están libres de la influencia de las fluctuaciones de la fuente de luz.

La elección de la fuente luminosa depende fundamentalmente de las propiedades espectroscópicas del analito (en métodos directos) o del indicador situado en el terminal sensible (métodos indirectos) y del coste y tamaño del dispositivo final. Las fuentes de luz más utilizadas en la fabricación de sensores de fibra óptica son:

#### **A) LÁMPARAS.**

- **Incandescentes.** La radiación electromagnética se genera, en este tipo de fuente, por *efecto Joule*: la corriente eléctrica es conducida a través de un filamento calentado hasta la incandescencia. Son fuentes de baja intensidad, por lo que se utilizan en medidas de absorbancia o reflectancia.
- **Lámparas de descarga.** En este tipo de fuente luminosa la lámpara se llena de un gas neutro, generalmente deuterio, mercurio o xenon. Una descarga eléctrica ioniza y excita el gas, cuya emisión origina una radiación característica. Tradicionalmente, en medidas de fotoluminiscencia se emplean las **lámparas de xenon**, que generan un espectro continuo en el intervalo 250-3000 nm. En algunos dispositivos instrumentales, esta fuente funciona de manera intermitente mediante descargas regulares procedentes de un condensador, lo que evita en muchos casos la fotodegradación de los indicadores, dada la alta intensidad de luz que generan.

## B) DIODOS FOTOEMISORES (*LEDs*) Y DIODOS LÁSER (*LDs*).

Un diodo es un dispositivo no lineal que presenta una mayor conductividad en una dirección que en otra. Se fabrica generando regiones adyacentes de tipo *n* (dotadas de exceso de electrones) y tipo *p* (deficientes en electrones) en un material semiconductor como germanio o silicio. Tanto los diodos fotoemisores, denominados comunmente *LEDs* (*light emitting diodes*), como los diodos láser (*LDs*), se caracterizan por la generación de fotones en el proceso de recombinación de pares electrón-hueco en las uniones *pn*. La diferencia entre estos dos sistemas estriba en que en los primeros la emisión de luz es espontánea, en contraste con la emisión estimulada de los *LDs*, con la que se genera un mayor número de fotones con las propiedades de coherencia y direccionalidad que posee la radiación láser.

Tabla 2. Parámetros característicos de distintos *LEDs* obtenidos a partir de diversos materiales semiconductores.<sup>6</sup>

COLOR	MATERIAL	$\lambda_{\text{em máx}}$ (nm)	INTENSIDAD LUMINOSA (mCd)	POTENCIA DE SALIDA ( $\mu\text{W}$ )	EFICIENCIA CUÁNTICA (%)
ROJO	GaAlAs	660	1790	4855	12.83
VERDE	AlInGaP	570	1000	400	1.0
	GaP	555	100	40	0.1
	ZnTeSe*	512	4000	1300	5.3
	InGaN	520	12000	3000	6.3
AZUL	SiC	470	20	20	0.04
	ZnCdSe*	489	700	327	1.3
	GaN**	470/450	2500/1000	5000	9.1

\* *LEDs* no comerciales.

\*\* También se han desarrollado y comercializado recientemente con emisión ultravioleta a 370 nm.

En los últimos años, los avances experimentados en el campo de los materiales semiconductores y dopantes han permitido el desarrollo de novedosos *LEDs* que han conseguido ampliar la región del espectro electromagnético donde son útiles, así como su eficiencia fotónica e intensidad luminosa (tabla 2). La

<sup>6</sup> Nakamura, S. y Fasol, G., *The Blue Laser Diode*, Springer, Berlin (Alemania), 1997; p. 215.

principal ventaja que presentan estos dispositivos es su **bajo coste** que, unido a sus **pequeñas dimensiones** y **escaso consumo energético**, les convierten en idóneas fuentes de luz para los optodos, motivos por los cuales se seleccionó un *led* azul como fuente de excitación de los indicadores ópticos desarrollados en el seno de este Proyecto. La mayor desventaja radica en la gran dependencia de su emisión con la temperatura, de obligada corrección en los equipos que utilicen estos sistemas, así como la emisión secundaria que presentan los *LEDs* azules y violetas.

### **C) LÁSERES.<sup>7</sup>**

La fuente láser, acrónimo de *light amplification by stimulated emission of radiation*, ha sido ampliamente utilizada en instrumentación analítica debido a la **elevada intensidad**, **estrecho ancho de banda** y naturaleza **coherente** de la señal producida tras la excitación de la especie activa mediante el paso de corriente eléctrica, descarga o por exposición a una fuente radiante intensa.

Las principales limitaciones que presentan estos dispositivos son su **elevado coste** y emisión de luz típicamente por encima de 600 nm. Sin embargo, recientemente se han desarrollado novedosos láseres azules y verdes de menor costo con los que probablemente aumentará, en un futuro próximo, la aplicación de estas fuentes de luz en el campo de los sensores ópticos.

#### **2.3.2. SELECTORES DE LONGITUD DE ONDA.**

No existe ningún dispositivo selector de longitud de onda que consiga una única  $\lambda$  o frecuencia. Por el contrario, lo que se obtiene con estos sistemas es una distribución de longitudes de onda, siendo el **ancho efectivo de la banda** una medida inversa de su efectividad, ya que cuanto más estrecho sea éste mejor será la resolución conseguida y, con ello, la sensibilidad y selectividad del método. En medidas de absorbancia o reflectancia se coloca uno de ellos justo antes del detector, mientras que en luminiscencia se requieren dos: uno situado en el canal

---

<sup>7</sup> Svelto, O., *Principles of Lasers* (4ª ed.), Plenum, Nueva York (EE. UU.), 1998.

de excitación y otro en el de emisión (excepto cuando se emplean láseres como fuentes de luz).

Existen dos clases de sistemas selectores de longitudes de onda:

## A) FILTROS.

- **Filtros de absorción.** Estos filtros se basan en la absorción de luz en ciertas zonas del espectro electromagnético, transmitiendo en aquellas bandas que se pretendan seleccionar. Suelen ser más baratos que los filtros interferenciales anteriormente descritos y están fabricados a partir de vidrios coloreados o colorantes suspendidos en gelatina y colocados entre dos placas de vidrio. Dentro de estos sistemas selectores de longitudes de onda, se pueden distinguir dos tipos:

- Filtro de **banda ancha** (*band pass*). Dejan pasar una región del espectro electromagnético, caracterizada por la longitud de onda central de transmisión máxima.
- Filtro de **corte** (*cut-off*). Tienen *transmitancias* cercanas al 100 % en una zona del espectro visible, disminuyendo con rapidez hasta alcanzar valores próximos a cero en el resto.

- **Filtros de interferencia (o de Fabry-Perot).** Constituidos por un material *dieléctrico* transparente (generalmente fluoruro de calcio o magnesio) colocado entre dos películas metálicas semitransparentes, las cuales se sitúan a su vez entre dos placas de vidrio o algún otro material transparente. El grosor del dieléctrico determina la longitud de onda de la radiación transmitida, la cual depende directamente de los fenómenos de interferencia que se producen en esta interfase.

Los filtros son la elección más idónea cuando se pretende construir equipos sencillos y de bajo coste. A pesar de que los de absorción son más económicos, el equipo que ha desarrollado T.G.I. incorpora un filtro interferencial con objeto de evitar el efecto parásito derivado de la transmisión de luz de excitación en la región espectral de interés (600 nm) observada en los distintos filtros de absorción evaluados.

## B) MONOCROMADORES.

Los monocromadores están diseñados para realizar barridos espectrales en aquellos métodos en los que sea imprescindible poder variar, de forma continua y en un amplio intervalo, la longitud de onda de la radiación electromagnética procedente de la fuente. Estos sistemas constan de una **rendija de entrada** de luz, una **lente o espejo colimador**, que produce un haz paralelo de radiación, un **prisma o una red de reflexión** y un **elemento focalizador** que conduce de nuevo la imagen hasta el denominado *plano focal*, donde se encuentra situada la **rendija de salida**, encargada de aislar la banda espectral deseada.

La *anchura de banda efectiva* de un monocromador depende de la dispersión de la red o prisma, así como de la anchura de las rendijas de entrada y salida. Si se requiere una gran resolución espectral, es preferible utilizar una pequeña apertura de rendijas, pero teniendo en cuenta que este estrechamiento origina una disminución pronunciada en la potencia de la radiación.

### 2.3.3. FIBRAS ÓPTICAS.<sup>8</sup>

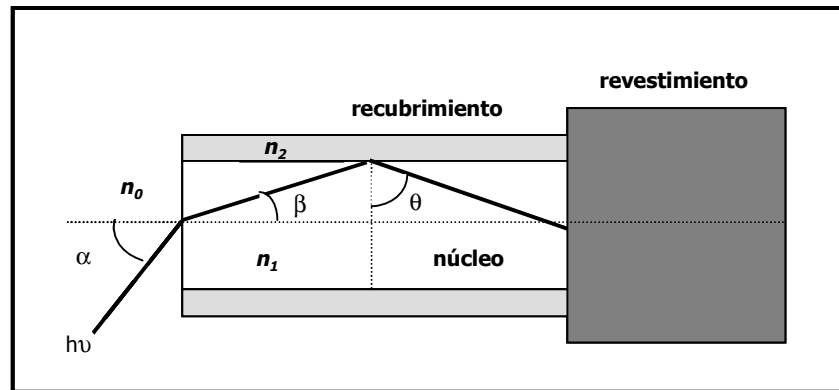
Durante los últimos 30 años, el mundo de las Telecomunicaciones ha asistido a la implantación de las fibras ópticas, que han ido sustituyendo poco a poco a los tradicionales conductores metálicos. Constituidas por finas hebras de vidrio, sílice fundida o plástico, estas fibras son capaces de **transmitir luz a grandes distancias**, con una **mínima atenuación y dispersión** de la señal, lo que evita la utilización de repetidores o amplificadores intermedios. Su enorme **ancho de banda** (cantidad de información que puede transmitir la fibra), **pequeño tamaño**, **flexibilidad** e **inmunidad** ante **interferencias electromagnéticas** externas, son ventajas adicionales que han popularizado el uso de estas guías de luz en campos tan diversos como la medicina y los sensores ópticos.

Los cables ópticos constan de tres componentes: un **núcleo** central (*core*), región central de la fibra encargada de la transmisión de luz, un **revestimiento** (*cladding*) que rodea al núcleo y un **recubrimiento** (*coating*) consistente en una

---

<sup>8</sup> Yeh, C., *Handbook of Fiber Optics, Theory and Applications*, Academic Press, Nueva York (EE.UU.), 1990.

capa de un material plástico o metálico aplicado durante el proceso de fabricación de la fibra, que se encarga de protegerla frente al medio externo.



**Figura 4.** Transmisión de la luz a través de la fibra óptica. Este fenómeno sigue la *ley de Snell*:  $n_0 \text{sen} \alpha = n_1 \text{sen} \beta$ , siendo  $\alpha$  y  $\beta$  los ángulos de incidencia y refracción y  $n_0$ ,  $n_1$  y  $n_2$  los índices de refracción del medio externo, del núcleo de la fibra óptica y de su recubrimiento, respectivamente ( $n_1 > n_2$ ).

Cuando un haz de luz pasa de un medio más denso a otro de menor densidad se produce la *reflexión* de la radiación. La fracción de luz incidente que se refleja es mayor a medida que aumenta el ángulo de incidencia ( $\alpha$ ), siendo la **reflexión total** por encima de un ángulo  $\theta$ , denominado **ángulo crítico**. Durante el proceso de reflexión, el haz de luz penetra en cierta profundidad en el medio menos denso antes de reflejarse. La fracción de luz que penetra dentro del recubrimiento, denominada **onda evanescente**, depende de la longitud de onda de la radiación incidente, de los índices de refracción de los dos medios y del ángulo del haz con respecto a la interfaz núcleo-recubrimiento.

Los materiales que se emplean en la fabricación de las fibras ópticas dependen, en gran medida, del tipo de radiación que se pretenda transmitir. Así, las fibras cuyo núcleo es de **sílice fundida** o de **cuarzo** transmiten luz en el ultravioleta y visible, mientras que las de **vidrio** o **plástico**, más económicas, lo hacen sólo en el visible. El recubrimiento de la fibra se fabrica siempre con materiales resistentes al medio donde vayan a operar.

Los sistemas que utilizan fibras ópticas, como los optodos, requieren **acopladores ópticos** que eviten la pérdida de luz desde que ésta sale de la fuente hasta que llega al detector óptico. Para ello, generalmente se utilizan lentes de vidrio o cuarzo que se encargan de focalizar la radiación luminosa.

La **configuración** de la fibra óptica, como cable conductor de la radiación luminosa, es asimismo un factor muy importante a la hora de construir el terminal sensible. Así, en los optodos la luz puede llegar a éste a través de una **única** fibra, una fibra **doble** o un **haz** de fibras (figura 5). A su vez, en esta última configuración, las fibras pueden distribuirse **al azar** en el extremo común o bien diferenciando los canales de luz procedentes de la fuente y el terminal sensible.

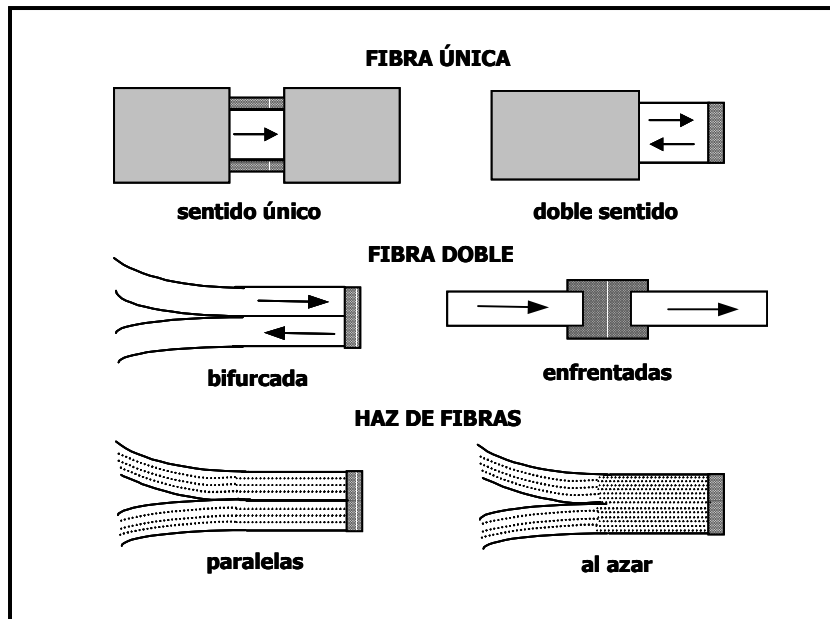


Figura 5. Distintas configuraciones fibra óptica-terminal sensible empleadas en la construcción de optodos.<sup>4</sup>

#### 2.3.4. DETECTORES ÓPTICOS DE RADIACIÓN.<sup>9</sup>

Idealmente, los detectores deben tener para un amplio intervalo de longitudes de onda una elevada sensibilidad, buena relación señal/ruido, una respuesta constante, rápido tiempo de respuesta y mínima señal de salida en ausencia de iluminador (*corriente oscura*). De manera general, se pueden clasificar los detectores dentro de dos grandes grupos: los que responden a la radiación y los que son sensibles al calor. En esta Memoria, se desarrollarán únicamente los detectores fotónicos:

<sup>9</sup> Dereniak, E. L. y Crowe, D. G., *Optical Radiation Detectors*, Wiley, Nueva York (EE. UU.), 1984.



## A) CÉLULAS FOTOVOLTAICAS.

Este sistema de detección está constituido por un primer electrodo plano, de cobre o hierro, sobre el que se deposita una capa de un material semiconductor (selenio), recubierto externamente por una fina película transparente de oro o plata (electrodo colector). La radiación electromagnética genera una corriente eléctrica en la interfase entre la capa semiconductor y el metal, cuya magnitud es proporcional al número de fotones que incide inicialmente sobre dicha capa.

Las células fotovoltaicas se utilizan principalmente en la **región visible** del espectro electromagnético, ya que su respuesta es máxima a 550 nm. Son sistemas muy **robustos, económicos** y **no requieren una fuente externa de energía eléctrica** por lo que se usan mayoritariamente en instrumentos sencillos y portátiles. Las principales desventajas que presentan estos detectores son la **falta de sensibilidad a niveles bajos de señal**, debido a que la pequeña resistencia interna de la célula dificulta la amplificación de la señal de salida, así como la disminución gradual que se observa en dicha señal tras una iluminación continuada.

## B) TUBOS FOTOMULTIPLICADORES (PMTs).

En estos dispositivos, un cátodo semicilíndrico y un filamento anódico se colocan en un recipiente transparente cerrado herméticamente a vacío. Cuando se irradia el cátodo, la energía del haz incidente se transforma en un flujo de fotones gracias al efecto fotoeléctrico que tiene lugar en una serie de electrodos, denominados dínodos, situados entre el cátodo y el ánodo y que amplifican la señal del orden de  $10^6$  veces.

Los fotomultiplicadores son **muy sensibles** a las radiaciones **ultravioleta y visible** y sus **tiempos de respuesta** son extremadamente **rápidos**. Generalmente, la sensibilidad de estos detectores está limitada por su corriente oscura, debida fundamentalmente a emisión térmica, por lo que puede minimizarse fácilmente por enfriamiento. Estos sistemas se utilizan únicamente para medir radiaciones de baja potencia, ya que la luz intensa causa un daño irreversible en la superficie fotoeléctrica, razón por la cual se alojan convenientemente en compartimentos herméticamente cerrados.

### C) DETECTORES DE FOTOCONDUCTIVIDAD.

Son los detectores más sensibles para el **infrarrojo cercano (NIR)**. Están constituidos por semiconductores cuyas resistencias disminuyen cuando absorben luz en esa zona del espectro, aunque su intervalo útil de medida puede ampliarse con enfriamiento. Estos semiconductores cristalinos están constituidos por sulfuros, seleniuros o telururos de metales como plomo, cadmio, galio e indio, depositados sobre unas placas de vidrio o cuarzo que constituyen la célula de medida, cerrada herméticamente a vacío.

### D) FOTODIODOS DE SILICIO.

Consisten en uniones tipo *pn* polarizadas inversamente y montadas sobre un chip de silicio (ver epígrafe 2.3.1.B). La polarización inversa genera una *capa de agotamiento* que reduce casi a cero la *conductancia* de la unión. Al incidir la luz sobre el circuito integrado se generan huecos y electrones en dicha capa, dando lugar a una corriente eléctrica, proporcional a la potencia de la radiación electromagnética.

Estos detectores, de sensibilidad inferior a la de los tubos fotomultiplicadores, presentan un intervalo espectral de unos 190 a 1100 nm. Cuando se requiere la detección de luz en la región infrarroja suelen ser sustituidos por fotodiodos de germanio o InGaAs.

Todos estos sistemas de detección de fotones están empezando a ser sustituidos, en la actualidad, por **detectores multicanal**, consistentes en una alineación de diminutos detectores fotosensibles dispuestos en una estructura que permite medir, al mismo tiempo, todos los elementos de un haz de luz dispersados por una red. Dentro de éstos, podemos destacar:

#### □ **FOTODIODOS EN HILERA** (o **PDA**, del inglés *photodiode array*).

Constituidos por una serie de fotodetectores de sílice, denominados *pixels*, que se sitúan alineados en una fila. Están especialmente indicados para medir

radiaciones de **media a alta intensidad** por la elevada *corriente oscura* que generan. Para sistemas de baja intensidad, se incorpora a estos detectores un intensificador de imagen, pasando a denominarse **IPDA** (*intensified photodiode array*), con el grave inconveniente de que se introduce un ruido adicional y se pierde resolución.

□ **DISPOSITIVOS DE CARGA ACOPLADA (CCD, charge coupled device).**

Estos detectores multicanal permiten el rápido procesado de imágenes con una sensibilidad varios órdenes de magnitud superior a la del fotodiodo en hilera. Los utilizan las cámaras de video convencionales y están constituidos por un número determinado de elementos detectores individuales (*pixels*) compuestos, cada uno de ellos, por una serie de electrodos conductores situados sobre una matriz silícea. Cuando concluye el periodo de exposición (tiempo durante el cual la luz incide sobre el *pixel*), la carga almacenada por los electrodos se transfiere secuencialmente de un elemento detector a otro, hasta alcanzar un amplificador situado al final de la hilera de *pixels*.

Los dispositivos de carga acoplada son los detectores multicanal más **sensibles** que se conocen actualmente. Por este motivo, están especialmente recomendados en aquellos casos en los que se irradian muestras fotodegradables, ya que su alta sensibilidad permite disminuir el nivel de iluminación. Poseen, además, un **bajo consumo de energía**, característica idónea para el desarrollo de sistemas portátiles, aunque por el momento son **más caros** que los fotodiodos convencionales o los tubos fotomultiplicadores.

## 2.4. MÉTODOS ÓPTICOS DE MEDIDA.

Los sensores de fibra óptica se basan en los efectos surgidos de la interacción de la radiación electromagnética con la materia. No sólo se puede extraer información de la intensidad de la luz, sino que muchos otros fenómenos físicos que caracterizan la radiación luminosa constituyen la base de los optodos. Así, atendiendo a la propiedad óptica en la que se basan, se fabrican SFO de absorbancia, luminiscencia, reflectancia, dispersión Raman, onda evanescente o índice de refracción. En el siguiente epígrafe se desarrollan con detalle los métodos basados en medidas de luminiscencia, empleados en el desarrollo de los sensores ópticos objeto de este Proyecto, mencionando brevemente a continuación los principios en los que se fundamentan las medidas de absorbancia, fundamentales para la caracterización de cualquier luminóforo.

### 2.4.1. ABSORBANCIA.

La espectrofotometría de absorción es una técnica óptica basada en la absorción de luz por parte de algunas moléculas, denominadas *cromóforos*. La relación existente entre la intensidad de luz antes ( $I_0$ ) y después ( $I$ ) de atravesar una muestra dada es lo que se conoce como *transmitancia* ( $T$ ). Este parámetro depende, no sólo de la presencia de cromóforos en la muestra, sino de la capacidad de absorción de éstos, su concentración y la longitud de onda de la radiación incidente. La aplicación cuantitativa de este fenómeno se fundamenta en la **Ley de Lambert-Beer** (ecuación 1), que establece una relación de proporcionalidad directa entre la concentración de sustancia absorbente y la cantidad de luz absorbida por ésta, para una determinada longitud de onda:

$$A_{\lambda} = \log \frac{I_0}{I_T} = \varepsilon_{\lambda} l c \quad (1)$$

donde  $A$  es la *absorbancia* de la muestra (sin unidades),  $I_T$  e  $I_0$  son los flujos fotónicos transmitido e incidente, respectivamente,  $l$  es el *paso óptico* (espesor atravesado por el haz de luz, en cm),  $c$  es la *concentración* de la sustancia absorbente (en mol l<sup>-1</sup>) y  $\varepsilon$  es el *coeficiente de absorción molar*, característico de un cromóforo a cada longitud de onda (en mol<sup>-1</sup> l cm<sup>-1</sup>).

Las limitaciones que surgen en las medidas de absorbancia derivan de las **desviaciones instrumentales o químicas** que se producen en la ley de Lambert-Beer. Así, a concentraciones elevadas (generalmente > 0.01 M) la distancia entre las moléculas absorbentes es tan pequeña que interactúan entre sí, alterando la capacidad de absorción de la especie a una determinada longitud de onda. Del mismo modo, se producen desviaciones químicas de esta ley cuando se produce la asociación, disociación o interacción del cromóforo con el disolvente, originando una nueva especie cuyo espectro de absorción es diferente del de la especie inicial.

#### 2.4.2. LUMINISCENCIA.<sup>10,11</sup>

Los sensores de luminiscencia se basan en la información obtenida a partir de los espectros de emisión de especies que han sido excitadas electrónicamente con anterioridad. Cuando la luz de excitación procede de una fuente luminosa, la emisión de fotones se denomina **fotofluorescencia** o **fotofosforescencia**, mientras que si la especie excitada se forma en el transcurso de una reacción química el fenómeno se conoce como **quimio** o **bioluminiscencia**.

Cuando una molécula se excita por la radiación UV-VIS, los electrones más externos que participan en sus enlaces son promocionados a niveles electrónicos energéticamente superiores y, dentro de éstos, a distintos niveles vibracionales. El primer proceso que se produce tras la excitación de una molécula es la **relajación vibracional**, liberando así una parte (muy pequeña) de la energía adquirida con la absorción de luz. Desde el estado vibracional más bajo de un estado electrónico excitado, la molécula puede volver al estado fundamental emitiendo un fotón de luz. Este fenómeno es lo que se denomina, de manera general, luminiscencia y se caracteriza por ocurrir a longitudes de onda superiores a las de la luz incidente, debido a la pérdida de energía producida por la relajación vibracional. La distancia existente entre la longitud de onda de absorción y emisión en un compuesto se denomina **desplazamiento de Stokes**. Sin embargo, en la mayoría de las moléculas orgánicas, la desactivación de la molécula excitada electrónicamente se

<sup>10</sup> Lakowicz, J. R., *Principles of Fluorescence Spectroscopy* (2ª ed.), Kluwer Academic/Plenum Publishers, Nueva York (EE.UU.), 1999, cap. 4 y 5.

<sup>11</sup> Libbers, D. W., *Fluorescence Based Optical Sensors*, en *Advances in Biosensors*, vol. 2, JAI Press LTD., Londres (Reino Unido), 1992, pp. 215-260.

produce mediante un proceso de **conversión interna** (seguido de relajación vibracional), en el que los electrones pasan a niveles electrónicos inferiores sin emisión de luz. Este proceso compite cinéticamente de manera eficaz con la luminiscencia, lo que se traduce en un número muy limitado de moléculas emisoras de luz.

Según el *principio de exclusión de Pauli*, en un orbital no puede haber más de dos electrones y estos deben tener los *espines* apareados, dando lugar a especies *diamagnéticas* y a estados electrónicos **singlete**. Cuando uno de estos electrones es promocionado a un nivel energéticamente superior conserva su *espín*, generando de nuevo un estado *singlete* desde el que puede desactivarse emitiendo un fotón de luz, en un fenómeno que se denomina **fluorescencia**, o bien invertir su *espín*, generando un nuevo estado de menor energía, conocido como **triplete**, en un proceso denominado **cruce intersistemas**. El cambio de *espín* es un fenómeno poco común y está favorecido en moléculas con un alto número de electrones (**efecto de átomo pesado**). Cuando la desactivación se produce desde un triplete a un singlete con emisión de luz se denomina **fosforescencia**. Los tiempos de permanencia de la molécula en el estado excitado son mucho mayores en este caso ( $\mu\text{s}$ - $\text{ns}$ ) que en los procesos que implican fluorescencia ( $\text{ns}$ ), ya que se requiere el cambio de *espín*, con lo que se favorece la competencia de otros sistemas de desactivación no radiativos. Por esta razón se conocen muy pocas especies que emitan fosforescencia a temperatura ambiente.

Los sensores de fibra óptica utilizan a menudo los métodos luminiscentes debido a la gran **sensibilidad** y **selectividad** que estos presentan, en relación a los basados en absorción de luz. Sin embargo, no siempre pueden aplicarse estas técnicas, ya que existe un número muy limitado de especies químicas capaces de emitir luminiscencia. Por este motivo se recurre a los sensores semiactivos, en los que el luminóforo no es el analito objetivo sino un indicador situado en el extremo de la fibra óptica, cuya luminiscencia es sensible a la concentración de analito presente en la muestra.

La emisión de un compuesto puede variar en intensidad y/o en tiempo de vida de luminiscencia, dando lugar a distintos métodos ópticos según utilicen para fines analíticos uno u otro parámetro.

## A) INTENSIDAD DE EMISIÓN.

La proporcionalidad existente entre la intensidad de luz emitida por el luminóforo y su concentración, viene determinada por la **ley de Parker**:

$$I = 2.3 \times I_0 \times \Phi \times \varepsilon \times c \times l \times k \quad (2)$$

donde  $I_0$  es el flujo fotónico de la radiación incidente,  $c$  es la concentración del fluoróforo en la muestra ( $\sim \mu\text{M}$  para poder aplicar esta ley),  $\varepsilon$  es el coeficiente de absorción molar,  $l$  es el paso óptico,  $\Phi$  es el rendimiento cuántico de luminiscencia (relación entre el número de fotones emitidos y absorbidos) y  $k$  es un factor de proporcionalidad que tiene en cuenta la disposición geométrica del instrumento de medida, ya que no toda la radiación emitida por la muestra llega al fotodetector. Aunque la emisión de luminiscencia se produce en todas las direcciones, el detector se sitúa habitualmente en un ángulo de  $90^\circ$  con respecto a la fuente de luz (figura 6). De este modo se minimizan los efectos debidos a la radiación procedente de ésta.

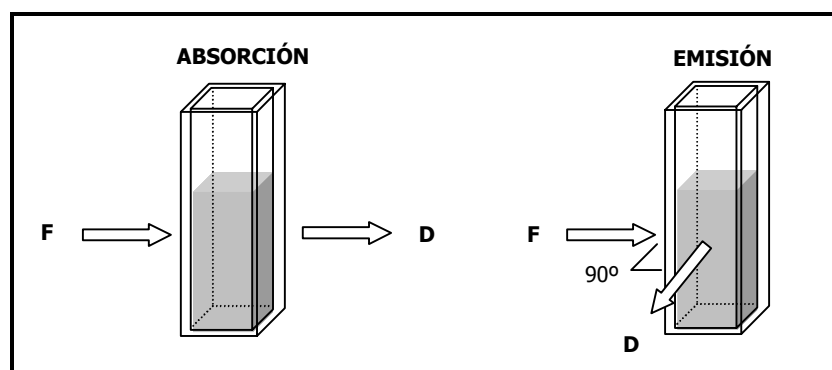


Figura 6. Situación de la fuente de luz (F) y el detector (D) en medidas de absorción y luminiscencia.

Algunos optodos no detectan la emisión procedente de un analito, sino que cuantifican la concentración de éste de modo indirecto gracias a la exaltación o desactivación (*quenching*) que produce en un determinado luminóforo indicador. La intensidad de emisión en ausencia ( $I_0$ ) y presencia ( $I_Q$ ) del desactivador (*quencher*, Q) en la muestra están relacionadas directamente por la **ecuación de Stern-Volmer**:<sup>12</sup>

<sup>12</sup> Stern, O. y Volmer, M., *Physik. Z.*, **1919**, 20, 183.

$$I_0/I_Q = 1 + K_{SV} [Q] \quad (3)$$

siendo  $K_{SV}$  la constante de Stern-Volmer ( $K_{SV} = \tau_0 k_q$ ,  $k_q$  es la constante de velocidad de desactivación bimolecular).

En los últimos años los sensores basados en **transferencia de energía a resonante** han experimentado un gran auge.<sup>13</sup> Estos optodos utilizan una combinación de dos indicadores: un luminóforo (*dador*) y una sustancia cuyo espectro de absorción solape con el de emisión de la especie dadora (*aceptor*). El grado de solapamiento de espectros depende de la concentración de analito en la muestra, al ser éste quien induce los cambios en el espectro de absorción de la sustancia aceptora. La transferencia de energía dador-aceptor se produce por interacciones *dipolo-dipolo* entre ambas especies, cuando éstas se encuentran separadas una distancia determinada (se denomina *radio de Förster* a la distancia a la que el 50% de la desactivación ocurre por transferencia de energía). La variación de la luminiscencia del *dador* como consecuencia de dicho fenómeno es la base de este método óptico.<sup>14</sup>

El principal inconveniente que presentan los sensores de fibra óptica basados en medidas de intensidad de luminiscencia es la **fotodegradación** del indicador, tras ser expuesto durante un tiempo prolongado a la fuerte radiación procedente de la fuente. Esto no sólo causa una deriva importante en la medida, sino que acorta la vida útil del sensor e impide llevar a cabo medidas fiables de intensidad absoluta. Otro de los problemas que plantean los métodos luminiscentes es el denominado **efecto de filtro interno**. Se produce cuando la concentración de luminóforo presente en la muestra es elevada ( $2.303\epsilon lc > 0.05$ ) y tiene como resultado una disminución de la luminiscencia debido a fenómenos de autoatenuación (desactivación por choques entre las moléculas) y autoabsorción (por solapamiento de los espectros de absorción y emisión). Por otro lado, al concentrarse un gran número de moléculas absorbentes en la muestra, sólo las más cercanas a la fuente son excitadas, impidiendo que el haz de luz llegue al resto. Estos inconvenientes, junto al posible **lavado** del indicador en el terminal sensible, se solucionan en los métodos ópticos basados en la medida del tiempo de vida de emisión del luminóforo.

---

<sup>13</sup> Lakowicz, J. R., Castellano, F. N., Dattelbaum, J. D., Tolosa, L., Rao, G. y Gryczynski, I., *Anal. Chem.*, **1998**, *70*, 5115.

<sup>14</sup> Stryer, L., *Ann. Rev. Biochem.*, **1978**, *47*, 819.



## B. TIEMPO DE VIDA DE EMISIÓN.

El tiempo de vida de desactivación del estado excitado emisor ( $\tau$ ) se define, siguiendo criterios estadísticos, como el tiempo transcurrido desde que se excita el compuesto hasta que únicamente quedan  $1/e$  moléculas en el estado excitado.

Los sensores de fibra óptica basados en tiempos de vida de emisión, pueden incorporar dos métodos diferentes de detección:

– **DetECCIÓN con resolución temporal:** la muestra se excita con un breve pulso de luz y, a continuación, se registra la disminución de la intensidad de luminiscencia del compuesto en función del tiempo.

– **DetECCIÓN sensible a la fase:** en este caso, se modula sinusoidalmente la luz de excitación con la que se irradia la muestra, midiendo después el desfase existente entre la onda de entrada y de salida (tras la interacción con el luminóforo), provocado por el tiempo en el que el compuesto permanece en el estado excitado. En el capítulo dedicado al módulo optoelectrónico desarrollado por T.G.I. se ampliará más detalladamente esta técnica.

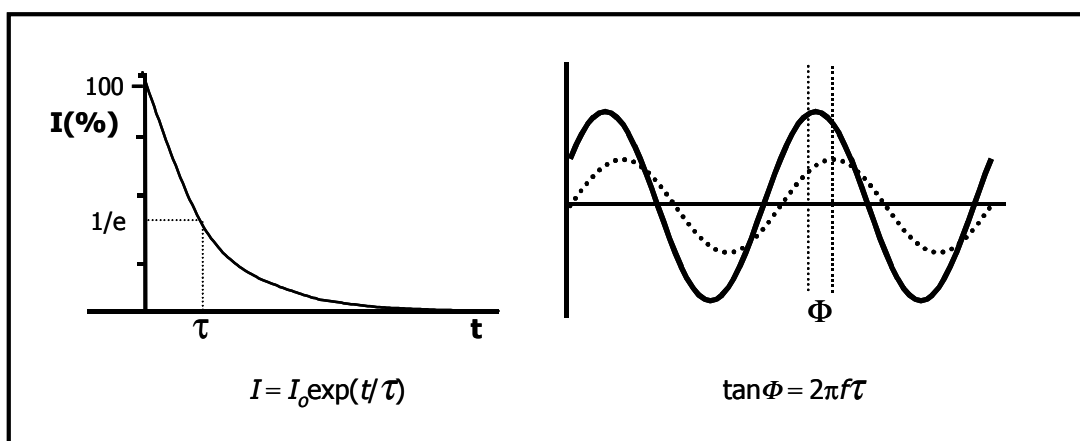


Figura 7. Métodos para la determinación del tiempo de vida de emisión de un compuesto: resolución temporal (izq.) y detección sensible a la fase (dcha.).<sup>10</sup>

En los optodos *semiactivos*, la interacción analito-luminóforo puede tener lugar cuando el emisor se encuentra en su estado fundamental (**desactivación estática**), o bien cuando la molécula se encuentra en el estado excitado (**desactivación dinámica**). En este último caso, la ecuación de Stern-Volmer demuestra de nuevo la existencia de una relación lineal entre la concentración de

desactivador y los tiempos de vida de emisión en ausencia ( $\tau_0$ ) y en presencia ( $\tau_Q$ ) del desactivador (Q):

$$\tau_0/\tau_Q = 1 + K_{SV} [Q] \quad (4)$$

El tiempo de vida de emisión de un compuesto es independiente de la concentración de éste en la muestra (en un amplio intervalo) y de la cantidad de luz con la que se irradia, por lo que no se ve afectado por procesos de lavado o fotodegradación del indicador ni de fluctuaciones en la intensidad de la lámpara o en la respuesta del detector. Las medidas con resolución temporal presentan, sin embargo, el gran inconveniente del encarecimiento de los equipos de medida, ya que requieren una instrumentación mucho más sofisticada que otros métodos ópticos que emplean la técnica analítica de luminiscencia.

## 2.5. CONSTRUCCIÓN DEL TERMINAL SENSIBLE.

Los sensores de fibra óptica preparados para llevar a cabo *medidas de campo* requieren, de manera general, una configuración *tipo sonda* que permita el acceso directo de la fibra óptica hasta el lugar de medida. Sin embargo, la utilización de sensores tipo *célula de flujo* posibilita la optimización de los parámetros que afectan a la medida del optodo, por lo que suelen constituir un paso previo a la construcción de los sensores de 2ª y 3ª generación.

En el desarrollo de sensores semiactivos o activos, en los que el analito no posee una propiedad óptica directamente medible, la construcción de una fase reactiva constituye una de las etapas más críticas. De forma general, este proceso incluye tres etapas: (a) selección del **indicador**, (b) inmovilización de éste sobre un material **soporte** adecuado y (c) **caracterización analítica** del terminal sensible fabricado. Cuando la selectividad del sensor lo requiere, es necesario colocar además una **membrana** permeable a la especie que se va a analizar e impermeable a las posibles sustancias interferentes presentes en la muestra.

### 2.5.1. INDICADORES ÓPTICOS. PROPIEDADES.

La elección de un *reactivo* adecuado para la construcción de un optodo depende, fundamentalmente, del analito y del método óptico de medida. En la actualidad, existe un gran número de compuestos químicos comerciales cuyas propiedades ópticas se ven modificadas en función del medio o especie al que se ven expuestos. Sin embargo, no siempre se encuentran disponibles las moléculas apropiadas para la sustancia que se pretende determinar, por lo que se recurre al diseño y síntesis de nuevas estructuras. Esta opción, aun siendo más compleja, permite desarrollar indicadores *a la medida* del sensor que se va a fabricar.

Los requisitos que debe reunir un indicador que forme parte de un optodo son:

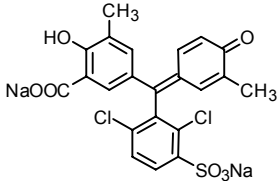
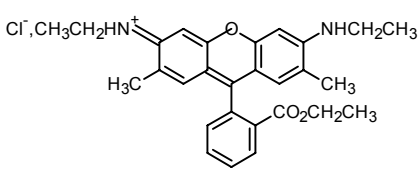
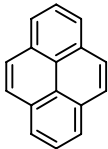
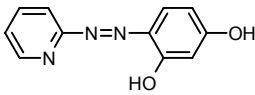
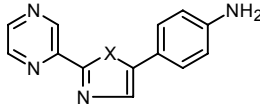
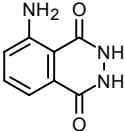
- **Propiedades ópticas** (espectros de absorción y/o emisión) sensibles a la presencia del analito y compatibles tanto con la fuente de excitación como con el detector.

- Los indicadores luminiscentes deben, idealmente, exhibir un alto **rendimiento cuántico** ( $\Phi$ ) y largo **tiempo de vida** de emisión ( $\tau$ ). Estos dos factores permiten aumentar la sensibilidad del método, a la vez que contribuyen a simplificar y abaratar la instrumentación.
- Los compuestos en los que la banda de emisión está muy desplazada con respecto a la de absorción (**desplazamiento de Stokes**) permiten la fácil discriminación entre la luz procedente de la fuente y la emisión del indicador con simples filtros coloreados.
- Máxima **estabilidad química y fotoquímica**, que evite su degradación tras largos tiempos de exposición del sensor a fuentes de luz intensas, aumentando la vida operativa útil del optodo.
- **No** ser **tóxicos** y ser **comerciales** o, en su defecto, fácilmente obtenibles a través de sencillos pasos de síntesis y purificación, a precios asequibles. Un elevado coste del indicador exigiría una mayor durabilidad para poder competir con el resto de sistemas de medida, mientras que la construcción de terminales sensibles económicos permitiría su uso desechable.
- Poseer en su estructura química algún **grupo funcional** que permita el anclaje del compuesto a un soporte adecuado, o bien ser fácilmente modificable para estos fines, sin que ello conlleve una pérdida de sensibilidad hacia el analito.

La mayoría de los indicadores que se utilizan para la fabricación de los sensores de fibra óptica pueden englobarse dentro de dos grandes grupos: **colorimétricos** o **luminiscentes**. Los primeros se aplican fundamentalmente en medidas de pH o detección de iones, basándose en el desplazamiento que experimenta el espectro de absorción de estas especies al protonarse o formar parte de un complejo, con respecto a la forma desprotonada o libre. Este tipo de indicadores son, en general, menos sensibles que los luminiscentes, ya que estos últimos posibilitan la utilización de diversos principios de medida (intensidad y tiempo de vida de emisión, desfase, quimioluminiscencia) siendo al mismo tiempo más selectivos por ser menor el número de especies que emiten luz. Alguno de los compuestos descritos en la bibliografía utilizados en la construcción de sensores ópticos aparecen recogidos en la tabla 3. Todos ellos pertenecen a familias de

moléculas orgánicas cuyas estructuras, convenientemente modificadas, son las responsables de la variedad y versatilidad características de los optodos.

**Tabla 3.** Estructura, función y método óptico de medida empleado en algunos optodos descritos en la bibliografía.

<b>INDICADOR</b>			
	cromazurol S	rodamina 6G	pireno
<b>ANALITO</b>	Fe (III) <sup>15a</sup>	cationes metálicos <sup>15b</sup>	SO <sub>2</sub> <sup>15c</sup>
<b>MÉTODO</b>	reflectancia	fluorescencia	fluorescencia
<b>INDICADOR</b>			
	4-(2-piridilazo)resorcinol	appzox (X=O) y appzth (X=S)	luminol
<b>ANALITO</b>	iones metálicos pesados <sup>15d</sup>	humedad y alcoholes de bajo PM16	glucosa <sup>15e</sup>
<b>MÉTODO</b>	absorbancia	fluorescencia	quimioluminiscencia

En apartados posteriores de esta Memoria se describirán con detalle los complejos luminiscentes de Ru(II) y su aplicación como indicadores ópticos (ver epígrafe 3 de estos antecedentes), así como las numerosas moléculas orgánicas utilizadas en la fabricación de sensores ópticos para la medida de la temperatura, pH y detergentes (antecedentes bibliográficos de estos optodos).

<sup>15</sup> a) Cámara, C., Moreno, M. C. y Faraldos, M., *Analisis*, **1988**, 16, 87. b) Bright, F. V., Poirier, G. E. y Hieftje, G. M., *Talanta*, **1988**, 35, 113. c) Sharma, A. y Wolfbeis, O. S., *Proc. SPIE*, **1989**, 990, 116. d) Lin, Z. H. y Burgess L. W., *Anal. Chem.*, **1994**, 66, 2544. e) Zhou, X. J. y Arnold, M. A., *Anal. Chim. Acta*, **1995**, 304, 147.

<sup>16</sup> a) Orellana, G., Moreno, M. C., de Dios, C., García, A. A. y Gómez, A. M., *Sensor óptico luminiscente*, Pat. Española ES2065268 (sol. n° 9300938). b) Orellana, G., Gómez, A. M., de Dios, C., García, A. A. y Moreno, M. C., *Anal. Chem.*, **1995**, 67, 2231.

### 2.5.2. SOPORTES. MÉTODOS DE INMOVILIZACIÓN.

Una vez seleccionado el indicador óptico más adecuado para la fabricación del optodo, tras un exhaustivo análisis de sus propiedades en disolución, se hace necesario la inmovilización del compuesto sobre un soporte que permita su colocación en el extremo de la fibra óptica constituyendo la denominada *fase sensible*. Dado que la principal función de los soportes es proporcionar **robustez** al sensor sin afectar (o afectando positivamente) a su sensibilidad hacia el analito, se suelen utilizar materiales **rí gidos o semirí gidos** y ópticamente **transparentes**, que permitan el fácil acceso de la especie objetivo hasta el indicador. Deben, idealmente, ser **permeables al analito** e impermeables al resto de sustancias que puedan actuar como interferentes, siendo responsables, en la mayoría de los casos, de la **selectividad** del sensor y de su **tiempo de respuesta**. Asimismo, los soportes son los encargados de **evitar el lavado** o arrastre del indicador cuando la fase sensible se sumerge en la muestra.

El indicador soportado sobre una matriz sólida puede situarse en el extremo de la fibra óptica mediante procedimientos mecánicos, o bien puede quedar físicamente unido a ésta mediante técnicas de inmovilización covalente o por deposición de una fina capa de polímero inmovilizador (spin o dip coating).

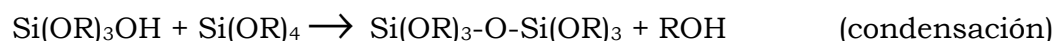
Los soportes sólidos que forman parte de las fases reactivas de los optodos pueden ser materiales muy diversos, tanto orgánicos como inorgánicos:<sup>3</sup>

#### **A) POLÍMEROS DE CONDENSACIÓN DERIVADOS DEL ÁCIDO SILÍCICO: sol-gel, vidrio poroso, zeolitas y gel de sílice.**

El vidrio, en sus diferentes formas, permite la inmovilización covalente de indicadores ópticos tanto hidrófilos como hidrófobos, mediante la oportuna modificación de su superficie. El empleo de **vidrio de poro controlado** (CPG, del inglés *controlled pore glass*), comercializado en forma de fino polvo, aumenta considerablemente la superficie de contacto con el indicador, proporcionando al mismo tiempo un control sobre la selectividad del sensor derivado de la elección del tamaño de poro. El carácter inerte y la gran estabilidad mecánica de este tipo de soportes son dos factores muy apreciados. La naturaleza particulada del CPG,

sin embargo, impide la exposición directa del indicador soportado al analito cuando éste se encuentra en disolución, siendo necesario el empleo de membranas permeables que envuelvan al soporte facilitando el acceso del analito hasta el indicador, pero evitando que la muestra arrastre las partículas de CPG. En algunos casos, la presencia de estas membranas en el terminal sensible aumenta el tiempo de respuesta del sensor, por lo que se recurre a la utilización de vidrio laminado, cuyo mayor inconveniente es su fragilidad.

Uno de los soportes más populares para la construcción de optodos de los últimos años es el denominado **sol-gel**.<sup>17</sup> Estos vidrios porosos de sílice, obtenidos a partir de la hidrólisis y posterior condensación de *tetraalcoxisilanos* (Si(OR)<sub>4</sub>) en disoluciones hidroalcohólicas, permiten el atrapamiento en su interior de moléculas indicadoras. De modo esquemático, el proceso de formación de un material sol-gel es el siguiente:



Tanto el proceso de hidrólisis como el de condensación pueden llevarse a cabo a través de sustituciones nucleófilas bimoleculares catalizadas por un medio ácido o básico. En medio ácido la hidrólisis es más lenta, originando cadenas lineales ocasionalmente entrecruzadas mientras que, mediante catálisis básica donde la hidrólisis es rápida, se forman entramados de sílice. En ambos casos, la interconexión de enlaces Si-O-Si forma partículas coloidales (*sol*), que con el tiempo dan lugar a redes tridimensionales, aumentando la viscosidad de la disolución (*gel*). Cuando el proceso sol-gel acaba, se produce la eliminación del disolvente por evaporación (xerogeles) o evacuación supercrítica (aerogeles).

Los materiales sol-gel tienen tendencia a romperse durante las primeras etapas de formación, debido a las tensiones originadas en la interfase sólido-líquido. Esto puede evitarse, en cierta medida, añadiendo agentes químicos que modifiquen la tensión superficial del líquido. Por otro lado, el tamaño final de poro depende de la temperatura durante el proceso de formación del sol-gel. Así, si esta es muy elevada se obtienen vidrios no porosos, mientras que si se realiza a temperatura ambiente el tamaño de poro aumenta.

El gran inconveniente que presentan estos sistemas es que la formación del sol-gel es un proceso dinámico en continua evolución. Esto se traduce, en su aplicación como soporte de optodos, en una baja reproducibilidad, tanto en las medidas como en la construcción del terminal sensible, así como una deriva de la señal y un acortamiento de la vida útil del sensor, dado que con el tiempo estos soportes van cerrando sus poros impidiendo el acceso del analito hasta el indicador.

## **B) SILICONAS.**

La respuesta de los sensores que detectan gases depende básicamente de la solubilidad del gas en la membrana que soporta el indicador óptico, de la velocidad de difusión del analito a través de la misma y de la permeabilidad de ésta hacia el gas detectado. Los polímeros de silicona son, en ese sentido, soportes ideales para construir sensores de O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub>, dada la alta permeabilidad de la silicona hacia estos dos analitos gaseosos. Al contrario que la mayoría de los polímeros con los que se construyen sensores de fibra óptica, las siliconas no incorporan plastificantes que, aunque son los responsables de las propiedades mecánicas de las membranas, suelen estar constituidos por compuestos fluorescentes que introducen un fondo que puede causar interferencia en la medida del optodo o experimentan un lavado por la disolución de medida, que convierte en frágiles a las membranas sensibles.

Las siliconas no permiten el anclaje covalente del indicador a su superficie ya que ésta no puede modificarse fácilmente, por lo que el reactivo sensible suele encontrarse embebido en su interior. Los numerosos sensores de oxígeno descritos en la bibliografía que utilizan este tipo de soportes, suelen incorporar el indicador previamente soportado sobre gel de sílice o vidrio antes del curado del prepolímero de silicona, dado que el marcado carácter hidrofóbico de este tipo de membranas impide la solubilidad de indicadores iónicos en las mismas.<sup>18</sup>

---

<sup>17</sup> Wolfbeis, O. S., Reisfeld, R. y Oehme, I., *Sol-gels and chemical sensors*, en *Structure and Bonding*, vol. 85, Springer-Verlag, Berlín (Alemania), 1996; pp. 52-98.

<sup>18</sup> Wenying, X, McDonough, R. C., Langsdorf, B., Demas, J. N. y DeGraff, B. A., *Anal. Chem.*, 1994, 66, 4133.



### **C) POLÍMEROS ORGÁNICOS LINEALES: poli(cloruro de vinilo) (PVC), polietileno, poli(tetrafluoroetileno) (PTFE), poliestireno.**

La gran variedad de polímeros lineales que existen en el mercado permite elegir el más adecuado en función de la naturaleza del indicador que se pretende inmovilizar y la especie objetivo. Como se ha mencionado anteriormente en la descripción de las siliconas, un inconveniente que presentan estas matrices son los plastificantes que incorporan algunas de ellas, introduciendo un *fondo* en las medidas que puede causar interferencias. En algunas ocasiones, cuando se requiere el acceso de un analito hidrofílico al interior de la membrana plástica, se añaden moléculas durante el proceso de curado de estos polímeros que actúan permitiendo el acceso de analitos hidrofílicos al interior de la membrana plástica (transportadores o *carriers*).

En la actualidad, además de los polímeros hidrofóbicos convencionales, se pueden utilizar soportes poliméricos adecuadamente funcionalizados con distintos grupos aniónicos o catiónicos en su superficie. Entre éstos, uno de los más versátiles es el *Nafion*<sup>®,\*</sup> polímero constituido por un esqueleto de *poli(tetrafluoroetileno)* del que cuelgan cadenas de éteres vinílicos perfluorados terminados en grupos sulfónicos.

### **D) INTERCAMBIADORES IÓNICOS.**

Este tipo de soportes sólidos poseen en su superficie grupos aniónicos ( $\text{SO}_3^-$ ,  $\text{CO}_2^-$ ) o catiónicos ( $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NR}_3\text{H}^+$ ) que retienen electrostáticamente moléculas de carga contraria. Se encuentran disponibles en forma de resinas o membranas de intercambio iónico. Las primeras, además de no constituir un soporte robusto, se hinchan reversiblemente tras la exposición al medio acuoso o humedad. Las membranas, sin embargo, no sufren hinchamiento y son fácilmente manejables. En ambos casos, la fuerza iónica del medio puede provocar el lavado del indicador del soporte, al igual que los pH extremos, que protonan o desprotonan los grupos funcionales neutralizando el soporte.

---

\* *Nafion*<sup>®</sup> es una marca registrada por *E. I. du Pont de Nemours and Co.* (EE.UU.).

## **E) MATRICES POLIMÉRICAS HIDROFÍLICAS.**

Las **celulosas** son polímeros que permiten el flujo del agua a su través. Pueden incorporar grupos funcionales en su superficie facilitando la unión electrostática o por fuerzas de tipo Van der Waals de los indicadores. Sin embargo, estas membranas no son excesivamente robustas y son susceptibles de contaminación bacteriana. Además, no evitan el lavado del indicador, al encontrarse éste únicamente adsorbido en su superficie.

Otros polímeros hidrofílicos empleados en la construcción de sensores ópticos son el *nylon*, las *poli(acrilamidas)*, el *poli(etilenglicol)* y el *poli(alcohol vinílico)*. Estas matrices poseen una considerable estabilidad química y pueden modificarse convenientemente para una posible unión de tipo covalente a un indicador. Al igual que las resinas de intercambio iónico, algunos de estos soportes se hinchan en disolución, disminuyendo la reproducibilidad de las medidas.

Finalmente, existen en la actualidad soportes constituidos por redes macromoleculares formadas a partir de copolimerización de monómeros, entre las que se encuentran el *metacrilato de metilo* (MMA), *metacrilato de 2-hidroxietilo* (HEMA) y varias *acrilamidas* y *vinilpirrolidonas*.<sup>19</sup> La principal ventaja de estos soportes, denominados comúnmente **hidrogeles**, es su biocompatibilidad y su principal inconveniente el hinchamiento, como en el resto de materiales *higroscópicos* descritos anteriormente.

El proceso de inmovilización del indicador en una matriz sólida conlleva, en ocasiones, algún cambio en las propiedades ópticas del compuesto. De forma general, los **métodos de inmovilización** se clasifican en dos grandes grupos:

- **FÍSICOS.** Son, en principio, reversibles. Mantienen unido el soporte al indicador a través de fuerzas electrostáticas, de Van der Waals, interacciones hidrofóbicas, etc.
- **QUÍMICOS.** Este tipo de unión soporte-indicador es la más idónea para la construcción de optodos, ya que evita el lavado de la sonda al sumergir el terminal sensible en la muestra. Sin embargo, los reactivos y las matrices poliméricas no

---

<sup>19</sup> Peppas, N. A., *Preparation, Methods and Structures of Hydrogels*, CRC Press, Boca Raton, Florida (EE.UU.), 1986.

siempre poseen en su estructura grupos funcionales que faciliten este tipo de enlace.

**Tabla 4.** Métodos de inmovilización de indicadores ópticos sobre soportes sólidos.

<b>MÉTODOS DE INMOVILIZACIÓN</b>	
<b>FÍSICOS</b>	<b>QUÍMICOS</b>
ADSORCIÓN ATRAPAMIENTO MICROENCAPSULACIÓN	UNIÓN COVALENTE ENTECRUZAMIENTO

## **2.6. APLICACIONES DE LOS SENSORES DE FIBRA ÓPTICA.**

En anteriores apartados de esta Memoria se han ido describiendo las numerosas propiedades y ventajas asociadas a los sensores de fibra óptica, responsables de su gran versatilidad. Los optodos encuentran aplicaciones en todos aquellos sectores que requieran la detección o cuantificación *in situ* y en tiempo real de un parámetro o especie determinada. Las posibilidades de los SFO aumentan de forma paralela al desarrollo de nuevas tecnologías, que contribuyen positivamente a la optimización de la instrumentación y los métodos ópticos de medida. En la actualidad, los sensores de fibra óptica son de gran utilidad en campos muy diversos, entre los que cabe destacar la química clínica, el control de procesos industriales y el medio ambiente. Todos estos campos de aplicación despiertan un gran interés dentro de la comunidad científica. Sin embargo, dado que el objetivo principal del Proyecto de Investigación en el que se incluye esta Memoria es el desarrollo de sensores de fibra óptica para la medida de parámetros de calidad de aguas, en este epígrafe se describirán con detalle únicamente los aplicados a este fin.

- **OPTODOS APLICADOS AL ANÁLISIS DE AGUAS**

Tradicionalmente, el control de la calidad del agua se ha llevado a cabo mediante las imprescindibles tomas de muestra y su posterior traslado a los laboratorios de análisis, donde gracias a las actuales técnicas analíticas, tales como la espectroscopía de absorción atómica (AAS), la cromatografía de gases (GC), la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) y la espectrometría de masas (MS), se detectan y cuantifican todo tipo de sustancias contaminantes.

Entre 1984 y 1986, la EPA (*Environmental Protection Agency*, agencia de protección del medio ambiente estadounidense) publicó una serie de informes en los que se incluía la valoración y mejora de la calidad del agua con objeto de proteger la salud pública y el ecosistema. Los puntos más destacados en estos informes fueron el endurecimiento de las medidas adoptadas por cada Estado sobre la calidad de las aguas y la creación de una organización encargada de vigilar el cumplimiento estricto de las normas establecidas por la EPA.

En España, las *normativas* europeas determinan la clase de especies que se deben analizar en función del uso al que se destina el agua, ya que el consumo humano, los ríos, lagos y mares o las aguas que recogen vertidos industriales, se acogen a diferente legislación. Las *directivas* se encargan de fijar los **valores límite** de cada sustancia contaminante, así como los **métodos de medida** y el establecimiento de **redes de vigilancia** cuyo objetivo es detectar posibles situaciones de alarma, informando cuando éstas se producen y las causas por las que se han superado los valores límite establecidos.

**Tabla 5.** Parámetros cuyos valores límite en aguas y métodos de medida están recogidos en la legislación medioambiental.

amoníaco	nitratos
fosfatos	metales
compuestos orgánicos halogenados	sólidos en suspensión
cianuro	pesticidas
gasolinas y aceites	demanda bioquímica de oxígeno (DBO)
oxígeno disuelto	compuestos orgánicos totales
algas y fangos	bacterias y virus
fenoles	cloro
demanda química de oxígeno (DQO)	pH

En 1994, en el seno del **IV Programa Marco de I+D de la Unión Europea**, en el subprograma de Medio Ambiente, se establecieron dos objetivos prioritarios: (a) identificar y evaluar los efectos de la actividad humana sobre el ecosistema y (b) contribuir al **desarrollo tecnológico** necesario para la observación, **monitorización e investigación del medioambiente**, incluyendo las metodologías y tecnologías para la vigilancia, prevención y gestión de los riesgos naturales. En este último punto, la unión europea hace especial hincapié en el desarrollo de sensores en todas aquellas aplicaciones donde los sistemas convencionales de medida están limitados por sensibilidad, selectividad, precisión, fiabilidad y/o coste, así como en procesos industriales que contemplen una producción menos contaminante. En la actualidad y hasta el año 2002, está en vigor el **V Programa Marco** (1999) en el que se vuelve a remarcar la necesidad de un control de la contaminación de los recursos hídricos a través de la analítica de las aguas y los sistemas de vigilancia de fuentes contaminantes puntuales o accidentales.

Siempre que la concentración de una sustancia en las aguas esté legislada, se hace necesaria la optimización de un método de medida, que suele aparecer junto con los límites permitidos de la concentración de esa especie. Generalmente, los métodos de laboratorio permiten medir un número muy elevado de analitos con un coste inferior al que supondría utilizar sensores de fibra óptica, los cuales habitualmente están desarrollados para la medida de un único parámetro.

Para que un sensor de fibra óptica pueda reemplazar a los tradicionales métodos de medida, es necesario que los optodos introduzcan mejoras en diversos parámetros analíticos, como la sensibilidad, selectividad, precisión y tiempo de respuesta. Además, deben ser competitivos en cuanto a costes de mercado con los métodos ya implantados, lo cual se suele lograr cuando se fabrican **optodos multiparamétricos**.

Los *SFO* se fabrican, en la actualidad, reduciendo al máximo el tamaño de la instrumentación óptica. De este modo, se pueden construir **equipos portátiles** que permiten llevar a cabo medidas de campo. Esta ventaja de los optodos, junto con la posibilidad de detectar y cuantificar en continuo **nuevos parámetros**, hasta el momento medibles únicamente en laboratorio, son los pilares fundamentales en los que se basa actualmente la investigación en el campo de los sensores de fibra óptica y que han permitido, en ocasiones, dar el salto del laboratorio a la industria.

Si se examinan actualmente los **sensores ópticos comerciales** para la medida de parámetros químicos se observa que los basados en medidas de absorbancia y fluorescencia dominan claramente el mercado. Una breve representación de los medidores in-situ de **fibra óptica** para medidas en **aguas** son:

□ **Microx** (*PreSens, GmbH*): esta compañía alemana ha desarrollado unos medidores de **oxígeno disuelto** basados en sensores de fibra óptica cuyos terminales sensibles, donde se encuentra convenientemente inmovilizado un luminóforo sensible a este analito (complejo de Ru(II) o metaloporfirinas, en función del intervalo dinámico de medida), presentan un diámetro inferior a 30  $\mu\text{m}$ . Detecta trazas de oxígeno en concentraciones por debajo de 10 ppb.

□ **pH y oxígeno** (*Ocean Optics, Inc.*). El sensor de pH que comercializa esta empresa está basado en el cambio de color (absorbancia/reflectancia) que experimenta un indicador inmovilizado en una matriz polimérica con los cambios de pH del medio. El intervalo de respuesta de este sensor depende del  $pK_a$  del compuesto soportado (rojo fenol, rojo cresol, púrpura de *m*-cresol, azul de timol, amarillo brillante o rojo congo). El sensor de oxígeno (*FOXY*) permite medir oxígeno disuelto (0-40.7 ppm) y oxígeno gaseoso (0-100%) gracias a la eficaz desactivación que esta molécula provoca en la intensidad de luminiscencia de un complejo de Ru(II) inmovilizado en una fina película sol-gel. Como fuente de excitación, este sistema utiliza un led azul pulsado (470 nm).

□ **True Temp 700** (*Luxtron Corporation*). Este optodo de **temperatura** permite medir en un intervalo comprendido entre -195 y 450 °C gracias a la disminución que se produce en la emisión de cristales láser dopados con  $Cr^{3+}$  o  $Mn^{4+}$  con el aumento de la temperatura (ver patentes en tabla 6).

□ La empresa canadiense *Nortech* comercializa también un **termómetro óptico** basado en los cambios que experimenta el espectro de absorción de un cristal semiconductor con la temperatura (-200°C,+300°C).

□ *SFO* de *Fiberchem Inc.*: **Petrosense CMS**, **Petrosense** y **Aquasense**. Esta compañía norteamericana, en colaboración con importantes empresas, como *Texas Instruments*, ha desarrollado diversos equipos portátiles para medidas en aguas y vapores contaminantes. *Petrosense CMS* (instalación permanente para la medida en continuo) y *Petrosense* detectan hidrocarburos, mientras que *Aquasense* permite determinar de forma individualizada distintos parámetros de calidad de aguas ( $CO_2$ ,  $O_2$ ,  $NH_3$ , nitratos...) basándose para ello en medidas de absorbancia, reflectancia o índice de refracción.<sup>20</sup>

□ **NITRAX® plus**, **UVAX® plus** y **SOLITAX®** son sensores ópticos comercializados por *Dr. LANGE* (Alemania) para la medida de **nitrito/nitrato**, **compuestos orgánicos totales** y **turbidez**, respectivamente. El primero es un sensor pasivo que mide directamente la absorbancia UV del analito y la correlaciona con la concentración del mismo. Las interferencias causadas por posibles sólidos en

<sup>20</sup> Klainer, S. M., Thomas, J. R. y Francis, J. C., *Sens. Actuators B*, **1993**, 11, 81.

suspensión se compensan realizando previamente una medida de referencia. El optodo de compuestos orgánicos totales se basa también en medidas de absorbancia, mientras que el de turbidez utiliza la dispersión de luz infrarroja que se produce en la muestra.

□ *YSI Life Science* (Ohio, EE.UU.) comercializa un optosensor para medir *in situ* CO<sub>2</sub> disuelto (**YSI 8500**). Consiste en una microcápsula rellena de tampón bicarbonato y recubierta con una membrana de silicona permeable al gas. La disolución reguladora contiene HPTS, un indicador fluorescente sensible a los cambios de pH. El CO<sub>2</sub> difunde a través de la membrana cambiando el pH del tampón y, con ello, la fluorescencia del compuesto. El equipo compara la emisión del fluoróforo a dos longitudes de onda (referencia interna) para determinar la concentración de CO<sub>2</sub> en la muestra.

En los antecedentes bibliográficos correspondientes a cada uno de los sensores ópticos desarrollados en esta Memoria (temperatura, pH y detergentes) se analizan detalladamente algunos de los optodos, comerciales o en fase de investigación, destinados a la medida de estos parámetros.



### 3. COMPLEJOS LUMINISCENTES DE Ru(II).

Los compuestos de coordinación de rutenio(II) con ligandos heterocíclicos quelatantes son objeto de innumerables estudios debido a sus inusuales propiedades estructurales, espectroscópicas y redox. Desde 1959, año en el que se describió por vez primera la luminiscencia de un complejo de Ru(II), el tris(2,2'-bipiridina)rutenio(II),<sup>21</sup> estos compuestos han constituido la base de numerosas publicaciones y aplicaciones en campos muy diversos.

#### 3.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES.

Los complejos de Ru(II) poseen características que les convierten en indicadores idóneos para la construcción de sensores ópticos:<sup>22</sup>

- Exhiben bandas de **absorción** (200-550 nm) y **emisión** (550-850 nm) en la región **visible** del espectro electromagnético, posibilitando el uso de fuentes de luz de bajo coste para excitar el indicador.
- **Gran desplazamiento de Stokes** (>150 nm), que permite diferenciar la luz de excitación de la emisión con simples filtros coloreados.
- **Tiempos de vida** de emisión relativamente **altos** (0.1-7  $\mu$ s), en comparación con la mayoría de moléculas orgánicas fluorescentes (ns), lo que facilita en gran medida el proceso de detección.
- **Estables** desde el punto de vista **químico** y **fotográfico**. Esta característica es fundamental para su aplicación como optodos, ya que en éstos el indicador permanece expuesto a fuentes de luz intensas durante un largo período de tiempo.
- Sus **propiedades fotofísicas** se pueden **modificar** en función del analito, método óptico de medida, fuentes de luz y detectores, mediante la conveniente selección de los ligandos que quelatan el metal. Así, tras un adecuado proceso de *ingeniería molecular*, se pueden diseñar indicadores ópticos *a medida*.

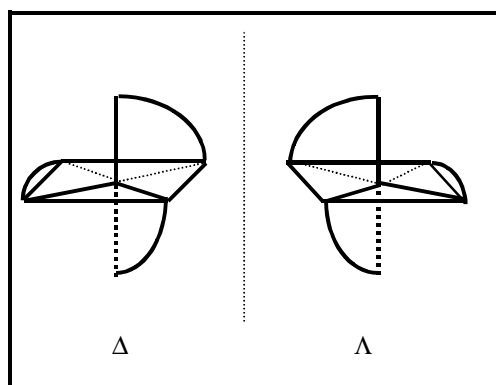
<sup>21</sup> Paris, J. P. y Brandt, W. W., *J. Am. Chem. Soc.*, **1959**, *81*, 5001.

<sup>22</sup> Orellana, G., Quiroga, M. L. y de Dios, C., *Trends Inorg. Chem.*, **1993**, *3*, 109.

- Pueden **inmovilizarse** en soportes o membranas poliméricas a través de los **grupos funcionales** que incorporen los ligandos en su periferia.

### 3.2. PROPIEDADES ESTRUCTURALES.

El rutenio(II) forma complejos de simetría (seudo)octaédrica que, en presencia de ligandos bidentados, da lugar a dos formas ópticamente activas y estables, aislables sin que se produzca racemización. Los ligandos quelatantes se disponen en el complejo formando una espiral alrededor del eje  $C_3$  del compuesto, en la dirección de las agujas del reloj (isómero  $\Delta$ ) o contraria a éstas ( $\Lambda$ ). Esta disposición de los ligandos es la responsable del carácter *quiral* de estos complejos (figura 8).



**Figura 8.** Isómeros  $\Delta$  y  $\Lambda$  de un complejo metálico octaédrico con ligandos bidentados. El carácter *quiral* de estos compuestos deriva de la estructura de estos isómeros, imágenes especulares no superponibles.

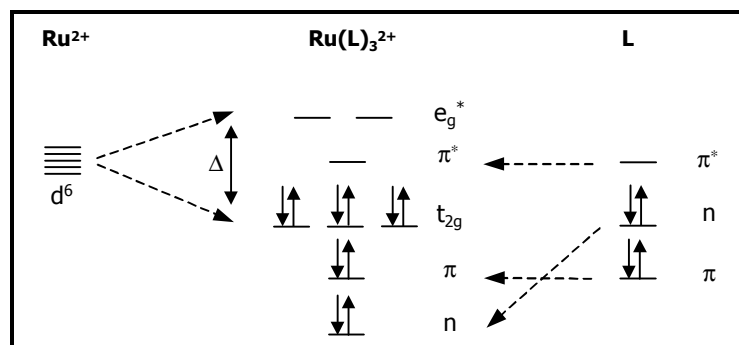
En función del número de ligandos bidentados iguales que quelatan el metal, los complejos de Ru(II) se clasifican en **homolépticos** ( $[\text{Ru}(\text{L})_3]^{2+}$ ), **bisheterolépticos** ( $[\text{Ru}(\text{L})_2(\text{L}') ]^{2+}$ ) y **trisheterolépticos** ( $[\text{Ru}(\text{L})(\text{L}')(\text{L}'')]^{2+}$ ). Cuando los ligandos complejantes son neutros la carga global del complejo es positiva, lo cual facilita su unión electrostática a soportes aniónicos. La introducción de ligandos con grupos funcionales adecuados permite el anclaje covalente a matrices poliméricas, evitando así el posible lavado de la sonda, o incluso la *inversión* de la carga (global) del complejo de Ru(II), posibilitando el anclaje electrostático de los mismos a materiales catiónicos.

### 3.3. NIVELES DE ENERGÍA Y ESTADOS EXCITADOS.<sup>23</sup>

Los ligandos que forman complejos de coordinación con el Ru(II) suelen ser heterociclos que incorporan la estructura de tipo  $\alpha$ -diimina ( $\text{N}=\text{CH}-\text{CH}=\text{N}$ ), dotados de orbitales  $\sigma$ -dadores situados sobre los átomos de nitrógeno y  $\pi$ -dadores o  $\pi^*$ -aceptores deslocalizados en la estructura aromática. El rutenio es un metal que, en su estado fundamental, posee 6 electrones apareados en orbitales  $d$ . Según la **teoría a del campo del cristal**, en presencia de un *campo octaédrico* de ligandos se produce un desdoblamiento de estos orbitales  $d$ , de modo que los dirigidos hacia los ligandos ( $d_{x^2-y^2}$  y  $d_{x^2}$ ) sufren una mayor repulsión, dando lugar a dos orbitales degenerados de simetría  $\sigma$  y mayor energía ( $e_g$ ), mientras que los situados entre los ligandos ( $d_{xy}$ ,  $d_{xz}$  y  $d_{yz}$ ) se estabilizan, originando tres orbitales degenerados de simetría  $\pi$  ( $t_{2g}$ ). En realidad, el desdoblamiento de orbitales sólo tiene lugar de esta manera en complejos homolépticos con ligandos simétricos, ya que en el resto hay una pérdida de simetría que da lugar a una distribución de niveles más complicada, que no tendremos en cuenta a la hora de analizar los niveles energéticos de los orbitales moleculares en estos compuestos.

La diferencia de energía ( $\Delta_o$ ) existente entre los orbitales  $t_{2g}$  y  $e_g$  tras el desdoblamiento del campo del cristal, depende del radio del ión metálico, de la carga de éste y de la naturaleza de los ligandos. Los ligandos poliazaheterocíclicos que nos ocupan son por lo general de **campo fuerte**, es decir, generan con su acoplamiento complejos de **bajo espín**, situando los 6 electrones no enlazantes del Ru(II) en los orbitales  $t_{2g}$ . Aunque en un ligando aislado los últimos orbitales ocupados (HOMO) son los de tipo  $n$  (no enlazantes), situados sobre los átomos de nitrógeno, con la unión al metal éstos se estabilizan por formación de un enlace  $\sigma$ , pasando a ser los orbitales  $t_{2g}$  los ocupados de mayor energía del complejo (figura 9). La distancia Ru-N medida en este tipo de complejos ( $\sim 2.1$  Å) indica que se produce también una importante retrocesión  $\pi$  desde los orbitales  $t_{2g}$  del rutenio (HOMO) hasta los  $\pi^*$  del ligando (LUMO), por solapamiento entre ambos orbitales.

<sup>23</sup> Seddon, E. A. y Seddon, K. R., *The Chemistry of Ruthenium*, en *Topics in Inorganic and General Chemistry*, vol. 19, Clark, R. J. H. (ed.), Elsevier, Amsterdam (Holanda), 1984; pp. 1173-1260.



**Figura 9.** Posición relativa de los orbitales moleculares en un complejo de Ru(II) con simetría octaédrica y ligandos de campo fuerte. En el estado fundamental, todos los electrones están apareados (singlete,  $S_0$ ).

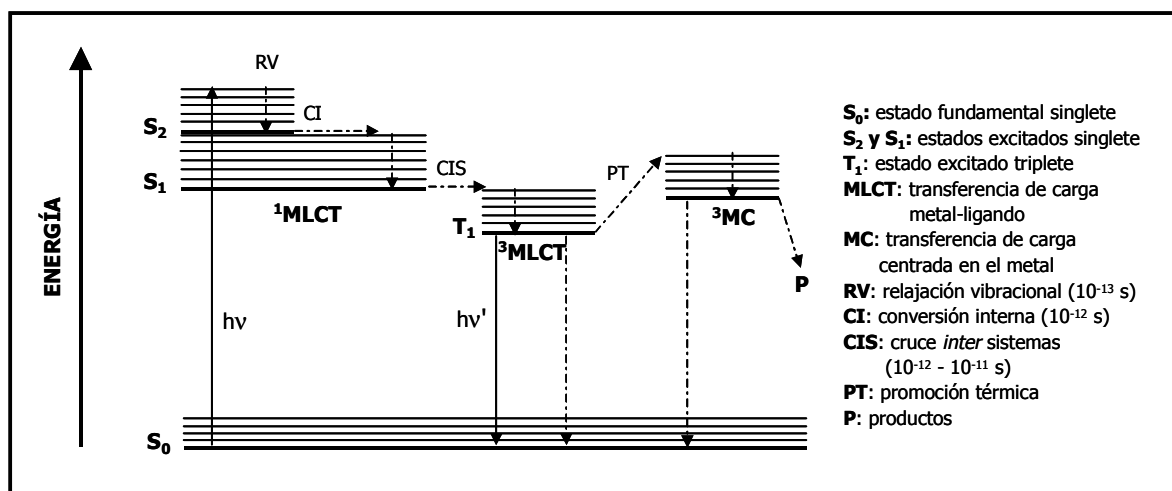
Cuando un complejo de Ru(II) se irradia con luz de longitud de onda adecuada, se produce la promoción de los electrones desde los orbitales ocupados en el estado fundamental a cualquiera de los estados excitados. En la figura 9 se observa cómo la transición electrónica de **menor energía** corresponde a una transferencia de carga HOMO-LUMO del metal al ligando (**MLCT**, del inglés *metal-to-ligand charge transfer*), conduciendo a un estado excitado de configuración  $(t_{2g})^5(\pi^*)^1$ . Un segundo estado electrónico excitado surgiría de la promoción de un electrón desde el orbital  $t_{2g}$  al  $e_g^*$ . Es una transición prohibida por la simetría, por lo que es poco probable y, dado que los dos orbitales involucrados pertenecen al metal, este estado se denomina **MC** (*metal centered*, centrado en el metal). Su configuración es  $(t_{2g})^5(e_g^*)^1$ . Finalmente, la transferencia electrónica puede también tener lugar desde el orbital  $\pi$  del ligando hasta los orbitales  $\pi^*$  o  $e_g^*$ , denominándose **LC** al tránsito producido entre los dos orbitales del ligando (*ligand centered*, configuración  $(\pi)^1(t_{2g})^6(\pi^*)^1$ ) y **LMCT** cuando son desde el ligando al metal (*ligand-to-metal charge transfer*, configuración  $(\pi)^1(t_{2g})^6(\pi^*)^0(e_g^*)^1$ ). Estos últimos requieren mucha energía y son de escasa importancia en los complejos de Ru(II).

En el estado fundamental, el Ru(II) tiene todos sus electrones apareados (figura 9), dando lugar a un estado **singlete** ( $S_0$ ). Cuando se produce alguno de los tránsitos electrónicos anteriores, uno de los electrones se sitúa en un nivel electrónico superior vibracionalmente excitado ( $S_2v_n$ ). Desde este estado, el complejo libera el exceso de energía vibracional (**relajación vibracional**,  $S_2v_0$ ), para después alcanzar el estado electrónico excitado de menor energía ( $S_1$ ), en un proceso adiabático denominado **conversión interna** (seguido de la rápida relajación vibracional). En este primer estado excitado singlete, el electrón

experimenta un cambio de espín (**cruce intersistemas**) debido al acoplamiento espín-órbita que tiene lugar como consecuencia del alto número atómico del metal (**efecto de átomo pesado**), dando lugar a una mezcla de estados singlete ( $S_1$ )-tripleto ( $T_1$ ) que impide asignar nítidamente una determinada “etiqueta” a la multiplicidad de los estados involucrados (aunque formalmente lo designamos como “tripleto”).

Desde el estado excitado de menor energía  $^3\text{MLCT}$ , los complejos de Ru(II) pueden sufrir procesos de desactivación bimolecular (por oxígeno o choques entre moléculas) o bien unimolecular. Dentro de estos últimos se incluyen:

- **Luminiscencia.** El complejo se desactiva emitiendo un fotón de luz ( $h\nu'$ ).
- **Desactivación no radiativa.** El exceso de energía se disipa en forma de calor.
- **Promoción térmica.** Desde el estado  $^3\text{MLCT}$ , el complejo puede acceder a un estado próximo en energía ( $^3\text{MC}$ ) por vía térmica, desactivándose después de forma no radiativa o por reacción química, dando lugar a otros productos (pérdida de ligando, isomerización, ...).



**Figura 10.** Diagrama de Jablonski de estados energéticos para un complejo de Ru(II) con ligandos poliazaheterocíclicos quelatantes. Las flechas continuas indican procesos radiativos (absorción y emisión de luz), mientras que las discontinuas hacen referencia a procesos de desactivación no radiativos.

La situación energética de los estados excitados MLCT, MC, LMCT y LC depende de la fortaleza del campo del cristal, de las propiedades redox del metal y de los ligandos y de las propiedades electrónicas intrínsecas de estos últimos. Los estados MLCT y LC poseen una geometría no muy distorsionada con respecto al

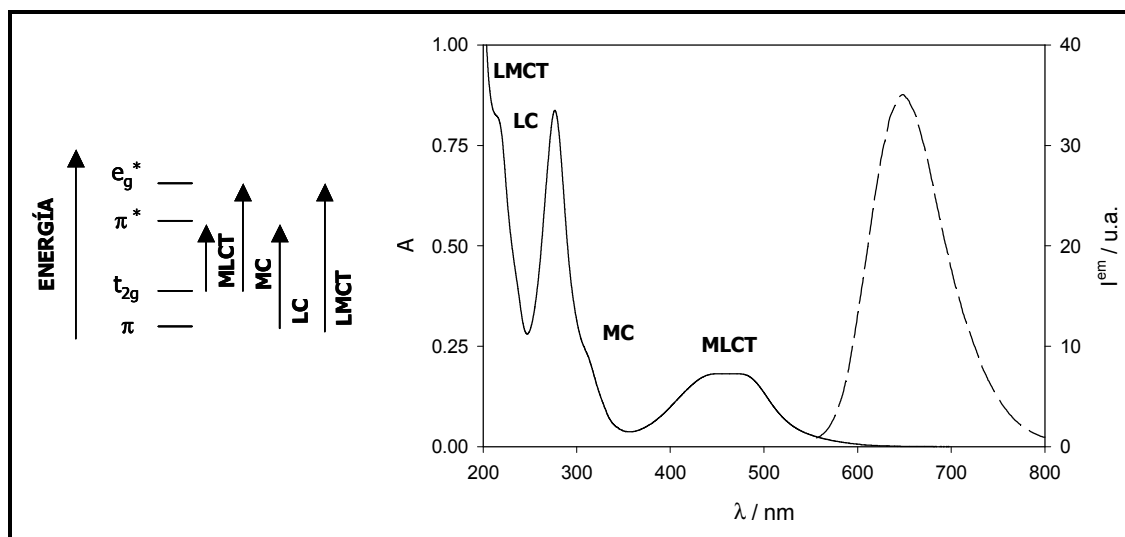
estado fundamental, lo que implica una lenta desactivación radiativa desde dichos estados (aunque con una constante de desactivación mucho mayor para el estado MLCT), al contrario que desde el MC y LMCT, de geometría muy distinta a la del estado fundamental, que originan una rápida desactivación no radiativa, dificultando la emisión de luz desde ese estado.

### 3.4. PROPIEDADES ESPECTROSCÓPICAS.

#### 3.4.1. ESPECTROS DE ABSORCIÓN.

Las transiciones electrónicas descritas anteriormente dan lugar a bandas de absorción, más o menos intensas, en la región ultravioleta y visible del espectro electromagnético. Algunos de estos tránsitos, a pesar de estar prohibidos por las reglas de selección, son observables debido al fuerte acoplamiento espín-órbita característico de estos compuestos que aumenta la probabilidad de absorción de luz.

La situación de las distintas transiciones en el espectro es fácilmente deducible, teniendo en cuenta que a transferencias de carga poco energéticas les corresponden bandas de absorción de mayores longitudes de onda (figura 11).



**Figura 11.** Transiciones electrónicas que dan lugar a las intensas bandas que aparecen en la región UV y VIS del espectro de absorción de un complejo de Ru(II) con ligandos poliazaheterocíclicos quelatantes. Las bandas LMCT no aparecen en la región accesible del espectro, ya que son muy energéticas. Las MC son muy débiles (prohibidas), por lo que generalmente solapan con otras más intensas. La línea discontinua corresponde al espectro de emisión del compuesto desde su estado excitado  $^3MLCT$  (u.a.: unidades arbitrarias).

### 3.4.2. ESPECTROS DE EMISIÓN.

Los complejos de Ru(II) presentan una ancha banda de emisión en el intervalo comprendido entre 550 y 850 nm, al ser irradiados en cualquiera de sus bandas de absorción. Debido al *efecto de átomo pesado* anteriormente mencionado, la desactivación tiene lugar desde una mezcla de estados singlete y triplete. Esto se traduce en una cinética de emisión más lenta de lo habitual para estados excitados singletes puros, dando lugar a una emisión de cinética intermedia entre fluorescencia ( $10^9 \text{ s}^{-1}$ ) y fosforescencia ( $10^3 \text{ s}^{-1}$ ), por lo que es más correcto denominarla **luminiscencia**.

Como en la mayoría de los luminóforos, la emisión de luz se produce en los complejos de Ru(II) desde el estado electrónico de menor energía ( $^3\text{MLCT}$ , **regla de Kasha**).<sup>24</sup> Esto significa que el fotón de luz emitido es menos energético que el absorbido y, por tanto, la banda de emisión aparece desplazada con respecto a la de excitación. Esta separación de bandas, denominada *desplazamiento de Stokes*, es de gran importancia en estos compuestos ya que, como hemos visto en epígrafes anteriores, posibilita la utilización de sencillos filtros de vidrio coloreados para discernir la emisión del complejo de la luz procedente de la fuente de excitación.

La emisión en un luminóforo sigue también la denominada **ley del espaciado energético**, según la cual para que un compuesto emita es necesario que exista una distancia adecuada desde el estado excitado hasta el fundamental, ya que si ésta es muy pequeña la desactivación será rápida y sin emisión de luz.

A continuación se describen algunos parámetros característicos y factores que afectan a la cantidad de luz emitida por los complejos:

#### A) RENDIMIENTO CÚANTICO DE EMISIÓN.

Se define el rendimiento cuántico de emisión ( $\Phi_{\text{em}}$ ) como la relación existente entre el número de fotones producidos durante el proceso de desactivación y el número de fotones absorbidos por el compuesto:

$$\Phi_{\text{em}} = \Phi_{\text{CIS}} \times \eta_{\text{r}} \quad (5)$$

<sup>24</sup> Juris, A., Balzani, V., Barigelletti, S., Campagna, S., Belser, P. y Von Zelewsky, A., *Coord. Chem. Rev.*, **1998**, 84, 85.

siendo  $\Phi_{\text{CIS}}$  el rendimiento cuántico de cruce intersistemas (número de estados excitados triplete (emisores) formados a partir de singlete dividido entre el número de fotones absorbidos) y  $\eta_r$  la eficiencia cinética del proceso radiativo, función de las constantes de desactivación radiativa y no radiativas totales ( $\eta_r = k_r / (k_r + k_{nr})$ ).

Para complejos de Ru(II) con ligandos poliazaheterocíclicos quelatantes, el valor de  $\Phi_{\text{CIS}}$  es habitualmente la unidad,<sup>25</sup> aunque depende de la naturaleza de los ligandos, especialmente cuando éstos están constituidos por anillos de cinco eslabones.<sup>26</sup>

## **B) CINÉTICA DE LA EMISIÓN.**

En el apartado 2.4.2. de estos *Antecedentes* se definió el tiempo de vida de desactivación del estado excitado emisor ( $\tau$ ), como el tiempo transcurrido desde que se excita el compuesto hasta que únicamente quedan 1/e moléculas en el estado excitado. Matemáticamente, en ausencia de desactivador en el medio, este parámetro fotofísico se puede expresar como el inverso de las constantes de desactivación unimoleculares:

$$\tau = \frac{1}{\sum_i k_i} = \frac{1}{k_r + k_{nr}} \quad (6)$$

El tiempo de vida de emisión no depende de la longitud de onda de excitación, aunque sí de la temperatura, del entorno de la molécula y de la presencia de desactivadores en el medio. En la sección *Antecedentes* del optodo de temperatura (apartado 2.2.) se explicará con detalle el efecto de este parámetro físico sobre la luminiscencia de los complejos de Ru(II).

## **C) DESACTIVACIÓN POR OXÍGENO MOLECULAR.**

El oxígeno molecular desactiva eficazmente la luminiscencia de moléculas orgánicas y de complejos de coordinación.<sup>27</sup> Para que la emisión de luz de un compuesto disminuya por la presencia de O<sub>2</sub> en el medio es necesario que el estado excitado de este desactivador sea energéticamente menor que el estado excitado desde el que se produce la luminiscencia y que el **tiempo de vida** de

---

<sup>25</sup> Watts, R. J., *J. Chem. Educ.*, **1983**, 60, 834.

<sup>26</sup> Orellana, G. y Braun, A. M., *J. Photochem. Photobiol.*, **1989**, 48, 277.

<sup>27</sup> Pfeil, A., *J. Am. Chem. Soc.*, **1971**, 93, 5395.



emisión sea lo suficientemente **largo** como para que se produzca el choque con el oxígeno. Estas dos premisas se cumplen con los complejos de Ru(II), ya que el estado MLCT está situado por encima del primer estado excitado del oxígeno, el oxígeno singlete ( $^1\text{O}_2$ ) y sus tiempos de vida, generalmente, son lo suficientemente elevados como para que tengan lugar las colisiones.

La transferencia de energía luminóforo-desactivador puede tener lugar de dos maneras distintas:

- **Interacción coulombica dipolo-dipolo.** No es necesario contacto físico entre las moléculas.
- **Intercambio electrónico.** En este caso deben solapar los orbitales de las moléculas, por lo que la colisión es obligada. Este mecanismo de transferencia de energía es el más importante en los complejos de Ru(II).<sup>28</sup>

En medios homogéneos, la desactivación bimolecular por oxígeno es un proceso dinámico que se rige por la ecuación de Stern-Volmer (ecuaciones 3 y 4, apartado 2.4.2.).

#### **D) EFECTO DEL MEDIO SOBRE LA LUMINISCENCIA DEL COMPLEJO.**

El valor del rendimiento cuántico de emisión de un complejo de Ru(II) depende del medio que le rodea. Así, la presencia de **osciladores O-H** en un disolvente provoca una disminución en la luminiscencia del compuesto debido a que la separación entre los estados vibracionales de estos disolventes coincide con la separación de estos mismos estados en los complejos de Ru(II).<sup>29</sup> El efecto contrario (aumento de la emisión) se produce frecuentemente cuando se inmoviliza el indicador sobre un soporte sólido. La rigidez del sistema impide la vibración de la molécula, dificultando esa vía de desactivación no radiativa.

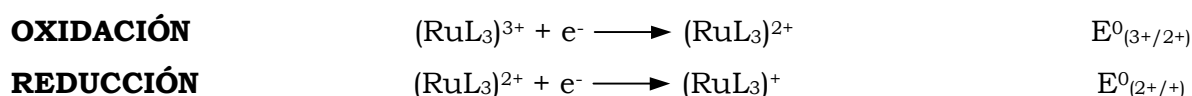
---

<sup>28</sup> García-Fresnadillo, D., Georgiadou, Y., Orellana, G., Braun, A. M. y Oliveros, E., *Helv. Chim. Acta*, **1996**, 79, 1222.

<sup>29</sup> Van Houten, J. y Watts, R. J., *J. Am. Chem. Soc.*, **1976**, 98, 4853.

### 3.5. PROPIEDADES ELECTROQUÍMICAS.

Los complejos de rutenio(II) con ligandos poliazaheterocíclicos participan en numerosos procesos de transferencia electrónica. La estabilidad de las formas oxidada y reducida del metal posibilitan la existencia de complejos metálicos octaédricos de rutenio monovalentes, divalentes y trivalentes, siendo los segundos los más estables termodinámicamente. Los procesos *redox* que dan lugar a estas especies son (en el sentido de la reducción):



Los potenciales *redox* de complejos de Ru(II) diferentes dependerán de la naturaleza de los ligandos que quelatan el metal y, en concreto, de su mayor o menor carácter  $\sigma$ -dador y  $\pi$ -aceptor.<sup>22</sup> De esta forma, el proceso de **oxidación** que tiene lugar desde los orbitales  $t_{2g}$  del metal, se ve favorecido por ligandos básicos ( $\sigma$ -dadores) ya que al aumentar la energía de estos orbitales disminuye el potencial de oxidación del complejo. Los ligandos  $\pi$ -aceptores, sin embargo, favorecen la retrocesión  $\pi$ , estabilizando los orbitales  $t_{2g}$  y aumentando, por tanto, el potencial de oxidación. En resumen, para ligandos de la misma serie, la presencia de sustituyentes electroattractores aumenta el potencial de oxidación, mientras que si son electrodonadores lo disminuyen.

En el proceso de **reducción**, los complejos de Ru(II) aceptan un electrón en un orbital  $\pi^*$  de un ligando. La capacidad de aceptación del electrón dependerá de la cantidad de carga transferida en el estado fundamental entre el metal y el ligando. Así, cuanto más  $\pi$ -aceptores sean los ligandos más fácilmente se reducirá el complejo.

Una de las características más interesantes de los potenciales redox en los complejos de Ru(II) es la variación que éstos experimentan cuando se excita la molécula. En la figura 12 se observa cómo en el estado excitado de menor energía (<sup>3</sup>MLCT) dos electrones quedan desapareados en orbitales  $t_{2g}$  y  $\pi^*$ . El gasto energético que supone tanto arrancar el electrón del orbital  $\pi^*$  (oxidación) como la energía desprendida al incorporar uno en los  $t_{2g}$  (reducción), es mucho menor

cuando el complejo se encuentra en el estado electrónico excitado. Por tanto, los complejos de Ru(II) excitados son más oxidantes y reductores que en su estado fundamental.<sup>30</sup>

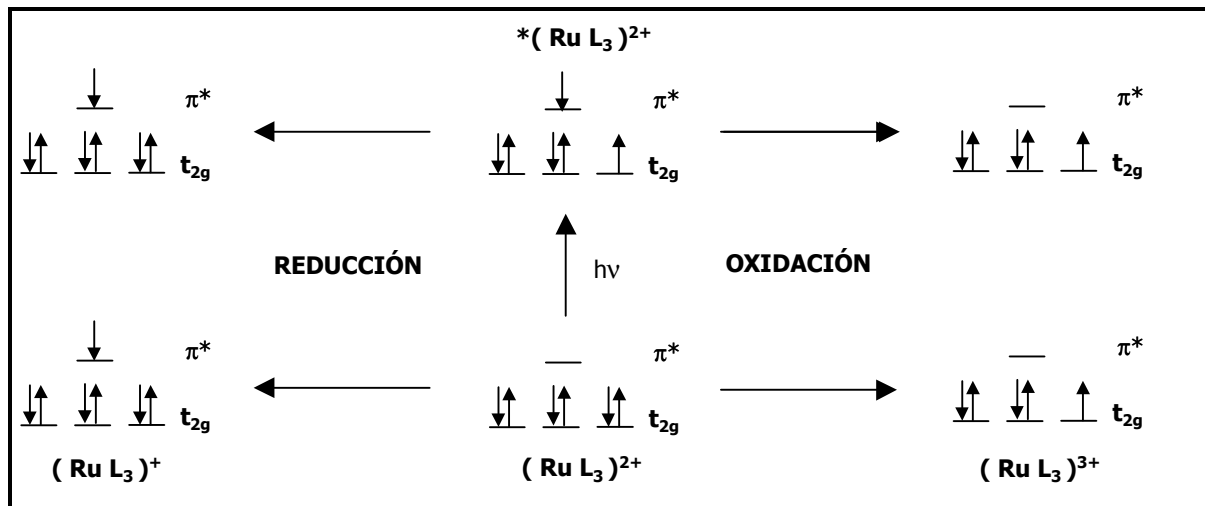


Figura 12. Comparación de los procesos redox que tiene lugar en el estado fundamental y excitado de un complejo de Ru(II) con ligandos de campo fuerte.

### 3.6. APLICACIONES. SENSORES DE FIBRA ÓPTICA.

Los complejos de coordinación de Ru(II) se han empleado en numerosas ocasiones como indicadores ópticos en la construcción de optodos.<sup>31</sup> La eficaz desactivación producida por el **oxígeno** sobre la luminiscencia de estos compuestos ha conducido al desarrollo de sensores de fibra óptica para la medida de este analito tanto en fase gaseosa como en disolución. Su aplicación como transductores de oxígeno ha permitido el desarrollo de sensores ópticos para la medida de **glucosa** o la demanda bioquímica de oxígeno (**DBO**), parámetro que permite hacer una estimación del grado de contaminación del agua por materia orgánica. Otros analitos detectables por la variación que provocan en la luminiscencia de estos compuestos son la **humedad relativa** y el **CO<sub>2</sub>**.<sup>22</sup>

De forma general, los sensores ópticos que utilizan complejos de Ru(II) como indicadores se basan en las excelentes propiedades fotofísicas y

<sup>30</sup> Orellana, G., Quiroga, M. L. y Braun, A. M., *Helv. Chim. Acta*, **1987**, 70, 2073.

<sup>31</sup> Orellana, G., García-Fresnadillo, D., Marazuela, M. D., Moreno-Bondi, M. C., Delgado, J. y Sicilia J. M., *Fiber-optic Chemical Sensors: From molecular engineering to environmental analytical chemistry in the field*, en *Monitoring of Water Quality*, Colin, F. y Quevauviller, P. (eds.), Elsevier Science, Amsterdam (Holanda), **1998**; pp. 103-115.

fotoquímicas que exhiben estos luminóforos. En la revisión bibliográfica que más adelante se lleva a cabo sobre los optodos concretos desarrollados en esta Memoria, se detalla la utilidad de estos compuestos para la medida de parámetros tan significativos como la **temperatura**, el **pH** y los **detergentes**.

Finalmente, los complejos de rutenio encuentran también aplicaciones fuera del campo de los sensores de fibra óptica. Entre otros, estos compuestos han sido utilizados como **fotosensibilizadores**<sup>32</sup> en procesos de transferencia de energía y de transferencia electrónica y como sondas luminiscentes para el estudio de **ácidos nucleicos**.<sup>33</sup> Esto último ha permitido descubrir la **actividad fonucleá sica** que estos luminóforos ejercen sobre el DNA.

---

<sup>32</sup> Hoffman, M. Z., Boletta, F., Moggi, L., y Hug, G. L., *J. Phys. Chem. Ref. Data*, **1989**, 18, 219.

<sup>33</sup> a) Orellana, G., Kirsch-De Mesmaeker, A., Barton, J. K. y Turro, N. J., *Photochem. Photobiol.*, **1991**, 54, 499. b) Knapp, C., Lecompte, J. P., Kirsch-De Mesmaeker, A. y Orellana, G., *Photochem. Photobiol.*, **1996**, 36, 67. c) Chow, C. S. y Barton, J. K., *Meth. Enzymol.*, **1992**, 212, 219.

El conjunto de sensores ópticos incluidos en esta Memoria han sido diseñados para poder ser interrogados, por *detección sensible a la fase*, en el dispositivo instrumental desarrollado por el *Departamento de Ingeniería Electrónica* de la empresa *T.G.I.*, denominado *DEMODE*. El equipo que se describe a continuación corresponde a la versión del prototipo con el que se realizaron la mayor parte de las medidas, producto de continuas modificaciones llevadas a cabo en los componentes optoelectrónicos del sistema a partir de su evaluación con los optodos objeto de este Proyecto, con el fin de optimizar sus prestaciones y adecuarlas a las propiedades espectroscópicas de las sondas diseñadas.

## **1. LUMINISCENCIA CON RESOLUCIÓN TEMPORAL Y CON DETECCIÓN SENSIBLE A LA FASE.**<sup>10</sup>

En las últimas décadas han proliferado los estudios de fluorescencia realizados a partir del tiempo de vida de emisión ( $\tau$ ) que exhibe un luminóforo, ya que la información obtenida con este método es mayor que la extraída de medidas en estado estacionario. En el epígrafe de los *Antecedentes* donde se describen los sensores basados en medidas de luminiscencia (2.4.2.), se adelantó brevemente la existencia de dos técnicas que permiten determinar el  $\tau$  de un indicador: detección con resolución temporal y detección sensible a la fase.

En medidas con **resolución n temporal** se excita el luminóforo con un pulso de luz para, a continuación, medir la extinción de la luminiscencia del compuesto en función del tiempo. El tiempo de vida de emisión se calcula entonces a partir de la cinética de desactivación del indicador, el cual corresponde al inverso de la constante de velocidad con la que transcurre el proceso cinético unimolecular de desactivación del luminóforo fotoexcitado.

$$I(t) = I_0 \exp(-t/\tau) \quad (7)$$

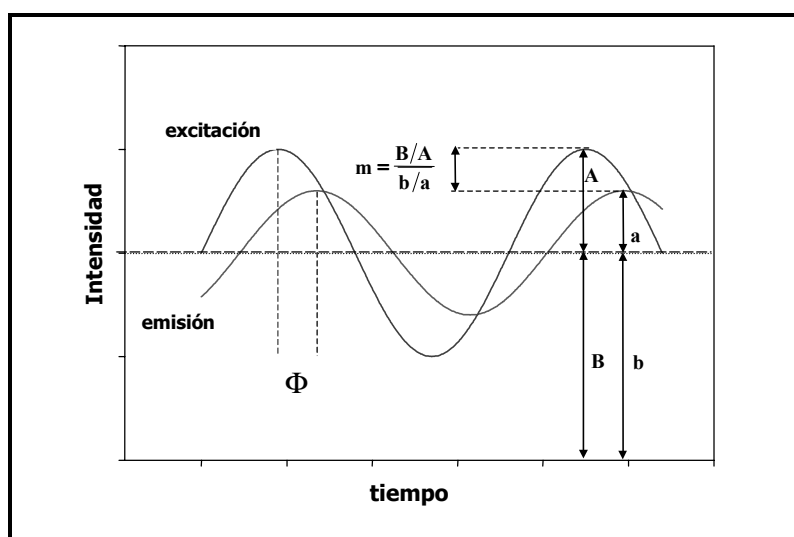
Cuando una muestra contiene una mezcla de fluoróforos, la curva global de extinción de la luminiscencia obtenida se ajusta típicamente a un modelo multiexponencial:

$$I(t) = \sum_i \alpha_i \exp(-t/\tau_i) \quad (8)$$

donde  $\alpha_i$  representa la fracción de cada fluoróforo en la cinética de desactivación registrada. Este mismo planteamiento es aplicable a sistemas heterogéneos que contienen un único indicador luminiscente en diferentes entornos, siendo entonces  $\alpha_i$  la fracción de moléculas de compuesto emisor en cada dominio ( $\sum \alpha_i$  se normaliza a la unidad). Para este tipo de sistemas complejos, se calcula el *tiempo de vida medio* ( $\tau_M$ )<sup>34</sup> o *promedio* ( $\langle \tau \rangle$ ) con *pesada preexponencial*,<sup>10</sup> a partir de las siguientes ecuaciones:

$$\tau_M = \frac{\sum_i \alpha_i \tau_i}{\sum_i \alpha_i} \quad \langle \tau \rangle = \frac{\sum_i \alpha_i \tau_i^2}{\sum_i \alpha_i \tau_i} \quad (9)$$

El segundo método empleado para determinar los tiempos de vida de emisión es la **detección sensible a la fase**. Al contrario que en las medidas con resolución temporal, la muestra se excita con luz continua modulada sinusoidalmente, de forma que la emisión de la sonda se produce modulada a la misma frecuencia de excitación, pero desfasada con respecto a ésta debido al tiempo en que la molécula permanece en el estado excitado (figura 13).



**Figura 13.** Representación esquemática del desfase ( $\phi$ ) y la desmodulación ( $m$ ) de la emisión de un compuesto con respecto a la luz de excitación.

<sup>34</sup> Carraway, E. R., Demas, J. N., DeGraff, B. A. y Bacon, J. R., *Anal. Chem.*, **1991**, 63, 332.

En la figura 13 se observa que no sólo se produce un *desfase* ( $\phi$ ) en la emisión de luz procedente del luminóforo, sino que disminuye también el *factor de modulación* ( $m$ , relación de amplitudes) con respecto a la excitación. A partir de estos dos parámetros, cuando la cinética de desactivación es estrictamente **monoexponencial**, se puede determinar el  $\tau$  del luminóforo aplicando las ecuaciones 10 u 11:<sup>10</sup>

$$\tau_{\phi} = \frac{\tan\phi}{\omega} \quad (\omega = 2\pi f) \quad (10)$$

$$\tau_m = \frac{\left[(1/m^2 - 1)\right]^{1/2}}{\omega} \quad (11)$$

siendo  $f$  la frecuencia de modulación de la fuente de excitación. A pesar de que en sistemas sencillos  $\tau_{\phi}$  y  $\tau_m$  coinciden, en general el primero suele ser más corto que el determinado a partir del factor de modulación. En muestras complejas, donde la cinética de desactivación es **multiexponencial**, los tiempos de vida calculados a partir de las ecuaciones anteriores para una frecuencia dada son valores *aparentes*, resultado de un complejo sistema de ponderación de los  $\tau$  individuales correspondientes a los distintos componentes de la muestra (ecuación 12).<sup>10</sup>

$$\tau_{\phi}^{ap} = \frac{\sum_i \alpha_i \tau_i^2 / (1 + \omega^2 \tau_i^2)}{\sum_i \alpha_i \tau_i / (1 + \omega^2 \tau_i^2)} \quad (12)$$

En esta expresión, cada componente se pondera por un factor  $\alpha_i \tau_i / (1 + \omega^2 \tau_i^2)$  en lugar del utilizado para calcular  $\tau_M$  y  $\langle \tau \rangle$  ( $\alpha_i$  y  $\alpha_i \tau$ , respectivamente, ec. 9). Por este motivo, los componentes de menor tiempo de vida tienen más peso sobre la cinética de desactivación global cuando se determinan a partir del ángulo de desfase, dando lugar a que los valores obtenidos de  $\tau_{\phi}^{ap}$  sean *inferiores* a los tiempos de vida promedio con pesada preexponencial. Además, un aumento en la frecuencia de modulación incrementa la contribución relativa del tiempo corto, disminuyendo aún más  $\tau_{\phi}^{ap}$ .

Los fotomultiplicadores, empleados normalmente como sistema de detección en medidas de luminiscencia con resolución en fase, presentan una respuesta dependiente de la longitud de onda observada. El error debido a esta dependencia, junto con el desfase que introducen el resto de componentes electrónicos del equipo puede corregirse con la utilización de **patrones** de tiempo de vida conocido, los cuales deben exhibir una cinética de desactivación monoexponencial, a longitudes de onda próximas a las de la muestra, con un tiempo de vida de emisión lo más corto posible (cercano a 1 ns) con objeto de evitar que se produzca una disminución en la precisión de los ángulos de fase medidos. Otra de las ventajas que implica la utilización de estas sustancias patrón con un tiempo de vida tan corto es el mínimo efecto que provoca el oxígeno presente en el medio sobre su luminiscencia. El patrón elegido debe absorber y emitir en la misma región del espectro que el fluoróforo en estudio, de forma que se pueda emplear el mismo sistema de filtros y monocromadores en ambos casos.

Para corregir las medidas realizadas con resolución de fase en el demostrador desarrollado por T.G.I. se empleó una membrana ionomérica perfluorosulfonada (Nafion<sup>®</sup>) que incorpora un fluoróforo inmovilizado (catión etidio) cuyas longitudes de onda de excitación y de emisión son similares a los característicos de los complejos de Ru(II), pero cuyo tiempo de vida de emisión ( $\lambda_{\text{máx}}^{\text{abs}} = 518 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{máx}}^{\text{em}} = 605 \text{ nm}$ ,  $\sim 2 \text{ ns}$ ) se puede considerar despreciable en relación con los que exhiben nuestros sensores ópticos basados en complejos polipiridílicos de Ru(II).

## **2. DISPOSITIVO INSTRUMENTAL PARA MEDIDAS CON RESOLUCIÓN DE FASE: EQUIPO DEMODE.**

El demostrador desarrollado por T.G.I. para la medida de contaminantes en agua mediante optosensores luminiscentes sobre fibra óptica y detección sensible a la fase, consta de cuatro bloques principales conectados a un ordenador para la recogida, almacenamiento y procesamiento de los datos. El equipo puede asimismo funcionar de manera autónoma, utilizando el ordenador únicamente para el tratamiento de datos. A continuación, se describen los componentes básicos del dispositivo instrumental bautizado con el nombre de “*DEMODE*”.



- **Sistema de generación de la señal de excitación.**

El sistema de generación de la señal de luz procedente de la fuente de excitación del sensor óptico consta, a su vez, de dos partes:

- **Parte digital** (figura 14, **A**). Básicamente se trata de un *oscilador digital* encargado de generar la señal sinusoidal sintética que modula la intensidad de luz de la fuente de excitación. En el prototipo utilizado para validar los sensores desarrollados en esta Memoria la frecuencia de esta señal puede seleccionarse entre 20 y 140 KHz.

- **Parte analógica** (figura 14, **B**). Encargada de adaptar los niveles de señal generados en la etapa digital para adecuarlos a la señal necesaria para alimentar la fuente de excitación. Como fuente de excitación se emplea un *diodo emisor de luz azul* de alta intensidad (**C**, 470 nm), el cual se encuentra modulado dentro de los límites lineales de respuesta del diodo.

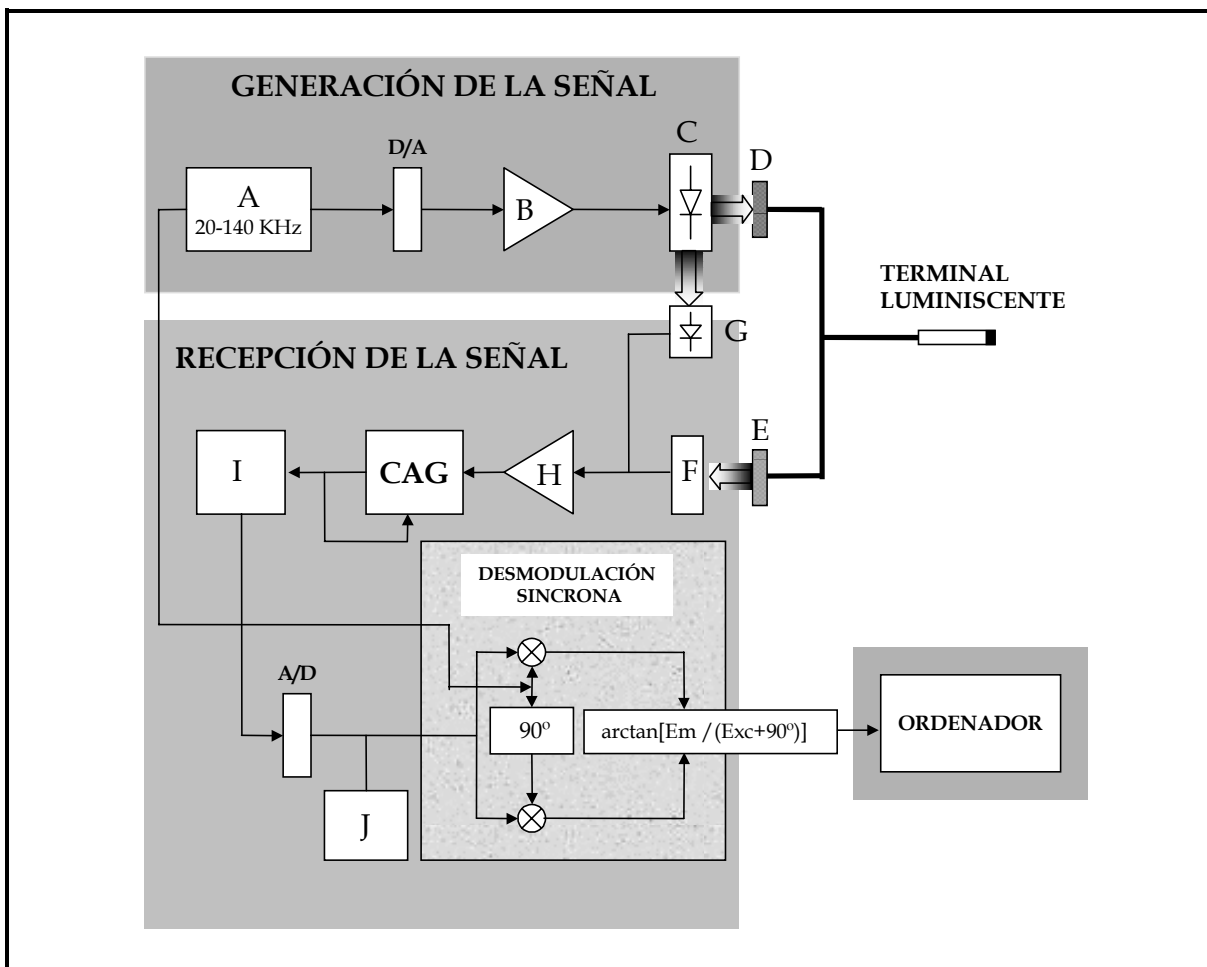
Ambas partes están interconectadas por un *convertidor analógico digital (D/A)* que permite generar la senoide analógica a partir de la función sintética que proporciona el oscilador digital.

- **Sistema de recepción de la señal.**

El sistema de recepción de la señal en el equipo *DEMODE* consta asimismo de dos partes:

- **Parte analógica.** Sus componentes se encargan de detectar la señal procedente del terminal sensible a través de una de las ramas de la fibra óptica bifurcada que conecta el sensor luminiscente al sistema, así como de disminuir el ruido de la misma a partir de un primer filtrado. Como sistema detector, este demostrador emplea un *módulo fotosensor* (Hamamatsu H6780) que incorpora un *tubo fotomultiplicador* miniaturizado. La reducción del ruido se realiza a partir de un primer bloque de adaptación de la señal (**H**) y un segundo bloque que consta de *filtros electrónicos de paso-banda* (**I**). La parte analógica incluye asimismo el *control automático de ganancia (CAG)*, compuesto por un *amplificador* de ganancia programable con un margen comprendido entre -10 y 30 dB, que permite adecuar los diferentes niveles de señal recibidos.

– **Parte digital.** Un *convertidor analógico/digital* se encarga en este módulo de digitalizar la señal recibida (**A/D**) para que, posteriormente, un *integrador* realice un primer procesado de la misma, realizando  $n$  promedios entre la señal recibida y las señales acumuladas anteriormente, lo que se traduce en una disminución del ruido de la señal. Las muestras tomadas se procesan a continuación en un *acumulador diezmadador* que permite reducir en mayor grado aún el ruido (**J**).



**Figura 14.** Diagrama de bloques del dispositivo instrumental optoelectrónico fabricado por T.G.I. para medidas de luminiscencia por detección sensible a la fase (sistema DEMODE).

Para determinar el desfase de la señal de emisión con respecto a la de excitación, el sistema realiza una *desmodulación sincrónica* de la primera con respecto a la segunda. Debido a los retardos acumulativos que introducen en la señal original el conjunto de componentes del circuito electrónico, la señal que incide sobre el indicador luminiscente difiere de la señal de salida del convertidor

digital/analógico que alimenta al *LED* en un cierto desfase. Del mismo modo, la senoide que llega a la parte digital del sistema de recepción de la señal sufre cierto retraso (desfase) con respecto a la luminiscencia detectada por el fotomultiplicador. Si se toma la señal sintetizada originalmente como referencia, el desfase que se obtiene como resultado de la desmodulación de la emisión de la sonda tendrá una contribución procedente de los circuitos analógicos de adaptación de la señal. Para minimizar esta contribución el sistema dispone de un fotodiodo (**G, fotodiodo de calibración**), situado directamente a la salida del *LED* de excitación, que recibe la luz emitida por éste y cuya respuesta se emplea como **señal de referencia interna**. Esta señal sufre los mismos retardos acumulativos originados por los componentes electrónicos que la señal incidente sobre el terminal sensible, de forma que quedan eliminadas en el proceso de desmodulación todas las contribuciones al desfase total producidas por los componentes electrónicos a excepción de la que provoca el tubo fotomultiplicador, que queda excluido del recorrido que realiza la señal de referencia (calibración). El desfase introducido por el fotomultiplicador puede corregirse, no obstante, mediante la utilización de las sustancias patrón descritas en el apartado anterior.

- **Componentes ópticos.**

El sistema dispone de filtros ópticos en la salida del *LED* de excitación (**D**) y en la entrada del fotomultiplicador (**E**, filtro de corte a 590 nm). En la primera versión del demostrador, se incorporó en la excitación un filtro de banda ancha centrado a 400 nm. Sin embargo, debido a las interferencias que introducía en la medida de la luminiscencia la fracción de luz que deja pasar este filtro por encima de 600 nm, se sustituyó por un **filtro interferencial** centrado a 420 nm en el prototipo *DEMODE* finalmente empleado.

Este dispositivo instrumental incorpora una fibra óptica de vidrio de haz bifurcado con fibras dispuestas al azar (8 mm de diámetro en el extremo común, 4.5 mm de diámetro en cada una de las ramas, 1.15 m de longitud total, Dolan-Jenner, E-472), a través de la cual se conduce la luz de excitación hacia el terminal sensible y la emisión del indicador hasta el tubo fotomultiplicador.

- **Sistema de elementos auxiliares.**

El demostrador optoelectrónico posee además una serie de elementos auxiliares (sondas de temperatura, presión...) que permiten conocer condiciones ambientales e internas del propio equipo y realizar así las oportunas correcciones.

Para llevar a cabo medidas con resolución de fase en el sistema *DEMODE* es necesario seleccionar inicialmente la frecuencia de modulación del *led* de excitación. El equipo recibe alternativamente la señal procedente del terminal sensible y del fotodiodo de calibración, dando un valor promedio de todos los datos de desfase recogidos desde ambos (típicamente 2000 cada 5 s, aunque el número de promedios es seleccionable por el usuario) y corrigiendo, posteriormente, el primero con respecto al segundo. Como resultado, el equipo muestra una medida cada 10 s.

El **control automático de ganancia** (CAG) juega un papel muy importante en el conjunto de componentes electrónicos del demostrador optoelectrónico, regulando la cantidad de luz recibida por el fotomultiplicador, de forma que la señal que llega al convertidor sea siempre la misma. Para ello, se amplifica la respuesta del detector de manera inversamente proporcional a la intensidad de radiación luminosa recibida y, en consecuencia, se pueden referir los valores de amplificación de señal proporcionados por el sistema a la *intensidad de luminiscencia* del terminal sensible, permitiendo un seguimiento en continuo de la posible fotodegradación del indicador y, adicionalmente, comparar los resultados con las medidas llevadas a cabo en estado estacionario con espectrofluorímetros de laboratorio. Por otra parte, el CAG amplía automáticamente el intervalo dinámico de trabajo del fotomultiplicador, lo que hace posible la medida de distintos parámetros con el simple intercambio de las cabezas sensoras sin necesidad de realizar ajustes en los componentes del equipo.

El prototipo *DEMODE* con la configuración anteriormente descrita ha sido ensayado, en un trabajo paralelo al que se desarrolla en esta Memoria, con terminales sensibles al oxígeno disuelto,<sup>35</sup> amoníaco,<sup>35</sup> CO<sub>2</sub>,<sup>36</sup> humedad relativa<sup>37</sup> y demanda bioquímica de oxígeno (DBO),<sup>37</sup> todos ellos fabricados con complejos

---

<sup>35</sup> Delgado, J., Tesis Doctoral, Universidad Complutense de Madrid, **2000**.

<sup>36</sup> Xavier, M. P., Tesis Doctoral, Universidad Complutense de Madrid, **2001**.

luminiscentes de Ru(II). El equipo y los resultados obtenidos con los optodos incluidos en este Proyecto se han presentado, hasta el momento, en la Feria Internacional del Medioambiente (PROMA, Bilbao, 1997), el IV y V Congreso Internacional de Sensores Ópticos (EUROPT(R)ODE IV, Münster, Alemania, 1998 y EUROPT(R)ODE V, Lyon, Francia, 2000), el IV Congreso Internacional de Fotoquímica de la R.S.E.Q. (Gandía, Valencia, 1999) y el VI Congreso de Métodos Analíticos para Medioambiente (Madrid, 2000). Asimismo, la tecnología desarrollada ha sido merecedora del 1<sup>er</sup> premio a la instrumentación más innovadora en este último foro.



**Figura 15.** Fotografía del sistema *DEMODE*, en la versión utilizada para validar los sensores incluidos en esta Memoria (Feria Internacional de Medioambiente, PROMA'97).

---

<sup>37</sup> Bedoya, M., Tesis Doctoral, Universidad Complutense de Madrid, en curso.



## 1. INTRODUCCIÓN.

La **temperatura** es un parámetro físico de gran relevancia en multitud de áreas distintas, ya que la mayoría de los procesos industriales incluyendo los de la industria química se desarrollan a temperatura controlada. Centrales térmicas y nucleares, estaciones de distribución eléctrica, fundiciones, metalurgia o industria alimentaria (productos lácteos y otros productos de consumo diario) son algunas de las aplicaciones donde la medida de la temperatura puede constituir un buen sistema indicativo de las diferentes etapas por las que evoluciona el sistema, además de ser un factor crítico para el rendimiento global de un proceso. Por otro lado, en medicina, un diagnóstico básico del paciente requiere, en muchas ocasiones, un control de su temperatura corporal. Asimismo, el tratamiento con crioterapia de personas con quemaduras exige un control exhaustivo de la temperatura durante el proceso. En este sentido, el uso de fibras ópticas de pequeño diámetro introducidas en el paciente a través de un catéter ha permitido disponer de un método mínimamente invasivo para el seguimiento de este tratamiento. Además, la casi totalidad de los sensores químicos conocidos, entre los que se encuentran, obviamente, los sensores utilizados para la monitorización de aguas y atmósfera, requieren ineludiblemente una medida paralela de la temperatura que permita corregir la medida del parámetro objetivo (ej. conductividad, oxígeno disuelto, pH, humedad relativa, concentración de aniones o cationes, TOC, ...).

Se conocen un gran número de métodos bien establecidos para la medida de la temperatura. Los termómetros de mercurio y los termopares, entre otros, lideran el mercado de este tipo de sensores. Sin embargo, no siempre estos sistemas son válidos ya que factores externos como el difícil acceso del termómetro al lugar de medida, la presencia de campos electromagnéticos o ambientes fuertemente corrosivos o peligrosos para el operario impiden la utilización de los termómetros convencionales. A pesar de la importancia de los errores cometidos en la medida de la temperatura, en muchas ocasiones se ignoran los principios de medida en los que se basan los termómetros, sometiéndoles a condiciones en las que éstos sistemas no son operativos. La simple agitación mecánica o magnética en un reactor provoca fluctuaciones en la

medida de la temperatura por métodos eléctricos, fácilmente evitables gracias al empleo de **sensores ópticos**, inmunes a las interferencias electromagnéticas.<sup>38</sup>

## 2. SENSORES ÓPTICOS DE TEMPERATURA. <sup>3</sup>

Existen numerosas técnicas para la determinación de la temperatura por métodos ópticos. Algunas de ellas están basadas en propiedades ópticas sensibles a este parámetro físico y otras simplemente aprovechan los cambios experimentados por algunos cuerpos al ser sometidos a distintas temperaturas. Dado que el sensor desarrollado en este Proyecto está basado en medidas de luminiscencia de complejos de Ru(II), se describirá con más detalle la influencia de la temperatura sobre las propiedades fotofísicas de estos compuestos, resumiendo a continuación otros sistemas ópticos para la medida de temperatura descritos en la bibliografía. Algunos de éstos son sensores extrínsecos y otros, sin embargo, aprovechan los materiales que constituyen la fibra óptica para construir el optodo de temperatura.

### A) EXTRÍNSECOS.

- **Termómetros optomecánicos.** Estos termómetros están basados en la expansión o contracción de materiales por efecto de la temperatura. Fijando un espejo sobre la superficie del material se consigue que la luz que lo ilumina y que llega a un fotodetector varíe en función de la temperatura a la que es sometido.
- **Materiales termocrómicos.** Son materiales que experimentan cambios en su espectro de absorción por efecto de la temperatura. Así, Dybko et al. han diseñado un optodo de temperatura basado en el cambio en la absorbancia de una disolución hidroalcohólica de  $\text{CoCl}_2$  (figura 16).<sup>39</sup> En este tipo de disoluciones,

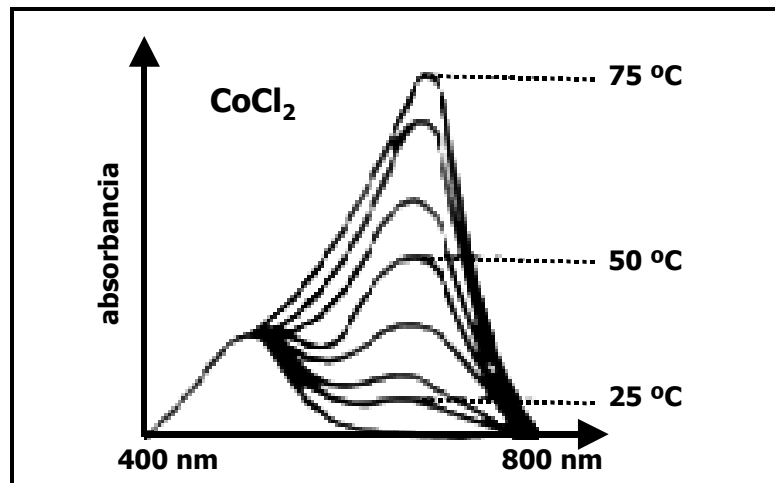
---

<sup>38</sup> Berghmans, F., Vos F. y Decretton, M., *IEEE Trans. Nuc. Sci.*, **1998**, 45, 1537.

<sup>39</sup> Dybko, A., Wroblewski, W., Maciejewski, J., Romaniuk, R. y Brzozka, Z. a) *Assessment of water quality based on multiparametric fiber optic probe*, IV European Conference on Optical Chemical Sensors and Biosensors (Europt(r)ode IV), libro de resúmenes, Münster (Alemania), **1998**. b) *Fiber optic probe for drinking monitoring*, Chemical, Biochemical and Environmental Sensors IX, Munich (Alemania), *Proc. SPIE*, **1997**, 3105.



el Co(II) se puede encontrar en coordinación octaédrica o tetraédrica, siendo el equilibrio entre estas dos formas dependiente de la temperatura de la disolución. Los autores construyen un terminal sensible polimerizando en un tubo la disolución anterior con *HEMA*. Siempre que se mida intensidad de luz, absorbida o emitida, se hace necesario utilizar una referencia que corrija las posibles fluctuaciones de la fuente. En este caso la referencia puede ser el mismo indicador, ya que una de las dos bandas que muestra su espectro de absorción no varía con la temperatura. Utilizando un espejo dicróico que divida en dos la luz transmitida por la muestra se puede registrar de forma paralela la absorbancia de las dos bandas, permitiendo así realizar las correcciones oportunas.<sup>40a</sup>



**Figura 16.** Cambios producidos por la temperatura en el espectro de absorción del cloruro de cobalto(II), en disolución hidroalcohólica. La banda centrada a 500 nm corresponde a la forma octaédrica del complejo, mientras que la intensa banda que varía con la temperatura (667 nm) se debe a la forma tetraédrica.<sup>40b</sup>

- **Termómetros ópticos de semiconductores.** Estos optodos de temperatura están basados en la medida de la absorción de luz por un semiconductor intercalado en la fibra. A medida que aumenta la temperatura, se produce una disminución en la diferencia de energía (*gap*) existente entre la banda de valencia y la banda de conducción de estos materiales, provocando un desplazamiento batocrómico en su espectro de absorción. En la práctica se utilizan dos diodos LEDs como fuente de radiación: la luz del primero es atenuada por la absorción del semiconductor (generalmente GaAs o ZnSe) en mayor o menor medida en

<sup>40</sup> a) Changchun, L. *Optical fiber temperature sensor used in biomedicine*, Proc SPIE, **1997**, 2976, 57. b) Medlock, R. S., *Int. J. Opt. Sens.*, **1986**, 1, 43.

función de la temperatura, mientras que el segundo se utiliza como referencia, al ser el material transparente a su radiación.<sup>41</sup> Algunos autores prefieren, sin embargo, evitar las medidas en intensidad y basar en sensor en el desplazamiento experimentado por las bandas de absorción.

## **B) INTRÍNSECOS.**

- **Termómetros de fibra óptica distribuida.** Los sensores de fibra óptica distribuida se caracterizan porque, además de ofrecer información sobre la *magnitud* de la medida, también aportan datos sobre su *localización*. Estos optodos no registran la temperatura global de la muestra, sino que ofrece medidas puntuales y en posiciones conocidas, ya que la fibra óptica, en toda su longitud, constituye la fase sensora. Por lo general los sensores distribuidos se basan en algunos fenómenos ópticos que se producen a lo largo de la fibra, como la **dispersión Rayleigh**<sup>42</sup> o el efecto **Raman**.<sup>43</sup>

- **Optodos interferométricos.** Están basados en el fenómeno óptico de *interferencia* que se produce al solapar dos ondas. En los interferómetros, el haz de luz procedente de una fuente se divide en dos; una parte del haz atraviesa la muestra y el otro sirve como referencia. Una vez atravesada la muestra los dos haces se recombinan y la radiación resultante es conducida hasta un fotodetector. En los optodos intrínsecos basados en este método, la fibra óptica actúa de sensor, empleando materiales en la fabricación de su núcleo y revestimiento con diferentes constantes de dilatación térmica. Un aumento de la temperatura produce tensiones internas en el interior de la fibra que dan lugar a una variación en la fase de la radiación que se propaga a través de ésta. El equipo compara la fase del haz de medida con respecto al haz de referencia y correlaciona el desfase obtenido con la temperatura que lo origina.

Habitualmente los termómetros interferométricos se construyen con configuración Michelson,<sup>44</sup> Mach-Zehnder<sup>45</sup> o Fabry-Perot,<sup>46</sup> siendo la más

---

<sup>41</sup> White, S. R. y Nave, S. E., *Appl. Spectrosc.*, **1999**, 53, 1138.

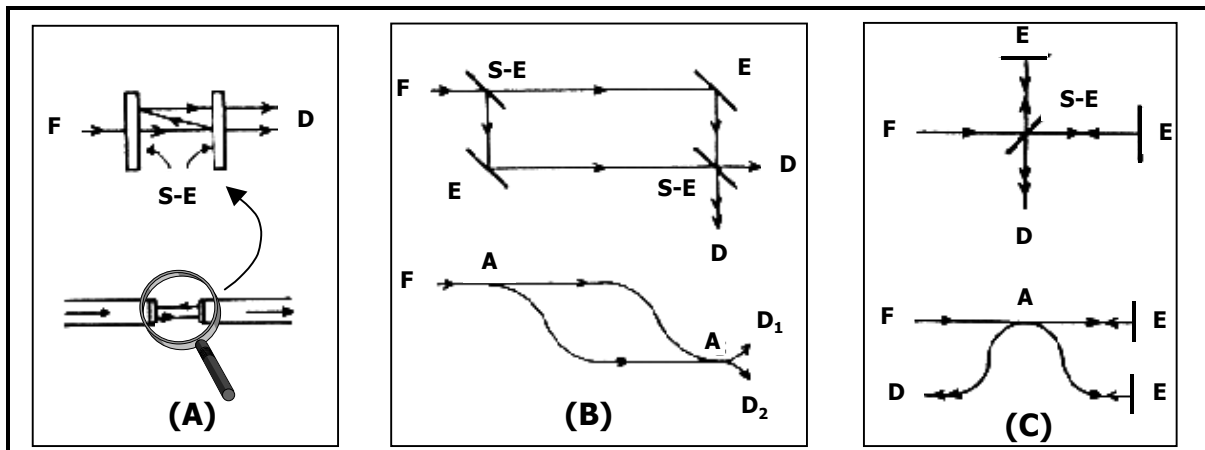
<sup>42</sup> Hartog, A. H., *J. Lightwave Technol.*, **1983**, 489.

<sup>43</sup> Feced, R., Farhadiroushan, M., Handerek, V. A. y Rogers, A. J., *IEEE Proc. Opt.*, **1997**, 144, 183.

<sup>44</sup> Corke, M., Kersey, A. D., Jackson D. A. y Jones, J. D. C., *Electron. Lett.*, **1983**, 19, 471.

<sup>45</sup> Choi, H. S., Taylor, H. F. y Lee, C. E., *Opt. Letts.*, **1997**, 22, 1814.

utilizada la segunda de ellas, debido a su gran estabilidad (figura 17). Sin embargo, algunos autores diseñan su propio interferómetro para construir el optodo.<sup>47</sup>



**Figura 17.** Distintas configuraciones de interferómetros: (a) Fabry-Perot, (b) Mach-Zehnder y (c) Michelson. (F: fuente láser, D: detector, A: acoplador, E: espejo, S-E: semiespejo).

## 2.1. TERMÓMETROS ÓPTICOS LUMINISCENTES.<sup>48</sup>

La termometría de luminiscencia es una técnica en la que la medida de la temperatura de una muestra se correlaciona con el aumento o la disminución en la cantidad de luz emitida por un compuesto. A su vez, esta técnica puede basarse en dos métodos distintos: (a) la **disminución de la emisión** de un luminóforo por desactivación térmica, en la que se monitoriza la **intensidad luminosa** o la **cinética de emisión** (técnicas con *resolución temporal*), o bien (b) la luz emitida por los cuerpos al calentarse (**pirometría infrarroja**). En ambos métodos los efectos de la temperatura son opuestos, ya que en este último la temperatura provoca la emisión de luz, al contrario que en el primero, donde es la responsable de la desactivación de la emisión. A continuación se describen

<sup>46</sup> Corke, M., Jones, J. D. C., Kersey, A. D. y Jackson, D. A., *Dual Fabry-Perot interferometer implemented in parallel on a single mode optic fiber*, en *Tech. Digest 3<sup>rd</sup> Int. Conf. on Opt. Fibre Sensors*, San Diego (EE. UU.), *Optical Society of America*, **1985**; p. 128.

<sup>47</sup> Cortes, R., Khomenko, A. V., Starodumov, A. N., Arzate, N. y Zenteno, L. A., *Opt. Comm.*, **1998**, 154, 268.

<sup>48</sup> Grattan, K. T. V. y Zhang, Z. Y., *Fiber Optic Fluorescence Thermometry*, en *Topics in Fluorescence Spectroscopy*, vol. 4, Lakowicz, J. R. (ed.), Plenum Press, Nueva York (EE. UU.), **1994**; pp. 335-376.

algunos de los luminóforos empleados en la construcción de optodos de temperatura, así como los métodos en los que están basados.

- **Pirometría a infrarroja.** La medida de altas temperaturas puede llevarse a cabo por métodos ópticos gracias a la energía radiante emitida por los cuerpos al ser calentados.<sup>49</sup> Este sistema, basado en la Ley de Planck sobre la radiación, se conoce también como *emisión de un cuerpo negro (black body emission)* y generalmente se utiliza para temperaturas por encima de los 500 °C, por ser a altas temperaturas cuando la emisión ocurre en regiones del espectro donde pueden actuar los detectores convencionales. En estos casos se recurre a fibras de zafiro, operativas hasta los 1500-2000 °C, debido a que las habituales no resisten temperaturas tan elevadas. La aparición de sistemas de detección como los diodos de germanio o los basados en PbSe enfriado, que se extienden hasta los 2 y 10 μm, respectivamente, han permitido el desarrollo de termómetros ópticos basados en este sistema para temperaturas inferiores (60-150 °C).<sup>50</sup>

- **Termómetros de resistencia mixtos.** Las interferencias electromagnéticas que impiden la utilización de los sensores eléctricos han impulsado el desarrollo de sensores mixtos. En el sistema descrito en la bibliografía por Murray,<sup>51</sup> el sensor primario es un termómetro de resistencia que funciona por conversión fotovoltaica de la emisión (sensible a la temperatura) procedente de un LED de 820 nm. Una batería de fotodiodos de silicio convierte la señal óptica de varios mW en una señal eléctrica de 5 V de corriente continua. La transmisión de la señal se produce vía fibra óptica, con objeto de evitar posibles interferencias.

- Los **cristales láser dopados con Cr<sup>3+</sup>** se caracterizan por exhibir un amplio espectro de absorción en las regiones UV y VIS que permite la utilización de fuentes de luz de bajo coste. La diferencia de energía entre los niveles electrónicos de este catión depende de la fortaleza del campo del cristal donde se encuentre alojado. Así, en cristales de campo débil el tiempo de vida de emisión decrece rápidamente con el aumento de la temperatura en una única región, mientras

---

<sup>49</sup> Dixon, J., *Meas. Control*, **1987**, 20, 11.

<sup>50</sup> Mordon, S., Zonde, S. y Brienetaud, J. M., *Non contact temperature measurement with a zirconium glass fiber*, en *Proc. Optical Fiber Sensors 2*, Nueva Orleans (EE. UU.), publicado por la *Optical Society of America*, **1988**; p. 502.

<sup>51</sup> Murray, R. T., *Int. J. Opt. Sens.*, **1986**, 1, 27.

que en los de campo fuerte se observan dos regiones distintas de temperatura en las que la emisión disminuye (figura 18).

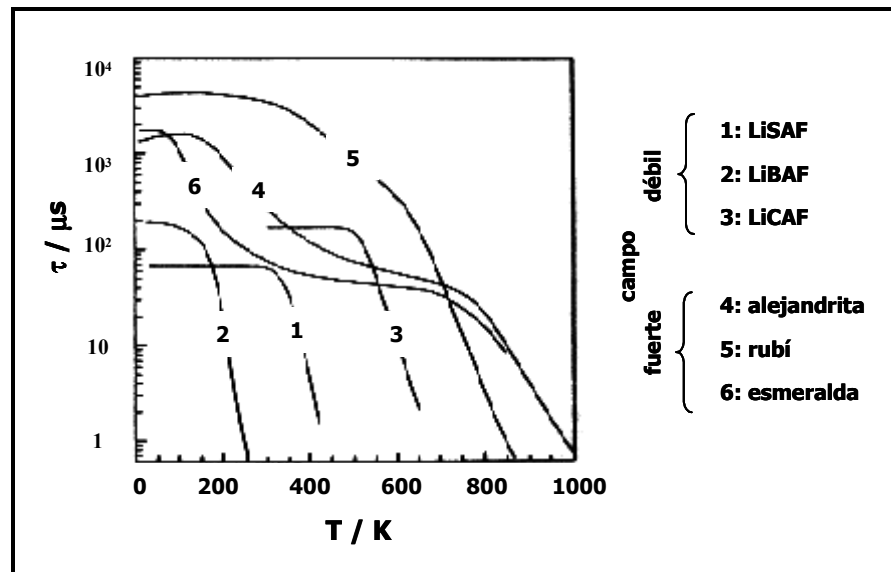


Figura 18. Dependencia con la temperatura de la luminiscencia del  $\text{Cr}^{3+}$  alojado en cristales de campo fuerte y campo débil.<sup>48</sup>

Algunos ejemplos de termómetros ópticos basados en estos cristales son:

a) Cristales de campo débil:

- **Cr:LiSAF** ( $\text{LiSrAlF}_6$ ): este material dopado con cromo se ha empleado en la fabricación de un termómetro para aplicaciones biomédicas (30-50 °C), aunque es sensible a la temperatura en un intervalo más amplio (entre 25 y 110 °C, aprox.), correspondiente a una disminución en su tiempo de vida de emisión de 65 a 10  $\mu\text{s}$ . Como fuente de excitación, se ha empleado en este sistema un diodo láser de 670 nm y un filtro de corte a 720 nm para aislar la emisión.<sup>52a</sup>

b) Cristales de campo fuerte:

- **Rubí** ( $\text{Cr:Al}_2\text{O}_3$ ): El rubí, además de ser una apreciada gema, constituye uno de los cristales láser más conocidos cuyo tiempo de vida de luminiscencia es muy sensible a la temperatura (20-250 °C y 350-600 °C). En un equipo experimental diseñado por Zhang et al.,<sup>52b</sup> el rubí se excita con un LED

<sup>52</sup> Zhang, Z. Y., Grattan, K. T. V. y Palmer, A. W., a) *Int. Conf. on Biomedical Optics*, Los Ángeles (EE.UU.), *SPIE Proc.* **1993**, 1885, 300. b) *Rev. Sci. Instrum.*, **1991**, 62, 1735. c) *Rev. Sci. Instrum.*, **1992**, 63, 3177.

verde centrado en 550 nm, utilizando un filtro de corte a 630 nm para eliminar la emisión del LED que solapa con la del rubí ( $\lambda_{\text{máx}}^{\text{em}} = 694 \text{ nm}$ ).

- **Alejandrita** (Cr:BeAl<sub>2</sub>O<sub>4</sub>): Los mismos autores han desarrollado un prototipo basado en la disminución del tiempo de vida de emisión de la alejandrita con la temperatura. En este caso, el cristal es excitado con un diodo láser de 670 nm y el intervalo de medida abarca desde temperatura ambiente hasta 700 °C.<sup>52c</sup>
  
- En el estado excitado, algunos compuestos se asocian entre sí (**excímeros**) o con otras moléculas (**exciplejos**), desactivándose posteriormente con emisión de luz. Generalmente el proceso de unión entre ambos compuestos es un proceso exotérmico y, por tanto, un aumento de la temperatura desplaza el equilibrio hacia las formas libres, disminuyendo la luminiscencia. En la bibliografía se han descrito algunos termómetros ópticos para medidas en disolución basados en este principio de medida.<sup>53,54</sup>
  
- En algunos termómetros ópticos luminiscentes la emisión del indicador no varía con la temperatura de la muestra donde está disuelto, sino que se realizan **medidas indirectas** basadas en los cambios que este parámetro físico provoca en algún factor del que sí depende la emisión del compuesto, como el índice de refracción del disolvente.<sup>55</sup>
  
- Finalmente, se pueden desarrollar **optodos intrínsecos** para la medida de la temperatura mediante el conveniente dopaje de las fibras ópticas con luminóforos sensibles a este parámetro.<sup>56</sup>

A continuación se resumen en la tabla 6 los principales indicadores luminiscentes que aparecen en algunas patentes de termómetros ópticos.

---

<sup>53</sup> Stufflebeam, J. H., *Appl. Spectrosc.*, **1989**, 42, 274.

<sup>54</sup> Figueroa, I. D., El Baraka, M., Quiñones, E., Rosario, O. y Deumié M., *Anal. Chem.*, **1998**, 70, 3974.

<sup>55</sup> Schrum, K. F., Williams, K. F., Haerther, S. A. y Ben-Amotz, D., *Anal. Chem.* **1994**, 66, 2788.

<sup>56</sup> Wade, S. A., Muscat, J. C., Collings, S. F. y Baxter, G. W., *Rev. Sci. Instrum.*, **1999**, 70, 4279.

Tabla 6. Principales patentes que hacen referencia a sensores ópticos para la medida de temperatura.

No Patente	Año	Título	Inventor/es	Solicitante	Indicador/es
US 5980105	1999	Device of optically measuring a cryogenic temperature	Rouhet, J. Y., Tribillon, G. M., Bertrand, S. F. y Boulon, G.	Societe Europeenne de Propulsion (Francia)	Yb <sup>2+</sup> ; SrF <sub>2</sub> Yb <sup>2+</sup> ; CaF <sub>2</sub>
EP 870189	1998	Optical temperature sensors and optical-chemical sensors with optical temperature compensation	Klimant, I. y Holst, G.	Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e. V. (Alemania)	[Ru(phen) <sub>2</sub> ](LS) <sub>2</sub> [Ru(dip) <sub>2</sub> ](LS) <sub>2</sub> (b)
US 5351268	1994	Modular luminescence-based measuring system using fast digital signal processing	Jensen, E. M., Sun, M. H., Vecht, D. L. y Malen, R. E.	Luxtron Corporation (EE.UU.)	Y <sub>2</sub> (Ga <sub>1-x</sub> Q <sup>2+</sup> ) <sub>2</sub> O <sub>3</sub> (x = 0.03-0.078)
US 5332316	1994	Fiber optic system for sensing temperature and other physical variables	Kleinerman, M. Y.	-----	Cristales dopados con V <sup>2+</sup> , Q <sup>2+</sup> o Mn <sup>2+</sup>
US 5273359	1993	Remote high temperature insulatorless heat-flux gauge	Noel, B. W.	United States Department of Energy (EE.UU.)	Eu: YVO <sub>4</sub> Dy: YVO <sub>4</sub>
US 5255980	1993	Black body TRD temperature sensor (a)	Thomas, D. C., Jensen, S. C., Qucci, G. R., Peterson, C. M., Tilstra, S. D. y Rychnowsky, S. J.	Rosemount Inc. (EE. UU.)	Q <sup>2+</sup> ; GSGG (c) Q <sup>2+</sup> ; GGG esmeralda
US 5140609	1992	TRD temperature sensor (a)	Jensen, S. C. y Stokowsky, S. E.	Rosemount Inc. (EE. UU.)	V <sub>2</sub> <sup>+</sup> ; KMgF <sub>5</sub> V <sub>2</sub> <sup>+</sup> ; NaCl
US 4895156	1990	Sensor system using fluorimetric decay measurements	Schulze, J. E.	-----	[Ru(dip) <sub>2</sub> ] <sup>2+</sup> (b)
US 4789992	1988	Optical temperature measurement techniques	Wickersheim, K. A., Sun, M. H., Heinemann, S. O.	Luxtron Corporation (EE.UU.)	Mn <sup>2+</sup> ; Mg <sub>24</sub> Ge <sub>10</sub> O <sub>40</sub> Mn <sup>2+</sup> ; Mg <sub>24</sub> Ge <sub>7</sub> 5CaF <sub>10</sub>
US 4759033	1988	Temperature measurement of hot mineral product by induced fluorescence	Ariessohn, P. C.	Weyerhaeuser Company (EE. UU.)	Pr: CaO

a) TRD: time-rate decay.

b) phen: 1,10-ferantrolina; LS: laurilsulfato; dip: 4,7-difenil-1,10-ferantrolina.

c) GSGG: granate de calcio, escandio y gadolinio; GGG: granate de calcio y gadolinio.

## 2.2. INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA EN LA LUMINISCENCIA DE LOS COMPLEJOS DE Ru(II).

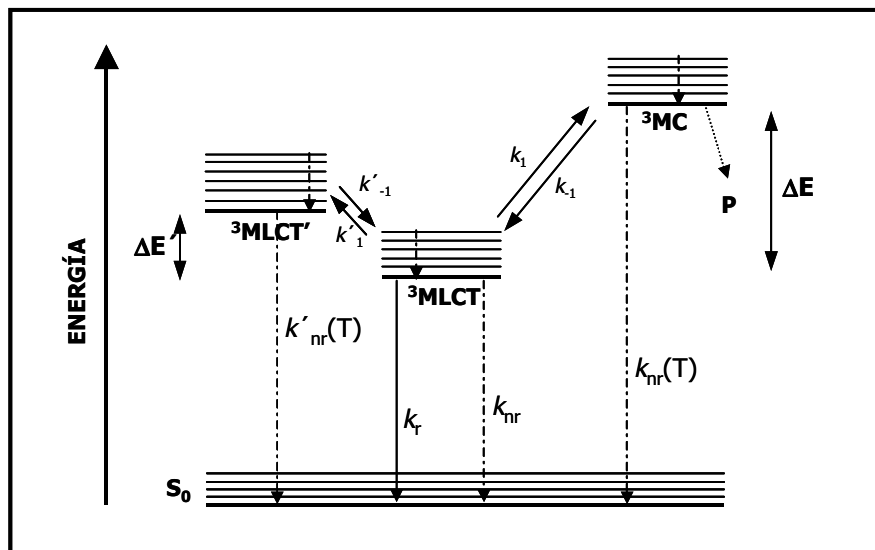
Las peculiares propiedades fotofísicas que exhiben los complejos de Ru(II) (ver apartado 3.3. y 3.4 de los *Antecedentes generales*) permiten desarrollar termómetros ópticos basados en la sensibilidad que presenta su luminiscencia hacia la temperatura. El empleo de este tipo de indicadores como sondas de temperatura posibilita la utilización de la tecnología previamente desarrollada por TGI para un optodo de oxígeno disuelto y, de esta forma, corregir simultáneamente la medida proporcionada por éste.

Cuando se excita un complejo de Ru(II), tras la correspondiente relajación vibracional, se alcanza un estado excitado singlete **<sup>1</sup>MLCT** (de transferencia de carga metal-ligando). Desde dicho estado, la molécula excitada sufre un eficaz *cruce intersistemas*, situándose (formalmente) en un estado excitado triplete **<sup>3</sup>MLCT**. En realidad no se trata de un único estado, sino que debido a la simetría del complejo coexisten en equilibrio térmico tres estados excitados <sup>3</sup>MLCT muy próximos en energía ( $\sim 60 \text{ cm}^{-1}$ ), por lo que lo denominaremos **<sup>3</sup>MLCT medio**.<sup>57</sup> El complejo puede desactivarse desde este estado por vía no radiativa ( $k_{nr}$ ) o con emisión de luz ( $k_r$ ), o bien acceder por activación térmica a dos estados: el <sup>3</sup>MC (centrado en el metal) o un **cuarto <sup>3</sup>MLCT** (<sup>3</sup>MLCT<sup>u</sup>), situado ligeramente por encima del <sup>3</sup>MLCT medio.<sup>58</sup> Desde el primero puede regresar al <sup>3</sup>MLCT medio o bien desactivarse con pérdida de ligando, dando lugar a un nuevo complejo, mientras que el cuarto <sup>3</sup>MLCT puede conducir de nuevo al <sup>3</sup>MLCT medio o bien desactivarse, generalmente sin emisión de luz (figura 19).

<sup>57</sup> Kober, E. M. y Meyer, T. J., *Inorg. Chem.*, **1984**, 23, 3877.

<sup>58</sup> Lumpkin, R. S., Kober, E. M., Worl, L. A., Murtaza, Z. y Meyer, T. J., *J. Phys. Chem.*, **1990**, 94, 239.





**Figura 19.** Diagrama simplificado de los estados energéticos de un complejo de Ru(II) con ligandos poliazaheterocíclicos quelatantes. Se muestran únicamente los estados excitados térmicamente activados y el estado excitado emisor.

Atendiendo a su dependencia con la temperatura, los complejos de Ru(II) pueden clasificarse en tres categorías:<sup>59</sup>

- **PRIMERA CATEGORÍA:** La diferencia de energía entre el  $^3\text{MLCT}$  medio y el  $^3\text{MC}$  es bastante grande, por lo que a temperatura ambiente no se produce activación térmica. Los tiempos de vida de emisión de los complejos de Ru(II) incluidos dentro de este grupo no dependen apreciablemente de la temperatura y su desactivación desde el  $^3\text{MLCT}$  está controlada por la  $k_{nr}$ , dada la proximidad (accesibilidad) del  $^3\text{MLCT}'$ .
- **SEGUNDA CATEGORÍA:** La fotofísica de estos compuestos es la más complicada, ya que presenta un carácter intermedio entre las otras dos. En este caso, los  $\tau$  están controlados por dos procesos térmicamente activados: el  $^3\text{MC}$  y el cuarto  $^3\text{MLCT}'$ .
- **TERCERA CATEGORÍA:** Se caracterizan por exhibir una alta eficiencia de producción de estados  $^3\text{MC}$  desde el  $^3\text{MLCT}$  medio, de manera que a temperatura ambiente la desactivación desde dicho estado térmicamente activado puede constituir hasta un 95% de la desactivación total. Como consecuencia de esto, los tiempos de vida de emisión que presentan dependen fuertemente de la temperatura.

<sup>59</sup> Lecomte, J. P., Kirsch-De Mesmaeker, A. y Orellana, G., *J. Phys. Chem.*, **1994**, 98, 5382.

Teniendo en cuenta esta clasificación, los complejos de Ru(II) seleccionados para construir los optodos de temperatura deberían pertenecer a esta última categoría ya que su sensibilidad hacia este parámetro físico es mayor. Sin embargo, hay que considerar también que desde el estado excitado  $^3MC$  el complejo puede desactivarse de manera irreversible con pérdida de ligando, por lo que conviene seleccionar complejos cuyo estado térmicamente excitado sea accesible pero sin que conduzca a la degradación del compuesto. La situación energética de los niveles electrónicos que determinan la posición del estado MC viene dada por la fortaleza del campo del cristal y, por tanto, la adecuada elección de los ligandos que quelatan el metal permite modificar la sensibilidad de los complejos a la temperatura.<sup>60</sup>

Matemáticamente, se puede aplicar un modelo para establecer la dependencia con la temperatura de las especies emisoras basado en la existencia de un único estado no radiativo accesible por activación térmica.<sup>61</sup> Según este modelo, la constante de desactivación observada para un luminóforo viene dada por:

$$k_{\text{obs}} = k_0 + k_t(T) \quad (13)$$

donde  $k_0$  engloba a las constantes de desactivación no dependientes de la temperatura, que involucran procesos tanto radiativos como sin emisión de luz (ecuación 14), mientras que  $k_t(T)$  es la constante de desactivación no radiativa por promoción térmica desde el estado excitado emisor, la cual sigue una cinética de desactivación de tipo *Arrhenius*, dependiente de la temperatura (ecuación 15):

$$k_0 = k_r + k_{\text{nr}} = A \quad (14)$$

$$k_t(T) = B \exp(-\Delta E/kT) \quad (15)$$

siendo  $A$  el término independiente de la temperatura,  $k$  la constante de *Boltzman* ( $1.38 \times 10^{-23}$  J/K),  $B$  el factor preexponencial de la ecuación de *Arrhenius* y  $\Delta E$  la diferencia de energía entre el  $^3MLCT$  y el estado alcanzado por promoción

<sup>60</sup> Demas, J. N. y DeGraff, B. A., *Anal. Chem.*, **1991**, 63, 829A.

<sup>61</sup> Demas, J. N. y DeGraff, B. A., *Proc. SPIE*, **1992**, 1796, 71.

térmica.\* Por lo tanto, la dependencia del tiempo de vida de extinción de la luminiscencia con la temperatura se puede expresar matemáticamente con la ecuación 16:<sup>29</sup>

$$\tau_{obs} = \frac{1}{k_{obs}} = \frac{1}{A + B \exp(-\Delta E / kT)} \quad (16)$$

Los parámetros  $A$ ,  $B$  y  $\Delta E$  de esta ecuación se obtienen a partir del ajuste a la misma de los  $\tau$  obtenidos experimentalmente a distintas temperaturas. Sin embargo, la gran dependencia mutua existente entre los dos últimos parámetros hace que sea más exacto extraer del ajuste el valor de  $k_t$  para una temperatura dada, en lugar de los dos términos independientes.<sup>62</sup>

La **sensibilidad** de un indicador luminiscente a la temperatura ( $S$ ) se define como la variación que experimenta el tiempo de vida de emisión por cada grado Kelvin de temperatura (en %). Matemáticamente, puede expresarse en función de los parámetros  $A$ ,  $B$  y  $\Delta E$ :<sup>61</sup>

$$S(T) = -\frac{d\tau_{obs}/dT}{\tau_{obs}} \times 100 = \frac{Q(\Delta E / kT^2) \exp(-\Delta E/kT)}{1 + Q \exp(-\Delta E/kT)} \times 100 \quad (17)$$

donde  $Q = B/A$ .

Atendiendo a esta ecuación, *la sensibilidad del luminóforo dependerá de la diferencia de energía entre el estado <sup>3</sup>MLCT y de la relación entre los parámetros  $A$  y  $B$* . Para una temperatura dada,  $S$  aumenta a medida que lo hace  $\Delta E$ , hasta un valor máximo a partir del cual la diferencia de energía es tan elevada que no es posible alcanzar el estado <sup>3</sup>MC por activación térmica, disminuyendo drásticamente la sensibilidad a la temperatura. El valor de  $Q$ , sin embargo, debe ser lo más alto posible si se pretende conseguir una gran sensibilidad. A pesar de que los complejos de mayor tiempo de vida de emisión presentan valores superiores de  $Q$ , a la hora de seleccionar uno de ellos para construir un

\* Siempre que exista equilibrio termodinámico entre los estados <sup>3</sup>MLCT medio y <sup>3</sup>MC; en caso contrario,  $\Delta E$  representa la energía de activación del proceso de promoción.

<sup>62</sup> Lecomte, J. P. y Kirsch-De Mesmaeker, A., *J. Chem. Soc. Faraday Trans.*, **1992**, *88*, 2471.

termómetro óptico hay que considerar también que los indicadores con  $\tau$  largos son más susceptibles de desactivación por oxígeno molecular.

En la bibliografía, aparecen descritos dos complejos de Ru(II) como indicadores luminiscentes en la construcción de **optodos de temperatura**: el **tris(2,2'-bipiridina)rutenio(II)**,<sup>63</sup> abreviadamente  $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$  y el **tris(1,10-fenantrolina)rutenio(II)**,<sup>64</sup>  $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$ , inmovilizados sobre matrices sol-gel y poli(acrilonitrilo), respectivamente. Basándose en este último, Klimant y Holst han patentado un equipo para la medida de temperatura en la que el indicador se encuentra inmovilizado en una matriz plástica (PVC). El equipo mide asimismo la concentración de oxígeno disuelto en una muestra, corrigiendo simultáneamente el valor medido por el efecto de la temperatura. En una patente anterior utilizan un complejo de Ru(II) similar ( $[\text{Ru}(\text{dip})_3]^{2+}$ , donde *dip* significa 4,7-difenil-1,10-fenantrolina) para la medida simultánea de oxígeno y temperatura (tabla 6). No obstante, cualquiera de los complejos mencionados dista mucho de ser el indicador óptimo, ya que la desactivación de su estado excitado  $^3\text{MLCT}$  por promoción térmica sólo supone el 25%, como máximo, de la desactivación total del mismo.<sup>59</sup>

---

<sup>63</sup> Podbielska, H., Andrzejewski, D., Maruszewski, K. y Str&eacute;k, W., *A novel optical fibre sensor for temperature measurements, IV European Conference on Optical Chemical Sensors and Biosensors (Europt(r)ode IV)*, libro de resúmenes, Münster (Alemania), **1998**.

<sup>64</sup> Liebsch, G., Klimant, I. y Wolfbeis, O. S., *Adv. Materials*, **1999**, 11, 1296.

### **3. PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS.**

Teniendo en cuenta la dependencia de la luminiscencia de los complejos de Ru(II) con la temperatura, descrita con detalle en el apartado anterior de esta Memoria, se hace necesario llevar a cabo una corrección adecuada de los optodos cuya fase sensible esté constituida por estos indicadores. Por otro lado, la solubilidad del oxígeno en agua es también, entre otros factores, función de la temperatura, por lo que la medida de este parámetro físico es esencial para monitorizar oxígeno disuelto, uno de los sensores incluido en el Proyecto del que forma parte esta Tesis Doctoral.

Aunque la medida de la temperatura está resuelta hoy en día por métodos eléctricos, la instrumentación optoelectrónica que ha desarrollado T.G.I. para la medida de parámetros medioambientales permite utilizar un optosensor de temperatura compatible con el conjunto de sensores que se han desarrollado en paralelo en este Proyecto, evitando así los posibles problemas derivados de interferencias electromagnéticas y favoreciendo su uso en aquellos casos en los que se quiera excluir rigurosamente la corriente eléctrica del extremo sensible.

Para fabricar un sensor óptico de temperatura basado en un complejo luminiscente de Ru(II), se debe seleccionar el luminóforo de forma que su sensibilidad hacia este parámetro sea elevada en el intervalo de interés para medidas medioambientales, sin que ello conlleve pérdida de ligando desde el estado térmicamente activado ( $^3MC$ ), es decir, fotodegradación del indicador.

Asimismo, los sensores de fibra óptica desarrollados para realizar medidas en aguas con el equipo optoelectrónico de T.G.I., deben idealmente contener indicadores de Ru(II) que exhiban tiempos de vida de emisión superiores a 1  $\mu s$ , con objeto de simplificar la electrónica del equipo y aumentar su sensibilidad. Sin embargo, hay que considerar que la desactivación de la luminiscencia por oxígeno molecular es mayor en tales complejos, por lo que conviene evitar esta interferencia eligiendo un soporte o terminal sensible impermeable a este desactivador.

En resumen, los objetivos planteados para el desarrollo de un optodo de temperatura con un complejo luminiscente de Ru(II) son los siguientes:

- Elección de un indicador cuya **sensibilidad** a la temperatura sea máxima en el intervalo de medida objetivo en aguas naturales (0-40 °C).
- Comprobación de que el indicador seleccionado no sufre degradación térmica ni fotoquímica que le inhabilite para una utilización prolongada.
- Verificación de que los **tiempos de vida** de emisión ( $\tau$ ) exhibidos por el complejo en todo el intervalo de temperatura objetivo sean compatibles con el equipo optoelectrónico utilizado para interrogar al terminal sensible. La bondad del optodo no sólo es función de su sensibilidad hacia el analito, sino de la relación señal/ruido proporcionada por el instrumento. Dicha señal (desfase de la luminiscencia con respecto a la excitación) será tanto mayor cuanto más altos sean dichos  $\tau$ .
- Seleccionar como soporte del luminóforo una matriz polimérica que impida o dificulte el acceso hasta el indicador del **oxígeno molecular** presente en el medio y, al mismo tiempo, posea una elevada **conductividad térmica**, disminuyendo así el tiempo de respuesta del sensor.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

El desarrollo de un sensor óptico conlleva un conjunto de etapas que engloban desde el diseño del indicador que va a constituir la fase sensora hasta la caracterización analítica del optodo fabricado. En el caso del sensor que nos ocupa, se prescindió de las etapas iniciales de diseño y síntesis de complejos de Ru(II) apropiados ya que, como se describió en los *Antecedentes* de este optodo, todos ellos exhiben una mayor o menor dependencia de su luminiscencia con la temperatura. Por tanto, se procedió a examinar la sensibilidad hacia este parámetro físico de diversos complejos de Ru(II) sintetizados con anterioridad en el Laboratorio de Fotoquímica Aplicada del Prof. G. Orellana en la UCM, con el fin de **seleccionar el indicador más adecuado** para desarrollar el optodo de temperatura.

### 4.1. SELECCIÓN DEL INDICADOR.

En ausencia de solutos desactivadores en la disolución, el tiempo de vida de emisión de los complejos luminiscentes de Ru(II) depende de la eficacia del proceso de desactivación radiativo con respecto a los procesos no emisivos que compiten con él. Como se describió anteriormente (apartado 2.2. de este optodo) desde el <sup>3</sup>MLCT emisor el luminóforo puede acceder a dos estados térmicamente activados desde los que se desactiva sin emisión de luz: el <sup>3</sup>MC y el **cuarto** <sup>3</sup>MLCT (o 3MLCT'). La constante de desactivación no radiativa por promoción térmica engloba ambos procesos y sigue una cinética de tipo Arrhenius, de forma que la dependencia del tiempo de vida de emisión con la temperatura puede expresarse matemáticamente con la ecuación 18,<sup>65,66,67</sup> reducida a una única exponencial cuando el proceso transcurre mayoritariamente a través de una de las dos vías (ecuación 16, *Antecedentes optodo de temperatura*):

$$\tau = 1 / k_{obs} = A + B_1 \exp(-\Delta E_1 / kT) + B_2 \exp(-\Delta E_2 / kT) \quad (18)$$

<sup>65</sup> Allsopp S.R., Cox, A., Kemp, T. J. y Reed, W. J., *J. Chem. Soc. Faraday Trans.*, **1978**, *1*, 1275.

<sup>66</sup> Maruszewski, K., Strommen, D. P. y Kincaid, J. R., *J. Am. Chem. Soc.*, **1993**, *115*, 8345.

<sup>67</sup> Sykora, M. y Kincaid, J. R., *Inorg. Chem.*, **1995**, *34*, 5852.

siendo  $A$  el término independiente de la temperatura,  $B$  el factor preexponencial de la ecuación de Arrhenius y  $\Delta E$  la diferencia de energía entre el  $^3\text{MLCT}$  y el estado excitado térmicamente activado.

Hemos descrito que la promoción térmica del electrón excitado desde el  $^3\text{MLCT}$  hasta el  $^3\text{MC}$  conlleva una pérdida de emisión, que es función de la eficacia del cruce hasta este estado excitado centrado en el metal. De esto se deduce que aquellos compuestos en los que el  $^3\text{MC}$  sea más accesible serán más sensibles a la temperatura y, por tanto, susceptibles de ser seleccionados para construir el sensor óptico objetivo. Sin embargo, cuando se puebla el estado  $^3\text{MC}$  (de naturaleza  $\sigma^*$ ) se produce una elongación de los enlaces Ru-N, lo que conduce en ocasiones a la pérdida de un ligando (complejos *fotolábiles*). Este fenómeno es particularmente importante cuando los ligandos son poco  $\sigma$  dadores (poco básicos)<sup>68</sup> y está inhibido en matrices rígidas, en las que la distorsión del enlace Ru-N está impedida, ya que el  $^3\text{MC}$  se desestabiliza distanciándose del  $^3\text{MLCT}$  y aumentando, en consecuencia, la fotoestabilidad de la sonda.<sup>58,66,67</sup>

La disposición energética de los niveles electrónicos implicados en los procesos de promoción térmica varía en función de la naturaleza de los ligandos quelatantes (sección 2.2.). Así, la situación energética del  $^3\text{MC}$  depende de la fortaleza del campo del ligando, la cual aumenta con la basicidad de éste. El carácter básico ( **$\sigma$  dador**) de los nitrógenos heterocíclicos que complejan al Ru(II) disminuye con la presencia de sustituyentes electroattractores (particularmente en posiciones *orto* o *para* con respecto al N) así como con el aumento de la aromaticidad del anillo, ya que en ambos casos disminuye la densidad de carga sobre los nitrógenos quelatantes. Por el contrario, los sustituyentes electrodonadores transfieren densidad electrónica al átomo de nitrógeno y, por tanto, aumentan su basicidad. El carácter  **$\pi$  aceptor** de un ligando, por otra parte, aumenta a medida que lo hace la deficiencia de electrones del ligando, acercando el  $^3\text{MLCT}$  emisor al estado fundamental (estabilización por **retrocesión  $\pi$**  del metal al ligando). Modificaciones sintéticas de los ligandos quelatantes pueden, por tanto, repercutir en un alejamiento del  $^3\text{MC}$ , dificultando la accesibilidad al mismo por promoción térmica y, en consecuencia, aumentando la fotoestabilidad del complejo de Ru(II).

---

<sup>68</sup> Allen, G. H., White, R. P., Rillema, D. P. y Meyer, T. J., *J. Am. Chem. Soc.*, **1984**, *106*, 2613.





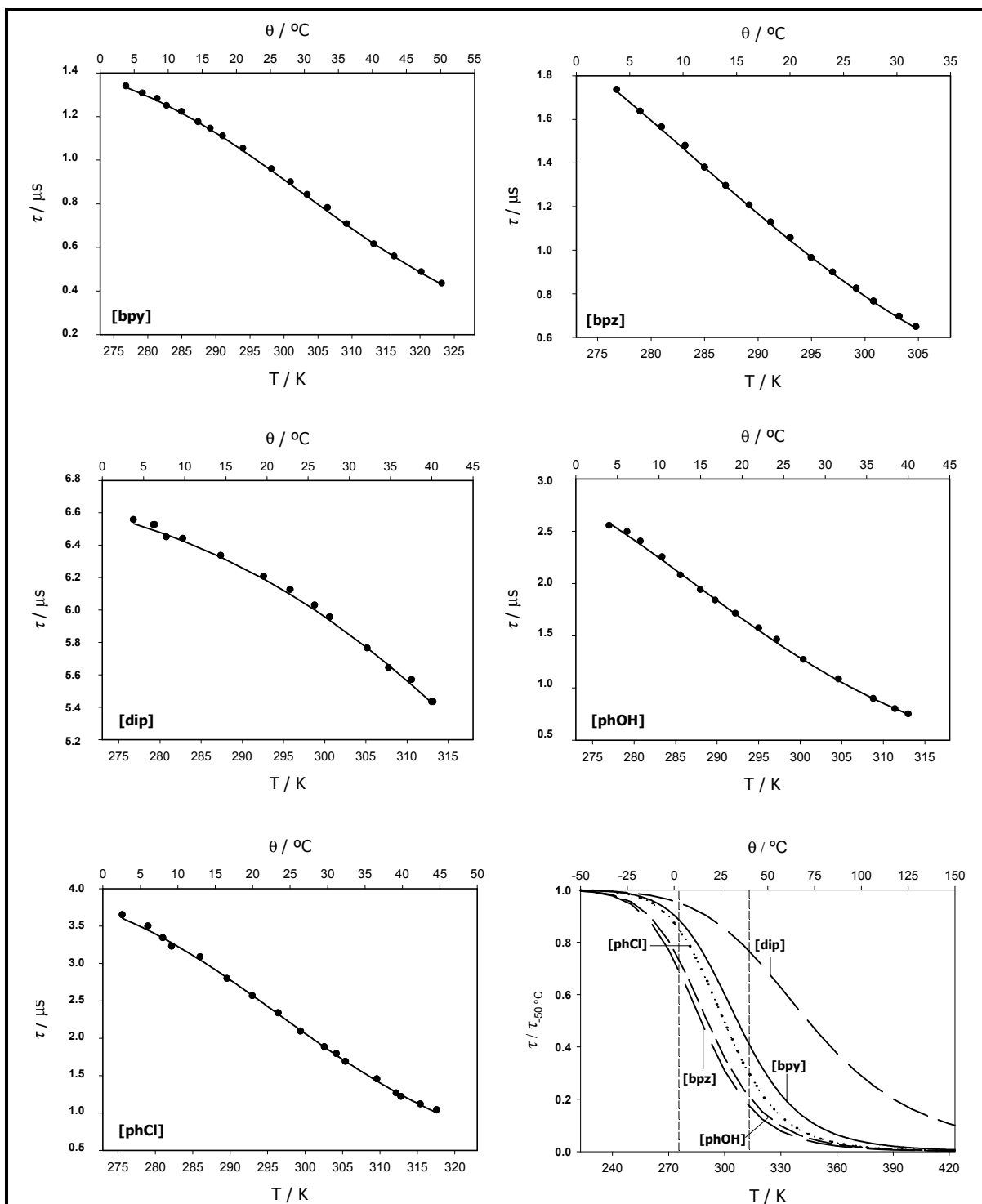
en el apartado 5.4.1. de la *Parte experimental* correspondiente a este optodo. El carbonato de propileno, empleado con anterioridad en estudios similares realizados con otros complejos de Ru(II) descritos en la bibliografía,<sup>58,67,68,69</sup> no posee en su molécula el oscilador O-H, presente en otros disolventes y responsable de la parcial desactivación del compuesto. Asimismo, su elevado punto de ebullición (240 °C) permite ampliar el intervalo de temperaturas estudiado, mientras que su apreciable polaridad le convierte en un buen disolvente de las sales de los complejos de coordinación de Ru(II) y aniones muy polarizables (PF<sub>6</sub><sup>-</sup>, ClO<sub>4</sub><sup>-</sup>, BF<sub>4</sub><sup>-</sup>).

El perfil cinético de la extinción de la luminiscencia de los complejos estudiados a diferentes temperaturas se ajusta en su mayoría a funciones estrictamente **monoexponenciales en disolución**, lo que indica que la desactivación desde el estado excitado al que la molécula accede por promoción térmica (<sup>3</sup>MC o <sup>3</sup>MLCT) es mucho más rápida que el retorno al <sup>3</sup>MLCT, ya que si la constante cinética de ambos procesos fuera del mismo orden se observarían dos tiempos de vida de emisión.<sup>59,70</sup> Únicamente en el complejo homoléptico con tres ligandos *bipirazina* se obtuvieron ajustes biexponenciales para temperaturas superiores a 35 °C, no recuperando el ajuste monoexponencial al enfriar la disolución. Esto se debe, probablemente, a que el indicador se degrada en carbonato de propileno tras poblar el estado excitado <sup>3</sup>MC. La fotolabilidad de este complejo, descrita en la bibliografía por distintos autores, es atribuible al débil carácter  $\sigma$ -dador del ligando bpz.<sup>67,68</sup>

En la figura 21 se muestran los  $\tau$  obtenidos experimentalmente en el intervalo de temperaturas ensayado (277-313 K), junto con las sigmoides resultantes del ajuste de estos datos a la ecuación 16, descrita en la sección *Antecedentes* de este optodo. Para obtener la curva característica del indicador denominado [bpz] únicamente se tuvieron en cuenta los tiempos de vida de desexcitación obtenidos en cinéticas monoexponenciales (temperaturas inferiores a los 35 °C).

<sup>69</sup> Clark, C. D., Hoffman, M. Z., Rillema, D. P. y Mulazzani, Q. G., *J. Photochem. Photobiol.*, **1997**, 110, 285.

<sup>70</sup> Demas, J. N., *Excited State Lifetime Measurements*, Academic Press, Londres (Reino Unido), **1983**; pp. 59-62.



**Figura 21.** Tiempos de vida de emisión, obtenidos mediante la técnica TC-SPC, a distintas temperaturas exhibidos por los complejos de Ru(II) seleccionados, en disoluciones en carbonato de propileno\* desoxigenadas (típicamente en concentración 10  $\mu\text{M}$ ). La línea continua representa la curva obtenida a partir del ajuste ( $0.9993 \leq r \leq 0.9998$ ) de los puntos experimentales a la ecuación  $\tau = [A + B \exp(-\Delta E/kT)]^{-1}$  (ec. 16). El hábito que presentan las curvas de ajuste para un intervalo de temperaturas más amplio se recoge en la gráfica inferior derecha. (Las líneas discontinuas verticales indican el intervalo experimental de temperaturas).

\* Carbonato de propileno/HCl cc. (10:1, v/v) para el complejo denominado [phOH].

A partir estos ajustes se pueden extraer los coeficientes  $A$ ,  $B$  y  $\Delta E$  (ec. 16) característicos de cada complejo, así como algunos parámetros derivados de éstos (tabla 7). Como se indicó anteriormente (apartado 2.2.), a pesar de la bondad de los ajustes, la gran interdependencia existente entre los parámetros  $B$  y  $\Delta E$  impide que éstos sean evaluados individualmente, por lo que debe considerarse únicamente su orden de magnitud.<sup>62</sup> Esta dependencia queda patente en la figura 22, donde se han representado distintas parejas  $B$ ,  $\Delta E$  junto con el coeficiente de correlación ( $r$ ) obtenido al ajustar los puntos experimentales correspondientes al indicador [phCl] a la ecuación 16 con dichos valores. La fiabilidad de estos parámetros aumenta a medida que lo hace el intervalo de temperaturas estudiado y el número de datos empleados en el ajuste ya que, cuanto más definida esté la sigmoide, menor será la imprecisión surgida de dicha dependencia.

**Tabla 7.** Parámetros  $A$ ,  $B$ , y  $\Delta E$  característicos de cada uno de los complejos de Ru(II) estudiados (figura 20) en disoluciones de carbonato de propileno desoxigenadas, obtenidos a partir del ajuste de los datos experimentales  $\tau = f(T)$  a la ecuación 16 (figura 21). Asimismo se recogen otros parámetros fotofísicos derivados de éstos (ver texto).

	[bpy]	[bpz]	[dip]	[phOH] <sup>a</sup>	[phCl]
$A \times 10^{-3} / s^{-1}$ <sup>b</sup>	656 ± 8	388 ± 10	146 ± 1	276 ± 10	236 ± 4
$B \times 10^{-11} / s^{-1}$	481 ± 219	753 ± 344	0.2 ± 0.1	347 ± 228	1500 ± 937
$\Delta E / cm^{-1}$ <sup>c</sup>	3858 ± 100	3808 ± 96	2829 ± 162	3764 ± 141	4215 ± 134
$r$	0.9996	0.9998	0.9993	0.9995	0.9995
$\tau$ (289 K) / ns	0.96 ± 0.02	0.87 ± 0.02	6.03 ± 0.12	1.40 ± 0.03	2.22 ± 0.04
$k_t$ (298 K) × 10 <sup>-5</sup> / s <sup>-1</sup> <sup>d</sup>	3.9	7.8	0.2	4.4	2.2
$\eta_t$ (298 K) <sup>e</sup>	0.37	0.67	0.14	0.62	0.48
$S$ (%) <sup>f</sup>	2.3	4.1	2.1	3.8	3.3

a) carbonato de propileno/HCl cc. (10:1, v/v).

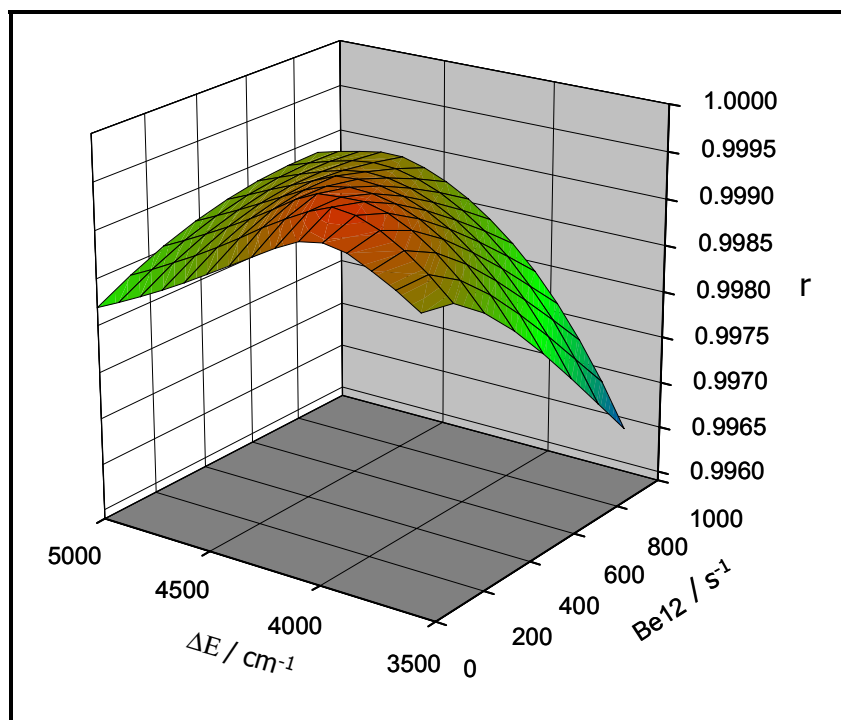
b)  $A = k_r + k_{nr} \neq f(T)$ .

c) Diferencia de energía entre los estados <sup>3</sup>MLCT y <sup>3</sup>MLCT' o <sup>3</sup>MC (o energía de activación del proceso de promoción térmicamente activada).

d)  $k_t = B \exp(-C/kT)$ .

e)  $\eta_t = k_t \times \tau = k_t / (k_r + k_{nr} + k_t)$ , eficiencia del proceso de promoción térmica.

f)  $S = \frac{Q \times \Delta E / T^2 \times e^{-\Delta E / kT}}{1 + Q e^{-\Delta E / kT}} \times 100$  ( $Q = B / A$ ).



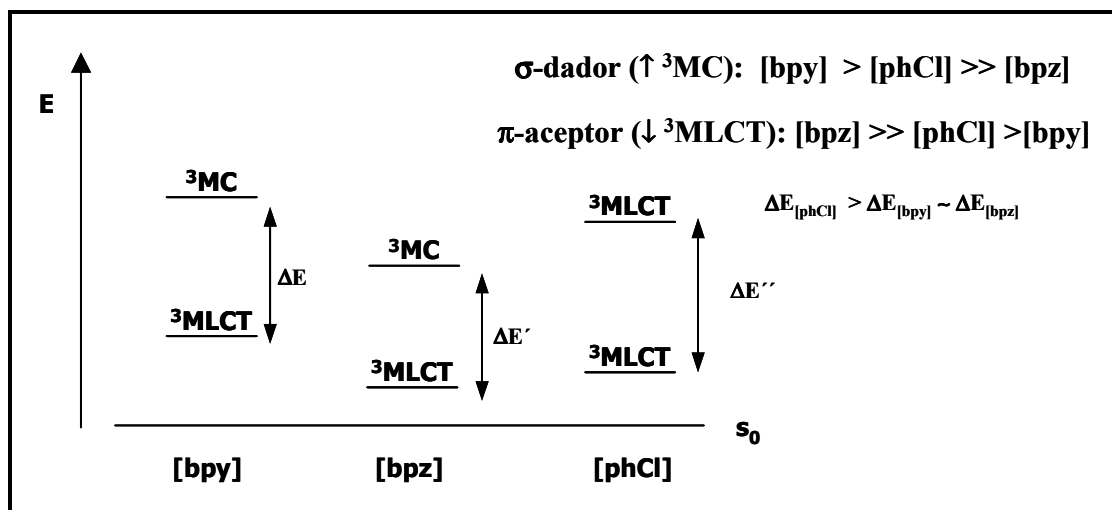
**Figura 22.** Factor preexponencial ( $B$ ), diferencia de energía entre el  $^3\text{MLCT}$  y el  $^3\text{MC}$  de promoción térmica ( $\Delta E$ ) y coeficiente de correlación ( $r$ ) correspondientes a distintos ajustes realizados con los datos experimentales obtenidos para el complejo  $[\text{pHCl}]$  en carbonato de propileno.

Los parámetros  $B$  y  $\Delta E$  de la sigmoide a la que se ajustan los datos experimentales son, no obstante, indicativos del *tipo de promoción térmica* que tiene lugar en cada complejo (apartado 2.2.). Así cuando la diferencia de energía entre el estado excitado emisor y el de promoción térmica es superior a  $3000 \text{ cm}^{-1}$  ( $B > 10^{12}$ ) el proceso de desactivación transcurre vía  $^3\text{MC}$ , ya que el cuarto  $^3\text{MLCT}$  se encuentra más próximo en energía ( $< 800 \text{ cm}^{-1}$ ,  $B < 10^8$ ).<sup>71</sup> Teniendo en cuenta estos datos, los valores de  $B$  y  $\Delta E$  obtenidos para las sondas estudiadas indican que en la mayoría de los casos **un aumento de la temperatura conduce al estado excitado centrado en el metal**, a excepción del complejo **[dip]**. El elevado tiempo de vida de emisión, junto con la baja eficacia del proceso de promoción térmicamente inducida ( $\eta_t$ ) que exhibe esta sonda indican que, probablemente, el mismo transcurre a través de ambas vías. La extensa estructura aromática de los ligandos que quelatan al Ru en este complejo aumenta el carácter  $\pi$  aceptor de sus nitrógenos heterocíclicos, disminuyendo la energía del  $^3\text{MLCT}$  emisor y, con

<sup>71</sup> Rillema, D. P., Blanton, C. B., Shaver, R. J., Jackman, D. C., Boldaji, M., Bundy, S., Worl, L. A. y Meyer, T. J., *Inorg. Chem.*, **1992**, 31, 1600.

ello, la accesibilidad al  $^3\text{MC}$ . Algunos autores proponen para los complejos pertenecientes a la denominada "*segunda categoría*" (apartado 2.2.), en los que la activación térmica tiene lugar a través de las dos vías, el ajuste de los datos a una ecuación con dos términos exponenciales (ec. 18), lo que explicaría los valores intermedios de los parámetros  $B$  y  $\Delta E$  obtenidos de los ajustes a una única exponencial con este indicador, con respecto a los valores experimentales encontrados en los complejos de Ru(II) en los que la desactivación térmica se atribuye únicamente a uno de los dos estados excitados.

La constante de promoción térmica ( $k_t$ ), particularmente elevada para el indicador **[bpz]**, junto con la elevada eficiencia que muestra dicho proceso frente al resto de vías de desactivación que compiten con él en esta sonda ( $\eta_t$ ), confirman la fotodegradación termoinducida de este indicador a temperaturas superiores a 35 °C en carbonato de propileno, dando lugar a cinéticas de desactivación de su luminiscencia biexponenciales, por lo que fue descartado para constituir la fase sensible del optodo de temperatura. En la tabla 7 se observa que la distancia desde el  $^3\text{MLCT}$  emisor hasta el  $^3\text{MC}$  (parámetro  $\Delta E$ ) es similar en los complejos **[bpz]** y **[bpy]**, datos muy parecidos a los reflejados en la bibliografía para estos dos compuestos en carbonato de propileno (**[bpy]**:  $3275 \pm 75 \text{ cm}^{-1}$ ; **[bpz]**:  $3325 \pm 60 \text{ cm}^{-1}$ , según Allen et al. y **[bpz]**:  $3902 \pm 25$  según Sykora et al).<sup>67,68</sup> La biperidina es un ligando de campo más fuerte que la biperazina y, en consecuencia, la energía del  $^3\text{MC}$  en el triscomplejo homoléptico **[bpy]** es superior al del **[bpz]**. Sin embargo, el mayor carácter  $\pi$  aceptor del segundo hace que se estabilice su  $^3\text{MLCT}$  por retrocesión  $\pi$  desde el metal, lo que se traduce en una distancia  $^3\text{MLCT}$ - $^3\text{MC}$  parecida en ambos indicadores (figura 23). A pesar de ello, la eficacia de promoción térmica al  $^3\text{MC}$  es superior en el **[bpz]** y esto hace que disminuya su fotoestabilidad al aumentar la temperatura.



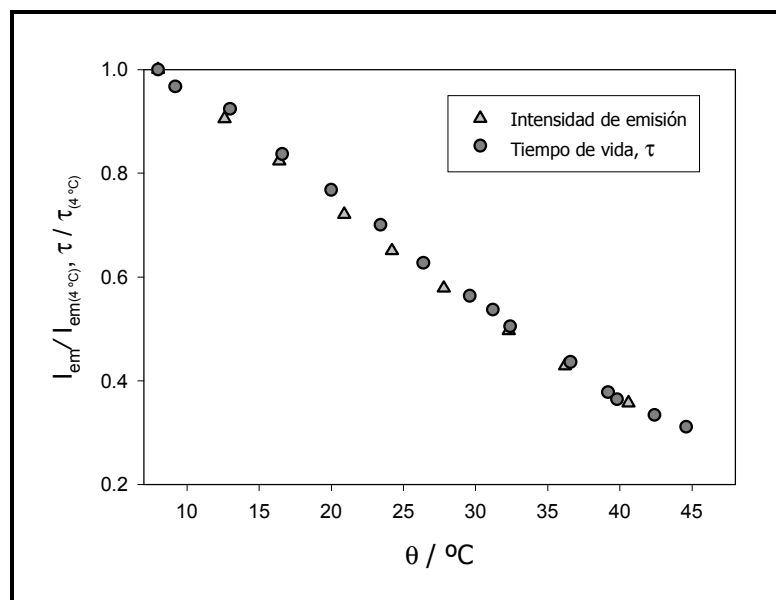
**Figura 23.** Diagrama simplificado de los estados energéticos  $^3\text{MLCT}$  y  $^3\text{MC}$ , implicados en los procesos de activación térmica, de los complejos homolépticos  $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$  y  $[\text{Ru}(\text{bpz})_3]^{2+}$  y del complejo heteroléptico  $[\text{Ru}(\text{phen})_2(4\text{-Clphen})]^{2+}$ .

Por otra parte, el estudio realizado con el complejo de Ru(II) **[phOH]** tuvo que llevarse a cabo controlando el pH del medio, ya que este indicador presenta un tiempo de vida de emisión elevado y fuertemente dependiente de la temperatura sólo a valores de pH ácido, desactivándose su luminiscencia por desprotonación del grupo hidroxilo.<sup>72</sup> La necesidad del control del pH en esta sonda, unido al elevado valor de  $\eta_t$  obtenido (tabla 7), que aumenta su inestabilidad térmica, excluyeron asimismo el uso de este indicador como sonda de temperatura.

La sensibilidad a la temperatura ( $S$ , tabla 7) representa la variación que experimenta el tiempo de vida de emisión de los complejos de Ru(II) por cada grado Kelvin (expresado en %). Este parámetro depende básicamente de la diferencia de energía ( $\Delta E$ ) existente entre el estado excitado emisor y el accesible por promoción térmica. Para un indicador dado,  $S$  aumenta a medida que lo hace  $\Delta E$ , hasta alcanzar un valor a partir del cual el estado excitado  $^3\text{MC}$  resulta inaccesible a partir del  $^3\text{MLCT}$ , disminuyendo entonces drásticamente.<sup>61</sup> El indicador con un **ligando sustituido por cloro en posición 4**, muestra un elevado valor de  $\Delta E$  (y, por tanto, de  $S$ ), debido al efecto inductivo  $-I$  que introduce el sustituyente Cl en el anillo aromático, el cual aumenta el carácter  $\pi$  aceptor de la *fenantrolina* lo que conduce a una estabilización de sus orbitales  $\pi^*$  y, con ello, a una disminución de la energía del  $^3\text{MLCT}$ . Por otro lado, la fuerza del campo del

<sup>72</sup> García-Fresnadillo, D., Tesis Doctoral, Universidad Complutense de Madrid, 1996.

ligando en este complejo, responsable de la energía del  $^3\text{MC}$ , es el promedio entre los tres ligandos que quelatan el metal y, aunque el carácter electroatractor del cloro disminuye la fuerza del ligando 4-Clphen, los otros dos ligandos phen son de campo suficientemente fuerte como para desestabilizar el  $^3\text{MC}$  (figura 23). Este efecto no se produciría en el correspondiente complejo homoléptico  $[\text{Ru}(4\text{-Clphen})_3]^{2+}$ , donde se estabilizarían tanto el  $^3\text{MLCT}$  como el  $^3\text{MC}$ . La relativa dificultad que encuentra el indicador [phCl] para promocionar sus electrones hasta este estado excitado da lugar a una importante dependencia de su luminiscencia con la temperatura, así como a un elevado tiempo de vida de emisión y una mayor estabilidad térmica, por lo que fue finalmente seleccionado para desarrollar este sensor.



**Figura 24.** Gráfica comparativa de la variación que experimenta la emisión del complejo [phCl] con los cambios de temperatura, expresada en función del tiempo de vida de emisión e intensidad de luminiscencia (disoluciones desoxigenadas en carbonato de propileno).

En la figura 24 se compara la variación que experimenta la **intensidad de luz emitida** por el complejo [phCl], a distintas temperaturas en carbonato de propileno, con el resultado obtenido en tiempo de vida de emisión. Si desde el estado excitado centrado en el metal ( $^3\text{MC}$ ) el indicador se desactivara con pérdida de ligando o formación de otro subproducto no emisor, la pérdida de intensidad de luz observada al aumentar la temperatura sería superior a la registrada en



tiempos de vida, ya que éstos no dependen de la cantidad de luminóforo presente en el medio y, por tanto, no se ven influidos por la degradación de la sonda. La relación de intensidades coincide con la de los tiempos de desexcitación en el intervalo de temperaturas estudiado, lo que confirma la estabilidad térmica del complejo de Ru(II) seleccionado.

## 4.2. CARACTERIZACIÓN FOTOQUÍMICA DEL INDICADOR ÓPTICO EN MEDIO HOMOGÉNEO.

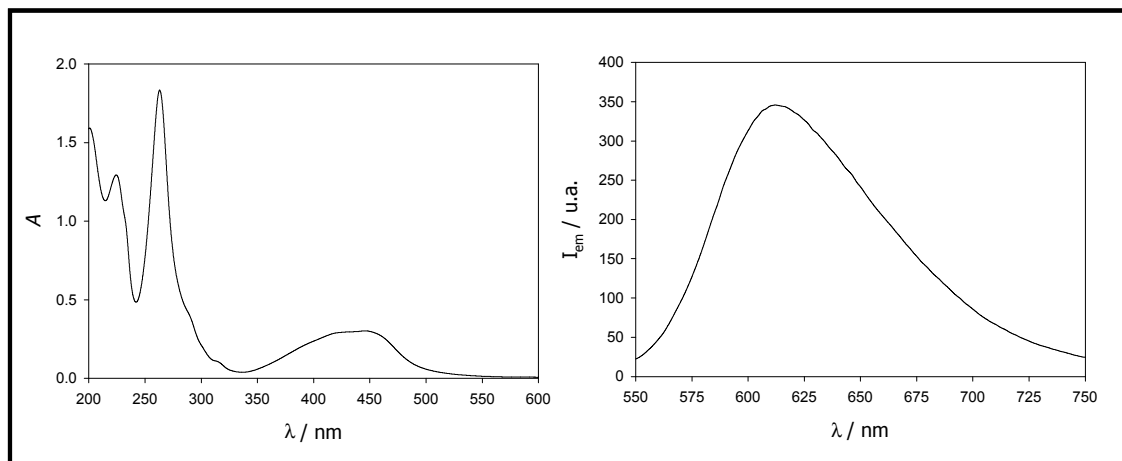
La evaluación del indicador como sonda de temperatura exige un paso previo de caracterización en disolución con objeto de obtener los distintos parámetros fotofísicos necesarios para el óptimo desarrollo del sensor. Dado que el complejo de Ru(II) seleccionado, [phCl], ha sido caracterizado en disolución acuosa con anterioridad,<sup>73</sup> se procedió al registro de los correspondientes espectros de absorción y emisión en varios disolventes orgánicos como modelos del medio que puede rodear al indicador inmovilizado en un soporte polimérico, imprescindible para la fabricación del terminal sensible. Se eligieron así el *acetónitrilo* y *butironitrilo* por su similitud con polímeros de tipo cianoacrilato que podrían utilizarse para embeber el indicador en el optodo de temperatura (ver apartado 4.3. de esta *Discusión de resultados*) y por ser buenos disolventes de sales. Además, esto nos permitirá más adelante comparar las propiedades fotofísicas del indicador inmovilizado frente a las que exhibe el compuesto en disolución.

En la figura 25 se muestra el **espectro de absorción** UV-VIS del indicador [phCl] en acetónitrilo. La posición de los máximos observables en dicho espectro coinciden en los disolventes examinados (tabla 8). Dichos máximos corresponden a las transiciones electrónicas intraligando (IL,  $\pi \rightarrow \pi^*$ , 262 y 224 nm) y de transferencia de carga metal-ligando (MLCT,  $d \rightarrow \pi^*$ , 425 y 445 nm) siendo estas últimas, que aparecen en la región visible del espectro electromagnético, las responsables del color anaranjado que presenta el complejo. Se observan, asimismo, dos hombros a 285 y 320 nm correspondientes a tránsitos electrónicos

---

<sup>73</sup> Gutiérrez-Alonso, M. C., Tesis Doctoral, Universidad Complutense de Madrid, 1996.

$n \rightarrow \pi^*$  (IL) y  $t_{2g} \rightarrow e_g$  (MC), prohibidos por la simetría y que dan lugar, por tanto, a bandas con bajos coeficientes de absorción molar.



**Figura 25.** Espectros de absorción UV-VIS (izq.) y emisión (dcha., sin corregir por la respuesta instrumental) del indicador hexafluorofosfato de [bis(1,10-fenantrolina)(4-cloro-1,10-fenantrolina)]rutenio(II) (27  $\mu\text{M}$ ) en disolución equilibrada al aire en acetonitrilo, a 25.0  $^{\circ}\text{C}$ .

Los **espectros de emisión** de los complejos luminiscentes de Ru(II) presentan a temperatura ambiente una sola banda ancha, sin estructura fina, entre 500 y 800 nm. En este caso, el indicador muestra un máximo de emisión situado entre 610 y 620 nm en función del disolvente (figura 25), dato proporcionado por el equipo de medida y que requeriría la correspondiente corrección por la respuesta instrumental para obtener el valor auténtico (aprox. 10-15 nm superior), lo que proporcionaría un **desplazamiento de Stokes** próximo a 190 nm. Ello se debe a que la luminiscencia se produce desde el estado excitado de menor energía, es decir, el  $^3\text{MLCT}$  (regla de Kasha), mientras que la absorción vertical  $d \rightarrow \pi^*$  conduce inicialmente a un estado  $^1\text{MLCT}$  (apartado 3.4.2. de la sección *Antecedentes Generales*). Esta gran separación de bandas de absorción/emisión posibilita la utilización de simples filtros coloreados para discernir la luz de excitación de la luminiscencia del indicador.

Tabla 8. Parámetros fotofísicos característicos del complejo [phCl] en distintos disolventes.

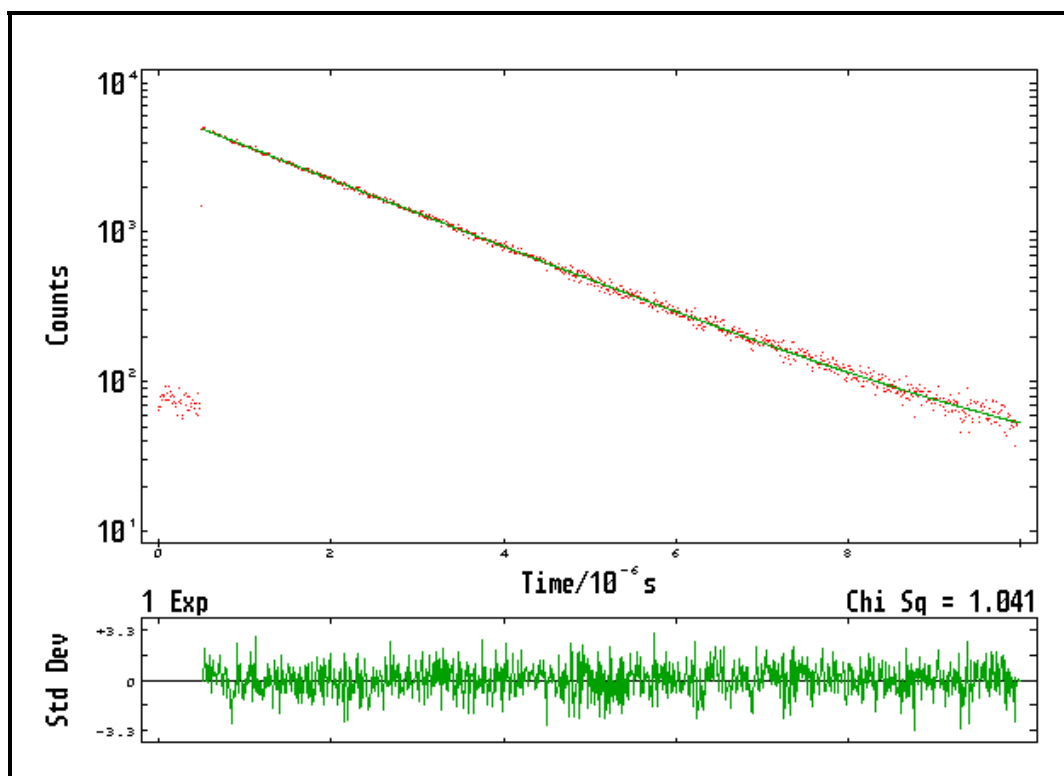
DISOLVENTE	$\lambda_{\text{máx}}^{\text{abs}} / \text{nm}$ ( $\epsilon^{\text{a}} / \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ )	$\lambda_{\text{máx}}^{\text{em}} / \text{nm}^{\text{b}}$	$\tau / \mu\text{s}^{\text{c}}$		$\Phi$
			Aire	Ar	
agua	224 (59500), 262 (83000), 425 (13900), 445 (14100)	610	0.82 <sup>a</sup>	1.49	0.08 <sup>a</sup>
carbonato de 1,2-propileno	224, 262, 425, 445	619	0.51	2.22	--- <sup>d</sup>
acetronitrilo		612	0.24	1.90	--- <sup>d</sup>
butironitrilo		610	0.34	1.63	--- <sup>d</sup>

a) Ref. 73.

b) Sin corregir por la respuesta instrumental. Disoluciones equilibradas al aire, a 25.0 °C.

c) 25.0 °C. 2% error.

d) No determinado.

Figura 26. Típica cinética de extinción de la luminiscencia del indicador  $[\text{Ru}(\text{phen})_2(4\text{-Clphen})]^{2+}$  ([phCl], 27  $\mu\text{M}$ ) en acetronitrilo, a 25.0 °C, desoxigenado con argón.

En la tabla 8 se recogen algunos **parámetros fotofísicos** característicos del complejo [phCl] en los disolventes evaluados. La transferencia de energía que tiene lugar desde la sonda en su estado excitado hasta el **oscilador O-H** de la molécula de agua es responsable, entre otros factores, del menor tiempo de vida

de desexcitación que exhibe este indicador en disolución acuosa (bajo Ar). Otros factores determinantes del  $\tau$  característico de un complejo de Ru(II) en un disolvente dado son la **viscosidad** del mismo, ya que a medida que aumenta ésta disminuye la pérdida de emisión por relajación vibracional y la **solubilidad del oxígeno** en dicho disolvente, factor responsable de que el tiempo de vida de emisión de este complejo sea superior en agua que en los disolventes orgánicos examinados cuando las disoluciones están equilibradas al aire, no siendo así en ausencia de oxígeno.

### **4.3. INMOVILIZACIÓN DE LA SONDA. CONSTRUCCIÓN DEL TERMINAL SENSIBLE.**

Tras la caracterización del indicador [phCl] en disolución se procedió a la inmovilización del mismo en un **soporte polimérico** adecuado. La finalidad de esta segunda etapa en la construcción de cualquier optodo es el aportar al indicador la **robustez** necesaria para el fin al que va a ser destinado, en nuestro caso la medida de la temperatura en aguas. El soporte, asimismo, es el responsable en la mayoría de las ocasiones de las características analíticas que definen al optodo, como son su **sensibilidad** y **tiempo de respuesta**, por lo que la sonda debe incorporarse a una matriz que facilite el contacto analito-indicador y que evite al mismo tiempo las posibles interferencias de otros desactivadores de la luminiscencia del indicador presentes en el medio. En definitiva, el polímero elegido para albergar al complejo [phCl] debe generar terminales sensibles *robustos*, fácilmente *reproducibles*, con *elevada conductividad térmica* y muy *baja permeabilidad al oxígeno* molecular.

Los métodos de preparación de los distintos terminales sensibles estudiados se describen más adelante en la *Parte experimental* de este optodo. Se ensayaron diversas matrices poliméricas en las que el indicador queda embebido en el interior del soporte, con objeto de evitar en la medida de lo posible la interferencia del oxígeno disuelto:

- **Copolímero metacrilato de hidroximetilo-metacrilato de metilo (HMMA-MMA).**

La principal dificultad que presenta la inmovilización del indicador seleccionado directamente en PMMA, estriba en la insolubilidad del mismo en el monómero de partida (*metacrilato de metilo*). Por este motivo, se copolimerizó dicho monómero con un derivado hidroxilado, en el que previamente se disolvió el complejo. La extracción del oxígeno molecular, inhibidor de la polimerización radicalica, se llevó a cabo sumergiendo los moldes con la mezcla del monómero y el indicador en un baño de ultrasonidos durante unos minutos.

- **Resinas epoxi.**

Para comprobar la validez de este tipo de resinas como soporte para el indicador luminiscente sensible a la temperatura, se utilizó un adhesivo comercial (DP-100, Scotch-Weld, 3M) cuyos componentes, *2,4,6-tris(dimetilaminometil)-fenol* (endurecedor) y la resina epoxi (típicamente *epiclorhidrina*) se presentan por separado en un mezclador que dispensa igual cantidad de cada uno de ellos para el perfecto curado del polímero. El complejo [phCl] es insoluble también en los dos componentes de este adhesivo comercial, por lo que en esta ocasión fue incorporado al endurecedor disuelto en *etilmetilcetona* (*2-butanona*). Este compuesto se emplea como disolvente de multitud de polímeros, como el *poli(metilmetacrilato)* o el *poli(cianoacrilato)*.

- **Policondensados de ácido silícico (sol-gel).**

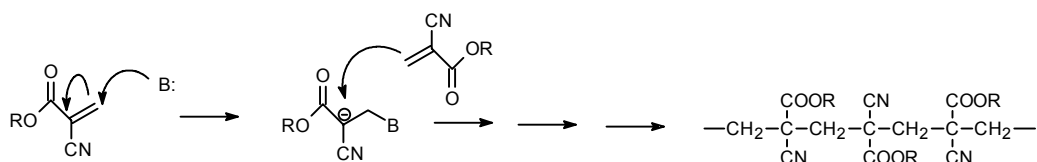
En el apartado 2.5.2. de los *Antecedentes generales* de esta Memoria se describe con detalle el proceso de formación y características principales de este tipo de soporte, frecuentemente empleado en la construcción de optodos. Los policondensados de ácido silícico presentan como principal inconveniente el que requieren el control del tamaño de poro en el material, a fin de evitar el posible lavado del indicador embebido en su interior. La matriz sol-gel ensayada presenta un tamaño de poro muy pequeño, debido a que en su preparación se sometió a un lento proceso de calentamiento programado. De esta forma se consigue un doble efecto: cerrar el poro y disminuir la fragilidad del soporte. El indicador, que penetra lentamente en el interior del monolito sol-gel tras sumergirse éste en una disolución acuosa de la sonda, queda ocluido en las microcavidades internas del

sistema, retenido por fuerzas electrostáticas que evitan su salida ( $\text{SiO}^-$ ,  $[\text{phCl}]^{2+}$ ). Las altas temperaturas alcanzadas en el proceso de formación del xerogel ( $700^\circ\text{C}$ ), impiden la incorporación de la sonda en las etapas previas a la formación de este soporte.

### • Poli(cianoacrilato).

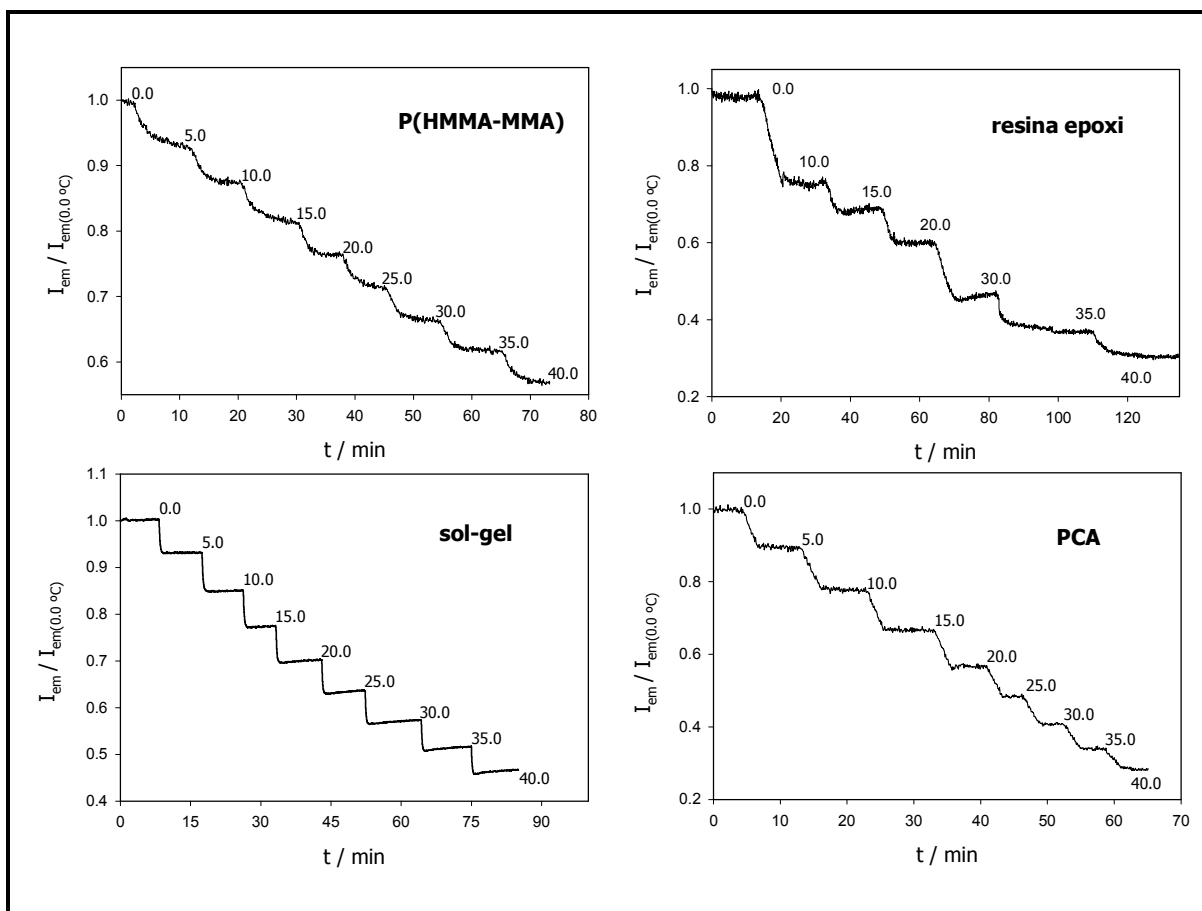
La preparación de terminales sensibles con este polímero presenta numerosas ventajas:

a) El proceso de polimerización del *cianoacrilato* no es sensible a la presencia de oxígeno en el medio ni requiere un iniciador, como el PMMA. La propia humedad del aire actúa como catalizadora de dicho proceso (catálisis nucleófila).



- b) Al contrario que con las resinas epoxi, no es necesario añadir un endurecedor.
- c) La agitación continuada consigue la solubilización de la sonda en el monómero sin ser necesarios disolventes adicionales.
- d) El curado del adhesivo es rápido y no requiere calentamiento.
- e) La transparencia del material resultante es óptima para la interrogación óptica del indicador.

En la figura 27 se muestran las curvas normalizadas de respuesta a los cambios de temperatura de la intensidad de luz emitida por el complejo  $[\text{phCl}]$  inmovilizado en los cuatro soportes investigados. Los terminales sensibles se sumergieron, convenientemente situados en el extremo de una fibra óptica, en un baño termostático en el que se aumentó progresivamente la temperatura. El tiempo de respuesta del sensor, por tanto, depende de la velocidad de calentamiento del sistema y no de la sonda. Únicamente con el terminal de tipo sol-gel se utilizaron dos baños regulados a distintas temperaturas, en los que se sumergió de forma alternada la sonda, por lo que su tiempo de respuesta sí es representativo.

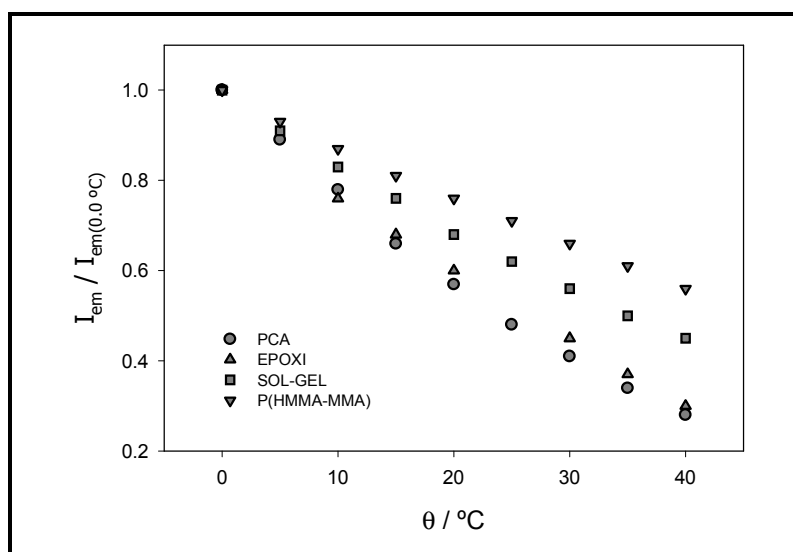


**Figura 27.** Variación con la temperatura (0.0-40.0 °C, normalizada a 0° C) de la intensidad de luminiscencia del indicador [pHCl] inmovilizado en los cuatro soportes poliméricos ensayados: copolímero (hidroximetil-metil)metacrilato, resina epoxi, policondensados de ácido silícido (sol-gel) y poli(cianoacrilato de etilo).

La variación que experimenta la luminiscencia de la sonda con los cambios de temperatura es inferior en el copolímero P(HMMA-MMA) y en el material sol-gel, probablemente debido a que estos soportes poseen en su estructura el oscilador O-H al que el indicador transfiere parte de su energía de excitación, por lo que la vía de desactivación por promoción térmica resulta menos competitiva. Por otro lado, la inestabilidad de la respuesta obtenida con la resina epoxi es consecuencia de la baja conductividad térmica que presentan estos polímeros,<sup>74</sup> lo que también se manifiesta en elevados tiempos de respuesta y baja reproducibilidad en las medidas, por lo que este soporte fue descartado. El poli(cianoacrilato), por el contrario, además de presentar las ventajas enumeradas anteriormente para la construcción de los terminales sensibles, constituye un

<sup>74</sup> Fried, J. R., *Polymer Science and Technology*, Prentice Hall PTR, Englewoods Cliffs, Nueva Jersey, EE.UU., 1995; p. 278.

buen soporte para inmovilizar el indicador seleccionado, ya que en este polímero su luminiscencia presenta una mayor variación con la temperatura (figura 28). Además, la reproducibilidad de construcción de estos terminales es superior a la de cualquier optodo construido con un sol-gel, ya que estructuralmente estos últimos se encuentran en continua evolución, lo que origina cambios en las medidas realizadas en periodos de tiempo espaciados. Se seleccionó, por tanto, el **PCA** como soporte del complejo [phCl] para la construcción del optodo de temperatura.



**Figura 28.** Gráfica comparativa de la respuesta a los cambios de temperatura de los distintos terminales sensibles preparados. Se observa que en los polímeros hidroxilados los cambios provocados por este parámetro físico en la intensidad de emisión del complejo [phCl] son menores.



#### 4.4. CARACTERIZACIÓN FOTOQUÍMICA DEL INDICADOR ÓPTICO EMBEBIDO EN POLICIANOACRILATO (PCA).

Una vez seleccionado el soporte idóneo para el indicador se procedió a la caracterización fotoquímica de los terminales sensibles construidos con el mismo con objeto de establecer los cambios que tienen lugar en las propiedades espectroscópicas del complejo [phCl] inmovilizado en poli(cianoacrilato) con respecto a las que exhibe en disolución y asegurar su utilidad para la fabricación de los optodos de temperatura objetivo.

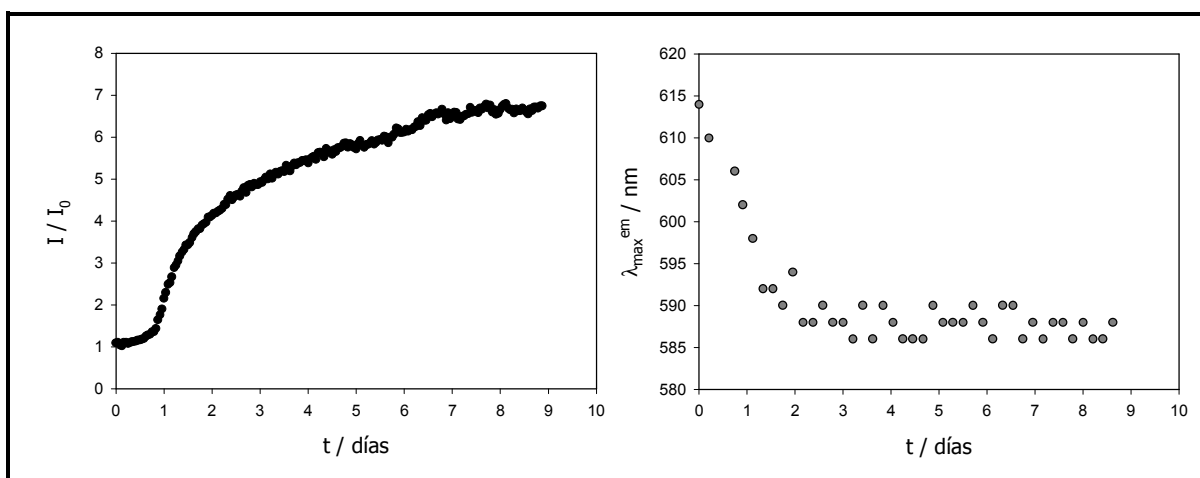
##### 4.4.1. INTENSIDAD DE LUMINISCENCIA.

La **cantidad de luz que emiten** los complejos de Ru(II) **aumenta** de un modo apreciable cuando estos son inmovilizados **en un soporte** sólido, debido a que en este entorno disminuye la desactivación no radiativa que tiene lugar por relajación vibracional y transferencia de energía al medio,<sup>29</sup> así como la accesibilidad del oxígeno molecular, eficaz desactivador de su luminiscencia, hasta la sonda.<sup>35</sup> Por otro lado, describimos anteriormente (apartado 4.1.) que cuando se puebla el estado excitado centrado en el metal por promoción térmica se produce un alargamiento de los enlaces Ru-N, debido el carácter  $\sigma^*$  de los orbitales  $e_g$  que acogen al electrón fotoexcitado. Esta distorsión está impedida en matrices *rígidas* por lo que se desestabiliza el  $^3MC$ , aumentando su energía (ver apartado 4.1.). Como consecuencia de ello, disminuye la vía de desactivación no radiativa que tiene lugar desde este estado ( $k_i$ ), dando lugar a un aumento del rendimiento cuántico de emisión del luminóforo.<sup>58,66,67</sup>

Los complejos de Ru(II) soportados en una matriz polimérica experimentan, asimismo, un **desplazamiento hipsocrómico** de su espectro de emisión. Este fenómeno óptico conocido como **rígidocromismo** y observable igualmente, aunque en menor medida, con los cambios de viscosidad del disolvente (ver tabla 8), se debe a que el medio rígido no es capaz de estabilizar por solvatación el estado excitado emisor  $^3MLCT$  (muy polar) tan eficazmente como las moléculas de disolvente fluido. La emisión en medio rígido se produce, por tanto, desde un estado energéticamente superior, lo que da lugar a una disminución en la  $\lambda^{em}$  observada.

Se llevó a cabo el registro de espectros de emisión del complejo [phCl] de forma continuada desde que se incorpora la sonda al polímero hasta que concluye la polimerización. La figura 29 muestra la variación que experimenta la intensidad y la longitud de onda máxima de emisión con el aumento de rigidez del entorno. La luz emitida por el indicador ocluido en la matriz polimérica es aproximadamente 7 veces mayor a la que muestra disuelto en el monómero. Asimismo, se observa un desplazamiento ( $\sim 30$  nm) hacia la región ultravioleta del espectro electromagnético del máximo de emisión recogido, como predice el fenómeno anteriormente descrito.

Este experimento no sólo permite conocer las propiedades fotofísicas del indicador en un soporte sólido, sino que introduce un nuevo método de seguimiento del **curado del polímero**. Las gráficas muestran que se produce un apreciable aumento de la viscosidad del medio durante los tres primeros días, a partir de los cuales no se observan cambios significativos en el máximo de emisión. El aumento registrado en la intensidad de luz es superior en los comienzos de la polimerización debido también a que la disminución de volumen de matriz provoca la concentración de la sonda. El tiempo de preparación de los terminales puede reducirse considerablemente aumentando la superficie de exposición del monómero teñido al aire con moldes más anchos, o bien disminuyendo la cantidad de éste añadida en cada molde, lo que dificultaría considerablemente el posterior cortado y pulido de los terminales sensibles.

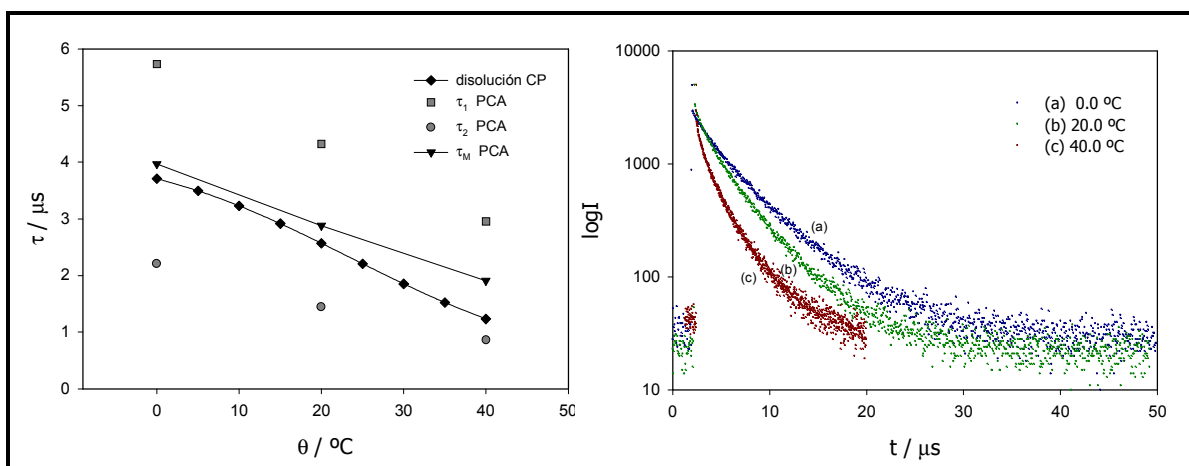


**Figura 29.** Seguimiento en continuo de los cambios producidos en la intensidad y posición del máximo de emisión del [phCl] durante el proceso de inmovilización del cianoacrilato de etilo en el que se encuentra disuelto ( $25.0$  °C,  $\lambda_{\text{max}}^{\text{em}} \pm 3$  nm).

#### 4.4.2. TIEMPO DE VIDA DE EMISIÓN.

Dado que en una matriz rígida, como se ha descrito en el epígrafe anterior, el estado excitado centrado en el metal se desestabiliza, alejándose del  $^3\text{MLCT}$ , el proceso de promoción térmica desde este estado transcurre frecuentemente en los complejos inmovilizados a través del cuarto estado  $^3\text{MLCT}$ , dando como resultado un aumento del tiempo de vida de emisión y una **disminución de la sensibilidad** del indicador de Ru(II) **a la temperatura** cuando éste se encuentra en el interior de un **soporte polimérico**.<sup>66</sup>

El complejo de Ru(II) seleccionado para construir el optodo de temperatura exhibe, tras su inmovilización en PCA, una cinética de extinción de la emisión biexponencial, como se ha determinado mediante la técnica TC-SPC a distintas temperaturas (ver *Parte experimental*). Con objeto de establecer la *sensibilidad* a la temperatura que muestra el complejo inmovilizado, se determinaron los **tiempos de vida medios con pesada preexponencial** ( $\tau_M$ , ec. 9) a distintas temperaturas. Comparando con los datos obtenidos para este indicador en disolución de carbonato de propileno, se observa efectivamente una disminución en la *sensibilidad* a la temperatura de la sonda inmovilizada en PCA. Asimismo, la figura 30 demuestra un aumento en los valores de  $\tau_M$ , con respecto a los determinados en disolución, conforme a lo esperado para un complejo de Ru(II) polipiridílico embebido en una matriz rígida impermeable al oxígeno molecular.



**Figura 30.** Gráfica comparativa (izq.) de la variación que experimenta el tiempo de vida de emisión del indicador [phCl] con la temperatura cuando se encuentra inmovilizado en una matriz de poli(cianoacrilato) (PCA) y en disolución de carbonato de propileno (CP). A la derecha se recogen las cinéticas de extinción de la luminiscencia que exhibe el indicador inmovilizado en PCA a distintas temperaturas.

En la tabla 9 se muestran los tiempos de vida de emisión ( $\tau$ ) y factores preexponenciales ( $\alpha$ ) obtenidos a partir del ajuste de la curva de desactivación a un modelo multiexponencial (ecuación 8). Para un sistema con un único fluoróforo, la existencia de dos  $\tau$  indica que la sonda se sitúa en el soporte en dos entornos diferentes, siendo los factores preexponenciales representativos de la proporción de indicador alojada en cada dominio. Siguiendo el razonamiento expuesto anteriormente, en el soporte sólido el indicador debe exhibir un tiempo de vida superior al que muestra en disolución y, por tanto, el  $\tau$  más largo obtenido debe corresponder a las moléculas de indicador ocluidas en el polímero. El tiempo de vida corto puede atribuirse a moléculas de indicador presentes en regiones *fluidas* del monolito de PCA, cuyo grosor puede haber dificultado la completa polimerización del monómero. El orden de magnitud de este  $\tau$  es comparable al obtenido para la sonda en disolución desoxigenada de butironitrilo (tabla 9, 1.63  $\mu\text{s}$  a 25.0 °C), teniendo en cuenta las diferencias de polaridad y viscosidad entre el cianoacrilato de etilo y este disolvente, lo que confirmaría la existencia de zonas sin polimerizar en el soporte.

**Tabla 9.** Tiempos de vida de emisión ( $\tau \pm 2\%$ ) y factores preexponenciales ( $\alpha \pm 1\%$ ) obtenidos de los ajustes biexponenciales de las cinéticas de extinción de la luminiscencia de uno de los terminales sensibles preparados ([pHCl] embebido en PCA, 67  $\mu\text{M}$ ), a distintas temperaturas ( $\tau_M = \sum \alpha_i \tau_i / \sum \alpha_i$ ,  $\langle \tau \rangle = \sum \alpha_i \tau_i^2 / \sum \alpha_i \tau_i$ ).

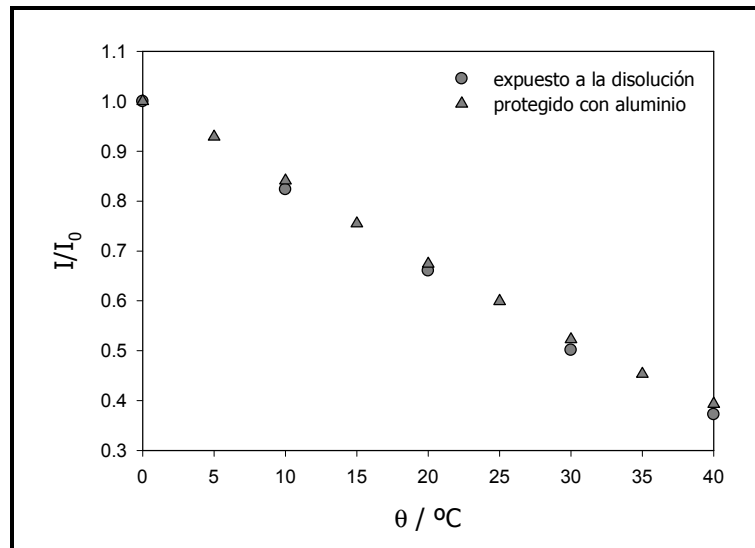
t / °C	$\tau_1$ / $\mu\text{s}$	$\alpha_1$ / %	$\tau_2$ / $\mu\text{s}$	$\alpha_2$ / %	$\tau_M$ / $\mu\text{s}$	$\langle \tau \rangle$ / $\mu\text{s}$
0.0	5.73	50	2.20	50	3.96	4.75
20.0	4.32	50	1.44	50	2.88	3.60
40.0	2.95	50	0.86	50	1.91	2.48

## 4.5. EVALUACIÓN ANALÍTICA DEL SENSOR.

Se llevó a cabo finalmente la determinación de algunos parámetros analíticos de interés con el fin de establecer la bondad del optodo desarrollado. Los ensayos preliminares realizados registrando la **intensidad de luz** emitida por la sonda inmovilizada, a distintas temperaturas, permitieron confirmar la estabilidad y reproducibilidad de las medidas. Seguidamente, se evaluaron distintos terminales sensibles por luminiscencia con resolución de fase en el demostrador instrumental *DEMODOE* desarrollado por T.G.I. con el fin de optimizar las condiciones de medida del equipo. Tras la conveniente modificación de la optoelectrónica de un primer prototipo, en función de las características de los sensores ópticos incluidos en este Proyecto, se procedió a la validación del optodo de temperatura por **detección sensible a la fase** de la luminiscencia del terminal sensible.

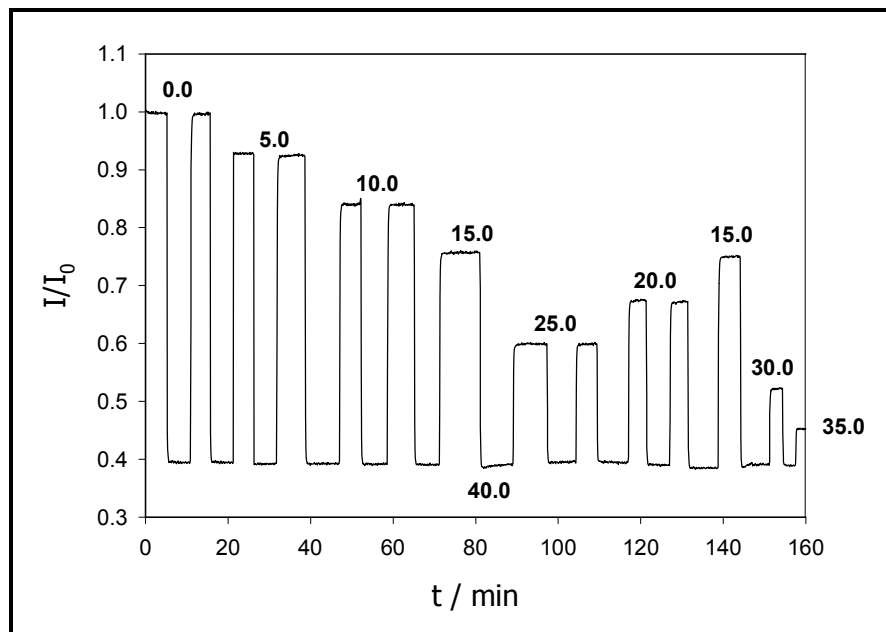
### 4.5.1. INTENSIDAD DE EMISIÓN.

Se colocó en el extremo de una fibra óptica bifurcada uno de los terminales sensibles de temperatura preparados, utilizando para ello un adaptador de acero inoxidable roscado en el que el sensor queda expuesto directamente a la disolución, por lo que el sistema debe ser protegido de la luz ambiente. Por este motivo, se recubrió el terminal con una **microcapa de oro sobre grafito** (Centro de Microscopía Electrónica, U.C.M.) la cual, a pesar de mantener aislado de la luz al sensor luminiscente, no poseía la robustez requerida para un uso continuado del mismo. Como método alternativo se envolvió el terminal con una **película de aluminio** (15  $\mu\text{m}$ ), que no solo evita la interferencia de la luz externa sino que consigue que el sensor esté en contacto térmico con la disolución. Se observa en la figura 31 que la sensibilidad del optodo de temperatura no depende del recubrimiento metálico del extremo sensible, a pesar de que el aluminio amplifica la luminiscencia emitida por la sonda en un factor de  $\sim 8$  veces.



**Figura 31.** Curvas de calibrado de un terminal luminiscente sensible a la temperatura [phCl]/PCA (120  $\mu$ M) protegido de la luz ambiente con película de aluminio ( $\blacktriangle$ ) y expuesto directamente a la disolución de medida ( $\bullet$ ). Las curvas de respuesta se han normalizado a 0 °C ( $I_0$ ).

Una vez comprobado que el aislamiento óptico del terminal sensible no introduce interferencias en las medidas, se realizaron distintos calibrados siguiendo el procedimiento descrito en la *Parte experimental* de este optodo (figura 32). La **estabilidad de las lecturas** ( $\sigma_{n-1}^{40^\circ\text{C}} = 0.001$ ,  $n = 85$ ), el **tiempo de respuesta** ( $t_{90}$  (0-40°C) = 10 s) y la **repetibilidad de las medidas** realizadas ( $s_{n-1}^{40^\circ\text{C}} = 0.003$ ,  $n = 13$ ) confirman la bondad del complejo [phCl] inmovilizado en la matriz de cianoacrilato como optodo de temperatura en el intervalo objeto de ensayo (0-40 °C). Asimismo, la respuesta lineal observada ( $I/I_0 = 0.995 - 0.016\theta$ ,  $r = 0.9989$ , figura 31,  $\blacktriangle$ ) facilita la calibración posterior del sensor.

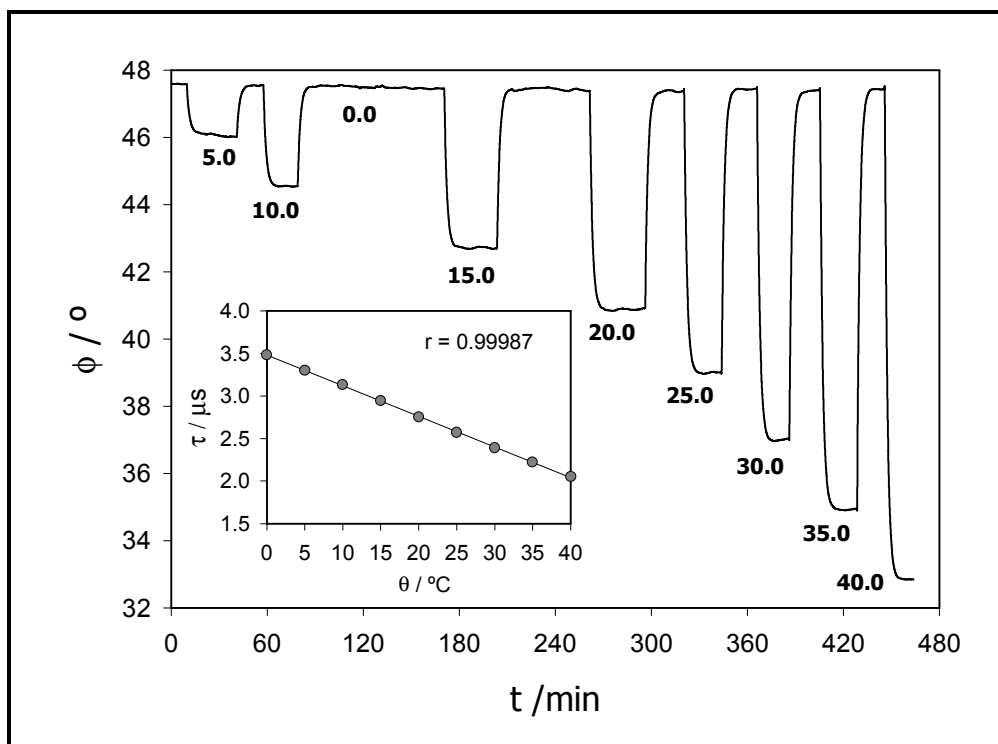


**Figura 32.** Función de respuesta (en intensidad de luminiscencia) del terminal sensible, fabricado con el indicador [phCl] embebido en poli(cianoacrilato de etilo) ( $120 \mu\text{M}$  antes de la polimerización) y recubierto con película de aluminio, a los cambios de temperatura del agua ( $0.0\text{-}40.0 \text{ }^\circ\text{C}$ ).

#### 4.5.2. DETECCIÓN SENSIBLE A LA FASE.

La validación de todos los optodos desarrollados en este Proyecto se realizó por **detección sensible a la fase** de la luminiscencia procedente del terminal sensible, en el demostrador optoelectrónico fabricado por T.G.I., denominado *DEMODE*. Dado que en los estudios preliminares llevados a cabo por medida de la intensidad de luminiscencia se estableció que con los terminales sensibles protegidos con película de aluminio se consigue amplificar la señal procedente de los mismos sin alterar la sensibilidad del optosensor de temperatura, se diseñó y fabricó una pieza móvil de acero inoxidable la cual, acoplada al adaptador original, acoge al terminal sensible de polímero teñido con indicador manteniéndolo en perfecto contacto térmico con la muestra y aislándolo, al mismo tiempo, de la luz externa. Al mismo tiempo, la cara interna pulida de esta pieza consigue aumentar significativamente la cantidad de luz recogida por el detector fotónico (ver *Parte experimental*).

La figura 33 recoge un calibrado típico realizado con el prototipo fabricado por T.G.I., modulando la fuente azul de excitación a 50 KHz. En esta gráfica se aprecia la ausencia de deriva en las medidas realizadas a 0 °C, así como la dependencia lineal con la temperatura de los tiempos de vida de emisión que exhibe la sonda inmovilizada, calculados a partir de los valores de desfase obtenidos con el terminal sensible de temperatura situado en el extremo de la fibra óptica ( $\tau = \tan\phi/2\pi f$ ), lo cual facilita significativamente la calibración del optodo. Estos  $\tau$  no coinciden con los recogidos en la tabla 9, determinados mediante la técnica TC-SPC, ya que corresponden a terminales sensibles de distinta concentración y, en consecuencia, con diferente distribución de las moléculas de indicador en el polímero. En epígrafes posteriores se desarrolla con detalle la influencia de la cantidad de luminóforo soportado sobre la respuesta, en grados de desfase, del sensor de temperatura desarrollado.



**Figura 33.** Variación del desfase de la luminiscencia de la sonda [phCl]/PCA (figura 31, 120  $\mu$ M) con la temperatura. En la figura interior se observa la relación (lineal) entre el tiempo de vida de emisión, calculado  $((3.5-2.0) \pm 0.1 \mu$ s, ver texto) a partir de los valores de desfase obtenidos, y la temperatura. Para recoger esta curva de respuesta se moduló la fuente de excitación a 50 KHz.



## A) FRECUENCIA ÓPTIMA DE MODULACIÓN DEL LED DE EXCITACIÓN.

Como se describió anteriormente en el capítulo de esta Memoria dedicado al demostrador fabricado por T.G.I. (epígrafe 2., capítulo *Detección sensible a la fase*), la capacidad de seleccionar en el equipo *DEMODE* la frecuencia de modulación del *led* azul de excitación posibilita llevar a cabo medidas de luminiscencia con sensores que exhiban tiempos de vida de emisión diferentes (en el intervalo 0.2-10  $\mu$ s), siempre que éstos posean características espectroscópicas de absorción/emisión similares. Es necesario, por tanto, establecer una frecuencia óptima de modulación para cada uno de los optodos desarrollados.

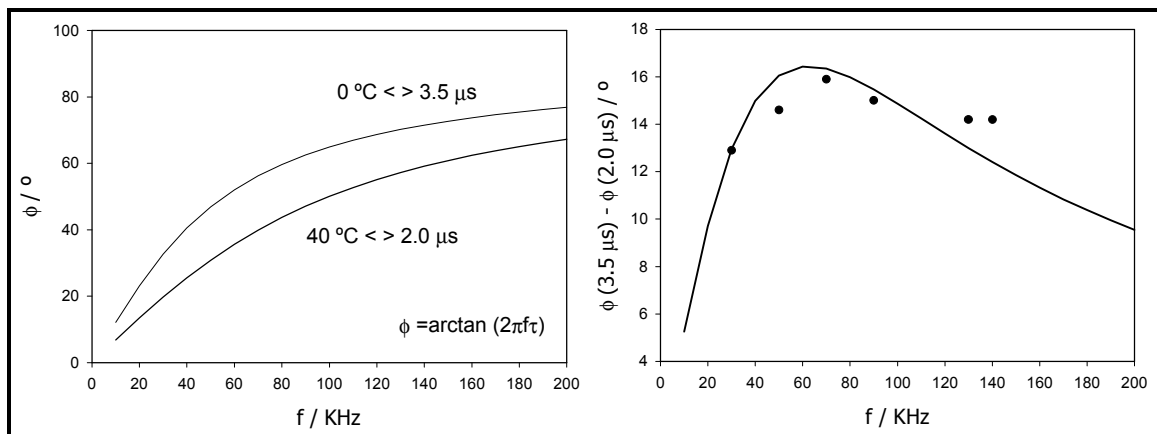
Siguiendo el procedimiento descrito en la parte experimental (sección 5.4.2.e) se determinó, con uno de los terminales sensibles a la temperatura preparados, el desfase producido por la sonda sometida a las dos temperaturas extremas del intervalo ensayado (0.0 y 40.0 °C), modulando a diferentes frecuencias la fuente de luz de excitación del terminal sensible luminiscente [phCl]/PCA (tabla 10). La relación señal/ruido calculada a partir de la excursión del desfase entre las dos temperaturas medidas y la desviación típica de los valores recogidos en las condiciones de mínima señal (40.0 °C) es máxima a **70 KHz** y, por tanto, también la precisión en las medidas, por lo que se seleccionó esta frecuencia como óptima para llevar a cabo determinaciones de temperatura por detección sensible a la fase con el optodo.

En la figura 34 se ha representado la curva teórica de diferencia de fase (recorrido) que se obtendría para cada frecuencia entre las dos temperaturas evaluadas ( $\Delta\phi(f) = \phi_0 - \phi_{40}$ ,  $\phi = \arctan(2\pi f\tau)$ ), teniendo en cuenta los tiempos de vida de desexcitación aparentes determinados experimentalmente a 0 y 40°C a partir de los valores de desfase recogidos en el sistema *DEMODE* modulado a 50 KHz (figura 34, 3.5 y 2.0  $\mu$ s, respectivamente). Los datos experimentales, recogidos en la tabla 10 y representados asimismo en la figura 34 (dcha.), aunque difieren ligeramente de los resultados teóricos debido a que la ecuación 10 a partir de la cual se obtuvieron dichos tiempos de vida es aplicable a cinéticas estrictamente monoexponenciales, muestran un hábito similar al proporcionado por la curva teórica, ambos con un máximo en torno a 60-70 KHz.

**Tabla 10.** Recorrido ( $\Delta\phi$ , en grados de desfase) obtenido con el prototipo *DEMODE* y el sensor luminiscente de temperatura [pHCl]/PCA (120  $\mu$ M) entre 0.0 y 40.0  $^{\circ}$ C, modulando el *led* de excitación a diferentes frecuencias. Se recoge también la desviación típica ( $\sigma_{n-1}$ , n = 50) de los valores de desfase obtenidos a 40.0  $^{\circ}$ C (mínima señal en el intervalo de temperaturas estudiado) junto con la relación señal/ ruido determinada para cada frecuencia ( $\Delta\phi / 3\sigma_{n-1}$ , 99% de confianza).

<b>f / KHz</b>	<b><math>\Delta\phi / ^{\circ}</math> <sup>a</sup></b>	<b><math>\sigma_{n-1}</math> (40.0 <math>^{\circ}</math>C)</b>	<b><math>\Delta\phi / 3\sigma_{n-1}</math></b>
<b>30</b>	12.9	0.05	86
<b>50</b>	14.6	0.03	166
<b>70</b>	<b>15.9</b>	0.03	<b>177</b>
<b>90</b>	15.0	0.06	83
<b>130</b>	14.2	0.06	79
<b>140</b>	14.2	0.07	68

A)  $\Delta\phi = \phi(0.0) - \phi(40.0)$ .



**Figura 34.** Izq.: Desfase producido por un luminóforo, de tiempo de vida de emisión de 3.5 y 2.0  $\mu$ s, en función de la frecuencia de modulación de la fuente de excitación. A la derecha se representa, junto con los datos experimentales, la curva teórica correspondiente al recorrido (diferencia de fase) que se obtendría para cada frecuencia y los  $\tau$  evaluados [ $\phi = \arctan(2\pi f\tau)$ ].

**B) TIEMPO DE VIDA APARENTE DE LA Sonda INMOVILIZADA.**

A partir de los valores de los tiempos de vida de emisión a distintas temperaturas que exhibe el complejo [phCl] inmovilizado en PCA, obtenidos de los ajustes de la cinética de extinción de su luminiscencia con la técnica TC-SPC, (apartado 4.4.2), se calculó el **tiempo de vida aparente** ( $\tau_{\phi}^{ap}$ ) correspondiente a una frecuencia de modulación de 70 KHz (ecuación 12), con objeto de comparar los resultados obtenidos con resolución temporal con los valores de desfase extraídos de las medidas realizadas con el mismo terminal en el sistema *DEMODE* modulando el *led* de excitación a dicha frecuencia (el desfase que introduce la electrónica del equipo se corrigió utilizando la membrana patrón, según se describe en el capítulo de esta Memoria dedicado al prototipo fabricado por T.G.I., *Detección sensible a la fase*).

**Tabla 11.** Comparación de los tiempos de vida de emisión promedio del [phCl] inmovilizado en PCA, determinado a partir de los  $\tau$  individuales que exhibe el indicador en esta matriz sólida, obtenidos mediante la técnica TC-SPC (tabla 10), con el tiempo de vida aparente, calculado para una frecuencia de modulación del led de excitación de 70 KHz y el tiempo de vida aparente experimental, extraído a partir de las medidas realizadas con el sistema *DEMODE*.

$\theta / ^\circ\text{C}$	$\langle\tau\rangle / \mu\text{s}^a$	$\tau_{\phi}^{ap} / \mu\text{s}^b$	$\tau_{\phi}^{exp} / \mu\text{s}^c$
0.0	4.75	3.62	3.27
40.0	2.48	2.10	1.47

- a) Tiempo de vida promedio  $\langle\tau\rangle$  (ecuación 9).  
 b) Tiempo de vida aparente (70 KHz, ecuación 12).  
 c)  $\tau_{\phi}^{exp} = \tan(\phi^{exp}) / 2\pi f$  (70 KHz).

Los valores obtenidos para los tiempos de vida aparentes son, como era de esperar según lo expuesto en el capítulo de esta Memoria dedicada a las medidas de luminiscencia con detección sensible a la fase, inferiores a los calculados como tiempo de vida promedio, debido a que en los primeros cada  $\tau$  se pesa por un factor  $(\alpha\tau/1+\omega^2\tau^2)$  y, en consecuencia, los componentes con tiempos de vida de desexcitación más cortos tienen más peso en el  $\tau$  aparente que en el promedio. Este efecto se intensifica a medida que disminuye la permanencia del luminóforo en el estado excitado y cuanto mayor sea la frecuencia de modulación de la fuente de excitación ( $\omega = 2\pi f$ ).  $\tau_{\phi}^{ap}$  es un parámetro difícil de interpretar, ya que es

sólo un valor aparente dependiente de la frecuencia y del método de medida (desfase o modulación) y, por tanto, no característico de un fluoróforo dado. Curiosamente, los tiempos de vida experimentales obtenidos a partir de los valores de desfase que proporciona el demostrador *DEMODE* son inferiores a los teóricos, probablemente debido a las reflexiones provocadas por la cara interna pulida del adaptador de acero inoxidable donde se aloja el terminal sensible y que no se han eliminado por completo con la combinación de filtros empleada en el prototipo industrial. El efecto de la luz dispersa influye significativamente en los ángulos de desfase medidos, cuyos valores son considerablemente inferiores a los esperados debido a que el fotodetector recibe una señal con un tiempo de vida muy corto y son estos  $\tau$ , como hemos visto, los que tienen más peso sobre la cinética de desactivación de los luminóforos cuando las medidas se hacen con resolución de fase. De nuevo, el error introducido por las reflexiones se acentúa con el aumento de la frecuencia de modulación de la fuente de luz.<sup>10</sup>

Por otra parte, se han determinado los tiempos de vida de emisión del complejo inmovilizado en el polímero PCA en un intervalo de temperaturas superior al evaluado en los estudios anteriormente descritos (-30, 80 °C), a partir de los valores de desfase proporcionados por el prototipo *DEMODE*, modulando el *led* azul a 70 KHz. A pesar de que la temperatura de reblandecimiento del polímero PCA es 165 °C, al realizar estas medidas no se superaron los 80 °C, con el fin de evitar una posible termodegradación del complejo. Los parámetros *B* y  $\Delta E$  obtenidos del ajuste de los datos experimentales a la sigmoide dada por la ecuación 16 (ver tabla 12), confirman que la desactivación del indicador en el soporte transcurre mayoritariamente vía promoción térmica al **cuarto <sup>3</sup>MLCT** (<sup>3</sup>MLCT'), dada la significativa reducción que se produce en la diferencia de energía entre el <sup>3</sup>MLCT y el <sup>3</sup>MC de promoción térmica tras inmovilizar la sonda en el polímero PCA, motivo por el cual su sensibilidad a la temperatura es inferior a la que exhibe en disolución pero aumenta significativamente su estabilidad térmica (apartado 4.4.2). El estudio se realizó con dos terminales de temperatura del mismo lote (igual concentración, 67  $\mu$ M), sin apreciarse diferencias significativas entre ambos.

**Tabla 12.** Parámetros característicos de la curva obtenida a partir del ajuste de los datos experimentales de tiempos de vida de luminiscencia del indicador [pHCl] en función de la temperatura ( $\tau = [A + B \exp^{-1.44 \Delta E / T}]^{-1}$ ).

	$A = k_r + k_{nr} \neq f(T) / s^{-1}$	$B / s^{-1}$	$\Delta E / cm^{-1}$
<b>DISOLUCIÓN<sup>a</sup></b>	$(2.36 \pm 0.04) \times 10^5$	$(1.5 \pm 0.9) \times 10^{13}$	$4215 \pm 134$
<b>PCA<sup>b</sup></b>	$(1.16 \pm 0.02) \times 10^5$	$(2.1 \pm 0.4) \times 10^9$	$1844 \pm 41$
<b>PCA<sup>c</sup></b>	$1.78 \times 10^5$	$1.1 \times 10^{10}$	2269
<b>PCA<sup>d</sup></b>	$1.58 \times 10^5$	$8.6 \times 10^{10}$	2275

a) Carbonato de propileno, tabla 7.

b)  $\tau$  obtenidos a partir de los valores de  $\phi$  experimentales ( $r = 0.99959$ ).

c)  $\tau_M$  obtenidos por TC-SPC, tabla 9 ( $r = 0.9999$ ).

d)  $\langle \tau \rangle$  obtenidos por TC-SPC, tabla 9 ( $r = 0.9999$ ).

### C) EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE INDICADOR EN EL SOPORTE. REPETIBILIDAD, REPRODUCIBILIDAD Y TIEMPO DE RESPUESTA DEL SENSOR.

Con el fin de establecer la dependencia del sensor con la concentración de indicador en el polímero soporte, se evaluaron terminales sensibles preparados disolviendo distintas cantidades de indicador en el monómero inicial. La heterogeneidad del medio que rodea a la sonda hace que ésta muestre tiempos de vida de emisión distintos en función de su entorno, variable según la cantidad de complejo inmovilizado.

En los datos resumidos en la tabla 13 se observa que la excursión del desfase entre las dos temperaturas ensayadas aumenta a medida que lo hace la concentración de la sonda, hasta alcanzar un valor máximo (67  $\mu M$ ) a partir del cual disminuye. Este hecho no puede atribuirse a fenómenos de autodesactivación que tengan lugar a altas concentraciones de indicador en el polímero, ya que esto daría lugar a una disminución en el desfase observado a una temperatura dada a medida que aumenta la concentración de la sonda. El origen del aumento de la sensibilidad de la sonda con la concentración probablemente se encuentre en la desigual distribución de las moléculas de indicador en el soporte, lo que origina distintas cinéticas de extinción de la

luminiscencia en función de la cantidad de sonda inmovilizada y el entorno que le rodea (ver epígrafe 4.4.2.). Atendiendo al criterio de máxima excursión de fase se seleccionó, por tanto, **67  $\mu\text{M}$**  como concentración óptima.

**Tabla 13.** Variación de desfase de la luminiscencia ( $\Delta\phi$ ) obtenida con el prototipo DEMODE entre 0.0 y 40.0 °C para terminales sensibles con distinta cantidad de indicador [phCl] inmovilizado en PCA. Cada una de las concentraciones se examinó con tres terminales de un mismo lote, recogiendo tres ciclos de temperatura 0-40 °C con cada uno de ellos. La *repetibilidad* de dichos ciclos y la *reproducibilidad* entre terminales de un mismo lote se expresan en términos de la correspondiente desviación estándar relativa (RSD).

[phCl] <sup>a</sup> / $\mu\text{M}$	$\phi$ (0 °C) / °	$\phi$ (40 °C) / °	$\Delta\phi$ (0-40 °C) / °	repetibilidad % <sup>b</sup>	$\langle\Delta\phi\rangle$ / °	reproducibilidad % <sup>b</sup>
29	53.6	39.4	14.2	0.1	14.2	1.1
	51.1	36.7	14.4	1.0		
	50.4	36.3	14.1	0.8		
48	55.8	36.7	19.1	0.3	18.6	2.3
	55.6	37.2	18.4	0.8		
	55.7	37.4	18.3	0.7		
<b>67</b>	55.2	32.8	22.4	0.4	<b>22.6</b>	1.4
	55.6	33.1	22.5	0.3		
	55.8	32.8	23.0	0.8		
71	57.4	36.9	20.5	0.6	20.6	0.5
	57.2	36.5	20.7	0.7		
	57.4	36.8	20.6	0.3		
107 (lote A) <sup>c</sup>	57.2	39.4	17.8	0.5	17.6	1.6
	56.6	39.3	17.3	1.0		
	56.8	39.0	17.8	0.3		
107 (lote B) <sup>c</sup>	57.4	39.7	17.7	0.3	17.8	1.0
	57.7	40.0	17.7	1.5		
	57.9	39.9	18.0	1.3		
114	56.2	37.0	19.2	0.7	18.7	2.2
	56.6	38.2	18.4	0.7		
	56.0	37.4	18.6	0.6		

a) Concentración inicial de indicador en el monómero de partida.

b)  $\text{RSD} = s_{n-1} / \Delta\phi \times 100$  ( $n=3$ ).

c) A y B: lotes diferentes de terminales sensibles fabricados a partir de la misma cantidad inicial de indicador.

Por otra parte, a partir de una misma disolución *madre* de indicador en cianoacrilato se prepararon seis terminales de temperatura, tres de los cuales fueron evaluados con el prototipo *DEMODE* sometiéndolos a tres ciclos sucesivos de temperatura 0-40 °C. Este estudio permite estimar la **repetibilidad** de dichos ciclos para cada uno de los terminales examinados, así como la

**reproducibilidad** de las medidas entre terminales de un mismo lote (igual concentración). Ambos parámetros analíticos se determinaron en términos de la desviación estándar relativa correspondiente (RSD, en %). La variabilidad observada en la *reproducibilidad* de los terminales a distintas concentraciones se debe probablemente al proceso individualizado de cortado y pulido manual de los mismos y es independiente de la cantidad de indicador inmovilizado. Por otro lado, el criterio adoptado para comparar lotes distintos con igual concentración de [pHCl] establece que no existen diferencias significativas cuando la *t* de Student experimental, calculada a partir de la ecuación 19, es inferior a la teórica, lo cual se verifica con los dos lotes de concentración 107  $\mu\text{M}$  ensayados ( $t_{\text{exp}} = 4.35 < t_{4,0.005} = 4.60$ , para  $(n_1+n_2-2)$  grados de libertad y el 99% de confianza):<sup>75</sup>

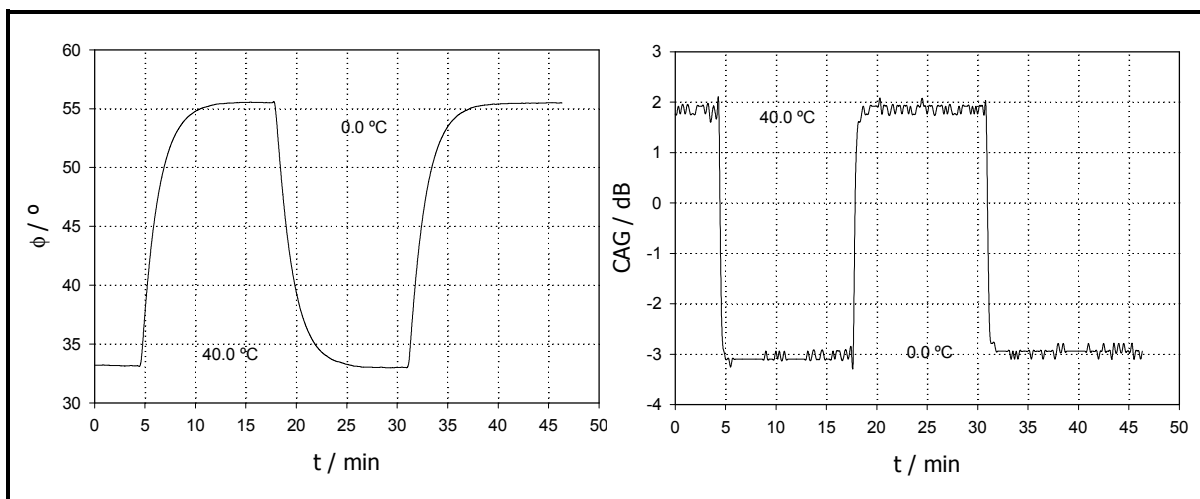
$$t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\sqrt{S^2 \left( \frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} \right)}} \quad S = \frac{(n_1 - 1)s_1^2 + (n_2 - 1)s_2^2}{n_1 + n_2 - 2} \quad (19)$$

siendo  $\bar{x}_i$  la media,  $s_i$  la desviación típica y  $n$  el número de muestras.

La figura 35 muestra la curva de respuesta de uno de los terminales de concentración óptima (67  $\mu\text{M}$ ) recogida en el dispositivo instrumental *DEMODE*. El tiempo requerido para alcanzar el 90% de la señal total (**tiempo de respuesta** del sensor,  $t_{90}$ ) resultó ser de 3 minutos, tanto para los ciclos 0-40 °C como para los inversos, en las medidas realizadas en desfase. Sin embargo, es mucho más rápido ( $t_{100} = 40$  s) el cambio reflejado en el *control automático de la ganancia* del fotomultiplicador (C.A.G.) (figura 35), equivalente a las medidas realizadas en intensidad de luminiscencia (*Equipo DEMODE*, sección 2.D.). La notable diferencia de tiempos de respuesta observada se debe sin duda al *procesado de datos* que realiza el equipo para obtener un menor nivel de ruido. Así, a medida que aumenta el número de promedios que realiza el integrador de la señal sinusoidal de emisión muestreada, se incrementa el tiempo de respuesta del sensor pero disminuye significativamente el ruido de la señal medida. Podemos concluir, por tanto, que la respuesta del sensor luminiscente con *detección sensible a la fase*

<sup>75</sup> Massart, D. L., Vandeginste, B. G. M., Deming, S. N., Michotte, Y. y Kaufman, L., *Chemometrics: a textbook*, Elsevier, Amsterdam (Holanda), 1990; pp. 33-57.

depende de las condiciones de medida del equipo y no de la sonda de temperatura, cuya luminiscencia cambia de forma prácticamente instantánea con dicho parámetro físico, tal y como demuestra el C.A.G. del sistema y las medidas realizadas en intensidad de luminiscencia (ver apartado 4.5.1., figura 32).



**Figura 35.** Desfase de la señal y nivel del control automático de ganancia (CAG) del fotomultiplicador obtenidos con el prototipo *DEMODOE* para uno de los terminales sensibles fabricados con [pHCl/PCA] (67  $\mu$ M) cuando se le expone sucesivamente a 0 y 40 °C de temperatura.

En la tabla 14 se resumen los parámetros analíticos más significativos del optodo luminiscente de temperatura sobre fibra óptica desarrollado. Teniendo en cuenta que se trata de un sensor físico, no se puede establecer un *límite de detección* ya que no es posible realizar medidas en ausencia de analito (blanco). Alternativamente, y dado que la respuesta del sensor es lineal en el intervalo de temperaturas estudiado, se determinó la **resolución** del optodo con el prototipo *DEMODOE* a partir de la pendiente de la recta de calibrado y la desviación típica de las medidas realizadas a 40 °C (mínima relación señal/ruido en el intervalo verificado). El valor obtenido de esta forma (0.16 °C) se encuentra por debajo de la precisión de los baños recirculadores utilizados para controlar la temperatura ( $\pm 0.25$  °C) y, por tanto, la *sensibilidad* del sensor vendrá determinada por éstos. La validación en un futuro del optodo con patrones de temperatura establecidos (punto triple del agua, puntos de ebullición, etc.) permitirá determinar la exactitud en las medidas realizadas con este sensor óptico.



**Tabla 14.** Parámetros analíticos característicos resultantes de la medida de temperatura con el optodo [phCl]/PCA desarrollado y el prototipo *DEMODE*.

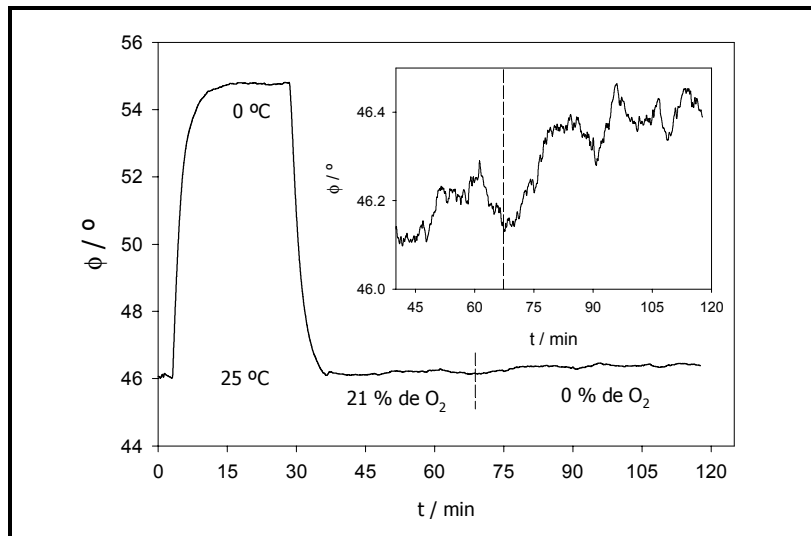
$f_{\text{óptima}}$ KHz	$[\text{phCl}]_{\text{óptima}}^{\text{a}}$ $\mu\text{M}$	$\Delta\phi$ (0-40 °C) °	$\sigma_{n-1}$ (40.0 °C) <sup>b</sup> °	$m^{\text{c}}$ °/°C	$R^{\text{d}}$ °C	$t_{90}^{\phi \text{ e}}$ s	$t_{90}^{\text{CAG e}}$ s
70	67	22.35	0.03	0.56	0.16	180	20

- a) Concentración de indicador en el monómero inicial.  
 b) 40 °C,  $n = 50$ .  
 c) Sensibilidad (pendiente de la recta de calibrado)  
 d) Resolución,  $R = 3\sigma_{n-1} / m$  (99 % de confianza).  
 e) Tiempo que tarda el terminal sensible en alcanzar el 90% de la señal total ( $t_{90}^{\phi}$  : respuesta en fase;  $t_{90}^{\text{CAG}}$  : respuesta del control automático de ganancia).

#### D) INTERFERENCIA DEL OXÍGENO DISUELTO.

El oxígeno molecular, presente tanto en la atmósfera como disuelto en agua, actúa como eficaz desactivador de la luminiscencia de los complejos de Ru(II), como se ha destacado en numerosas ocasiones a lo largo de esta Memoria. Por este motivo, se seleccionaron matrices poliméricas para inmovilizar el indicador cuya permeabilidad al O<sub>2</sub> fuera mínima.

Se observa en la figura 36 que el oxígeno presente en la muestra donde se midió la temperatura no interfiere en la señal medida pues, la eliminación de éste de las aguas de medida, debería conducir a un aumento del tiempo de vida de emisión y, por tanto, a un incremento del desfase de la luminiscencia procedente del terminal sensible. El aumento apreciable en la desviación típica de las medidas (ver figura interior), con respecto a lo obtenido en los experimentos descritos en apartados anteriores, se debe únicamente a la utilización de un baño de menor precisión para llevar a cabo este estudio.



**Figura 36.** Sensibilidad del optodo de temperatura [phCI]/PCA al oxígeno disuelto en agua. Los valores de desfase recogidos no están corregidos por la respuesta instrumental. Durante el proceso de desoxigenación de la muestra la temperatura se controló a  $25 \pm 1$  °C con un baño termostático.

## 5. PARTE EXPERIMENTAL.

En este epígrafe de la Memoria se describen los distintos reactivos y materiales empleados en la construcción del optodo de temperatura, así como los métodos aplicados para la selección del indicador óptimo y los procedimientos de inmovilización de éste para construir la fase sensora. Asimismo, se detallan los equipos y dispositivos de medida utilizados en las diferentes etapas del desarrollo del sensor.

### 5.1. REACTIVOS Y MATERIALES EMPLEADOS.

- **Disolventes.**

- Ácido clorhídrico (35%, *Panreac*).
- Acetonitrilo (para HPLC, *Panreac*).
- Agua purificada, obtenida de un sistema MilliQ (*Millipore*).
- Butironitrilo (>99%, *Fluka*).
- Carbonato de 1,2-propileno anhidro (99.7%, *Aldrich*).
- Etanol absoluto (99.8%, para espectroscopía UV/IR, *Panreac*).
- Etilenglicol (*Prolabo*).
- Etilmetilcetona (99%, para análisis, *Merck*).
- Metanol (99.8%, para HPLC, *Scharlau*).

- **Indicadores.**

- Hexafluorofosfato de [tris(2,2'-bipiridina)]rutenio(II), **[Ru(bpy)<sub>3</sub>](PF<sub>6</sub>)<sub>2</sub>**.<sup>76</sup>
- Hexafluorofosfato de [tris(2-2'-bipirazina)]rutenio(II), **[Ru(bpz)<sub>3</sub>](PF<sub>6</sub>)<sub>2</sub>**.<sup>72</sup>
- Hexafluorofosfato de [tris(4,7-difenil-1,10-fenantrolina)]rutenio(II), **[Ru(dip)<sub>3</sub>](PF<sub>6</sub>)<sub>2</sub>**.<sup>72</sup>
- Hexafluorofosfato de [bis(1,10-fenantrolina)(4-hidroxi-1,10-fenantrolina)] rutenio(II), **[Ru(phen)<sub>2</sub>(4-OHphen)](PF<sub>6</sub>)<sub>2</sub>**.<sup>72</sup>
- Cloruro de [bis(1,10-fenantrolina)(4-cloro-1,10-fenantrolina)]rutenio(II), **[Ru(phen)<sub>2</sub>(4-Clphen)]Cl<sub>2</sub>**.<sup>73</sup>

---

<sup>76</sup> Orellana, G., Tesis Doctoral, Universidad Complutense de Madrid, 1988.

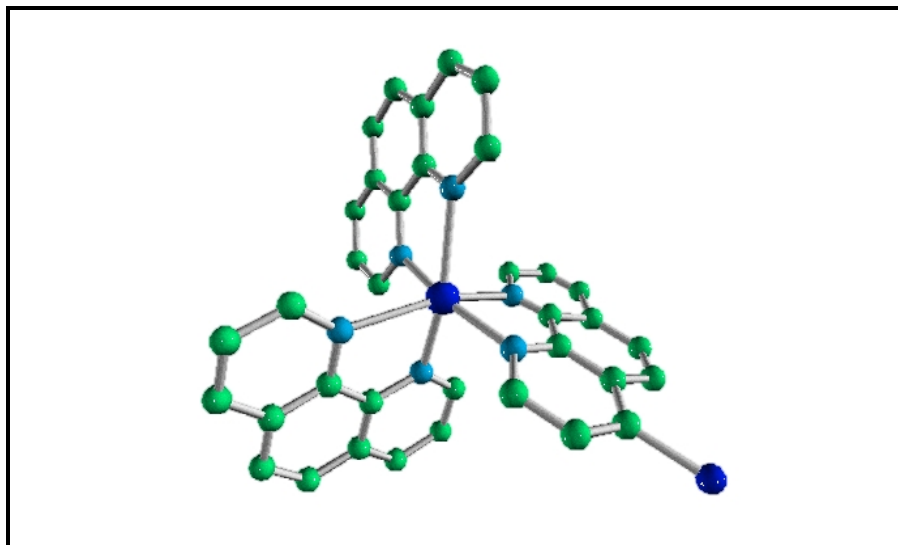


Figura 37. Estructura tridimensional del complejo luminiscente de Ru(II) seleccionado como sonda de temperatura.

- **Reactivos empleados en la inmovilización de los indicadores.**

- Metacrilato de hidroximetilo (HMMA).

La síntesis de este monómero se llevó a cabo siguiendo el procedimiento descrito por Villeras et al., al que se añadieron las modificaciones oportunas.<sup>77#</sup>

- Metacrilato de metilo (MMA, para síntesis, >99%, Merck).

Purificado mediante el lavado sucesivo con una disolución acuosa de hidróxido sódico al 5% y agua destilada. Tras secar con cloruro cálcico, se destiló a presión reducida conservando el monómero libre de inhibidor a baja temperatura y protegido de la luz ambiente.<sup>#</sup>

- 2,2'-azobisisobutironitrilo (AIBN, >98 %, Fluka).

Purificado por recristalización de metanol.<sup>#</sup>

- Policondensados de ácido silícico (sol-gel, proporcionados por el Dr. Íñigo de Vicente de T.G.I.).

- Resina epoxi (Scotch-Weld DP-100, 3M).

- 2-Cianoacrilato de etilo\* ("SuperGlue-3", Loctite).

- **Gases.**

- Ar (99.99 %, L-48, Praxair).

- O<sub>2</sub> (99.9 %, N-40, Air Liquide).

<sup>77</sup> Villeras, J. y Ramband, M., *Synthesis*, **1982**, 924.

<sup>#</sup> Tanto el iniciador (AIBN) como los dos monómeros de metacrilato y el protocolo de polimerización, fueron cedidos amablemente por la Dra. Rocío Cuervo (Dpto. de Química Orgánica, Facultad de CC. Químicas, UCM).

\* Determinado a partir del espectro de <sup>1</sup>H-RMN del monómero comercial en CDCl<sub>3</sub>.

- **Otros materiales y aparatos utilizados.**

- Fibra óptica bifurcada de sílice fundida (Fiber-Guide, 6.5 mm de diámetro interno en el extremo común y 4.5 mm en cada rama), con distribución interna de fibras al azar (*FL-900*).
- Fibra óptica bifurcada de vidrio (*Dolan-Jenner E-472*, 8 mm de diámetro en el extremo común, 4.5 mm de diámetro en cada una de las ramas y 1.15 m de longitud total), con distribución interna de fibras al azar (*DEMODE* y *LS50-B*).
- Fibra óptica bifurcada de 2 m de longitud total de sílice fundida (haz de 14 fibras, 7+7, de 500  $\mu\text{m}$  de diámetro cada una, distribuidas al azar). El diámetro del haz en el terminal común es de 1.5 mm (*Guided-Wave*).
- Filtros coloreados de corte (515, 530, 570 y 590 nm) y filtros coloreados de banda ancha (400 y 445 nm), ambos de 3 mm de espesor (*Oriel*).
- Filtro interferencial con máximo de transmitancia a 420 nm (10 nm de anchura a mitad de la banda, 40% de transmitancia máxima, *Corion*).
- Tubos de vidrio borosilicato de 7.5  $\times$  1 cm (*LSL, Laboratory Sales Ltd.*, Reino Unido).
- Cubetas de cuarzo de absorbancia y fluorescencia de 1 cm de paso óptico (*Hellma*).
- Cubeta de cuarzo de fluorescencia de 1 cm de paso óptico provista de cuello con llave *Rotaflo*<sup>®</sup> para desoxigenar muestras.
- Baños termostáticos
  - a) *Polyscience 9110*:  $\pm 0.25$  °C (precisión); resolución 0.01 °C.
  - b) *Polyscience 9105*:  $\pm 0.5$  °C (precisión); resolución 0.1 °C.
  - c) *Polyscience 9001*:  $\pm 0.25$  °C (precisión); resolución 0.01 °C.
  - d) *Haake D8-GH*:  $\pm 1$  °C (precisión); resolución 0.1 °C.
- Baño de ultrasonidos (*NEMU 15, Nickel electro Ltd.*, Clifton, Reino Unido).
- Estufa de vacío modelo 3608-1 (*Lab-line Instruments*), conectada a una bomba de vacío (*Edwards M-8*,  $\sim 0.1$  mbar).
- Termómetro digital (modelo 925, *Testo*), provisto de una sonda flexible de temperatura (0602.5792); precisión  $\pm 1$  °C.

- **Equipos de medida.**

- Espectrofotómetro UV-VIS Cary-3 Bio (*Varian*).
- Espectrofluorímetro LS50-B (*Perkin-Elmer*).
- Espectrómetro de fibra óptica modelo 260 (*Guided Wave*).
- Espectrómetro para medidas de luminiscencia con resolución temporal FL-900 (*Edinburgh Instruments*).
- Dispositivo optoelectrónico para medidas de luminiscencia por detección sensible a la fase (*DEMODE*) desarrollado por la empresa TGI.

## 5.2. PROCEDIMIENTOS DE INMOVILIZACIÓN DE LOS INDICADORES LUMINISCENTES.

Para la construcción del terminal sensible de temperatura se llevó a cabo la inmovilización del indicador seleccionado en distintos soportes poliméricos. Los protocolos que se describen a continuación corresponden a los procedimientos optimizados después de ensayar distintos métodos.

- **COPOLÍMERO METACRILATO DE HIDROXIMETILO (HMMA) - METACRILATO DE METILO (MMA).**

En un vial de vidrio se disolvieron 0.23 mg de indicador en una mínima cantidad (ca. 0.1 mL) de *metacrilato de hidroximetilo* (HMMA). A continuación se añadieron 3 mL de *metacrilato de metilo* (MMA) y 0.23 mg de iniciador (*azoisobutironitrilo*, AIBN). Con la mezcla recién preparada se rellenaron los moldes (tubos de vidrio borosilicato,  $7.5 \times 1$  cm) hasta una altura aproximada de 3 cm y se introdujeron en un baño de ultrasonidos durante 10 minutos con el fin de extraer el oxígeno de los monómeros, inhibidor de la polimerización. Seguidamente, se colocaron en un estufa a 60 °C donde permanecieron 72 h, transcurridas las cuales se rompieron los moldes y se cortaron los monolitos de *poli(hidroximetil-metilmacrilato)* teñidos con el indicador para, finalmente, lijar y pulir la cara del bloque que va a estar en contacto con la fibra óptica.

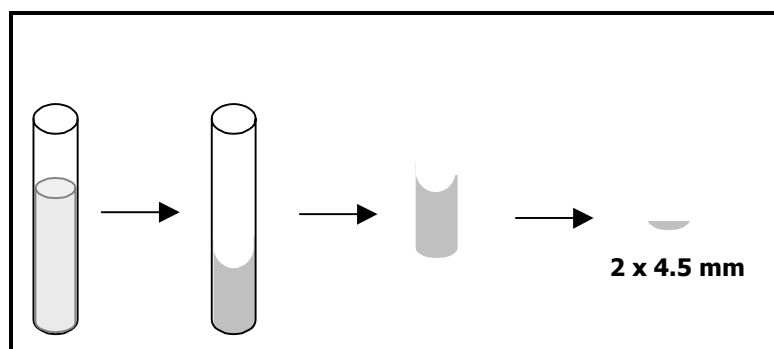
- **MATERIALES SOL-GEL.**

Se preparó una disolución etanólica del complejo de Ru(II) que se pretendía inmovilizar y se sumergió en ella, durante 72 h, un bloque material sol-gel preparado a partir de *tetraetoxisilano*, *agua* y *etanol* (1, 0.56 y 1.2 ml, respectivamente) por calentamiento progresivo (0.5 °C/min) en una estufa programable, hasta alcanzar 700 °C para completar su formación. La cantidad de indicador ocluido en el sol-gel se estableció por diferencia en la absorbancia de la disolución de indicador inicial y tras la inmovilización en el policondensado de ácido silícico.

- **RESINAS EPOXI.**

En este caso se utilizó un adhesivo comercial en el que la resina *epoxi* y el endurecedor (*2,4,6-tris(dimetilaminometil)fenol*), ambos incoloros, se encuentran separados en dos tubos. El dispositivo que suministra 3M para mezclar los dos componentes permite su salida de los contenedores en igual cantidad, fundamental para el perfecto curado de la mezcla.

Para preparar los terminales sensibles a la temperatura con este soporte se añadieron unas gotas de indicador disuelto en *etilmetilcetona* sobre el endurecedor. A continuación, tras mezclarlos convenientemente, se adicionó el componente *epoxi* del adhesivo. Finalmente, se rellenó un molde de vidrio *borosilicato* (tubo de 7.5 cm de altura × 1 cm de diámetro) con el prepolímero teñido y se dejó polimerizar a temperatura ambiente durante 72 h, transcurridas las cuales se rompieron los moldes y se siguió el mismo procedimiento de cortado y pulido de los monolitos descrito anteriormente para el copolímero de *hidroximetil-metilmetakrilato*.

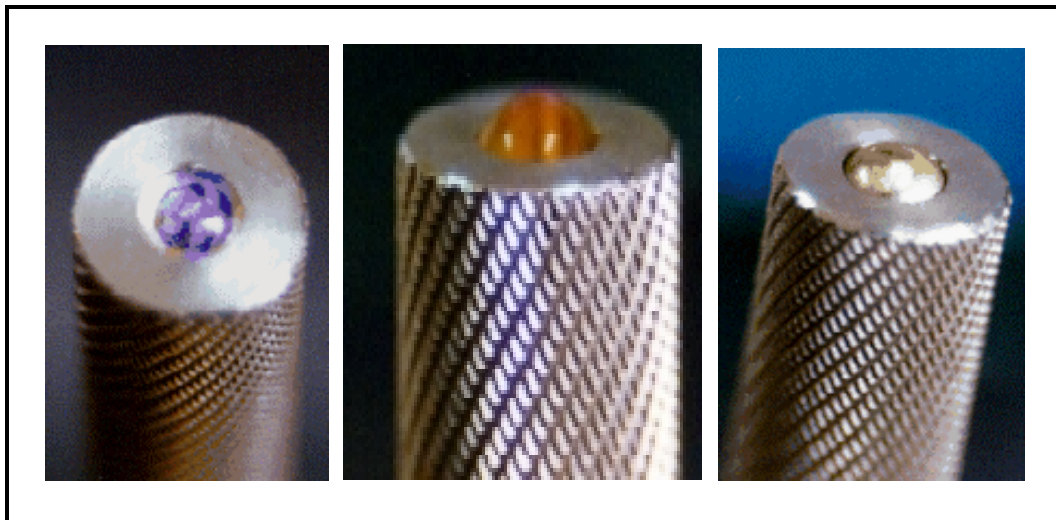


**Figura 38.** Proceso de preparación de los terminales de temperatura con cianoacrilato, metacrilato o resinas epoxi: (a) llenado de los tubos con el monómero teñido, (b) polimerización del mismo, (c) extracción del molde y (d) cortado, lijado y pulido de los monolitos formados.

- **POLI(CIANOACRILATO), PCA.**

Los terminales seleccionados finalmente para llevar a cabo la caracterización del sensor óptico de temperatura se prepararon disolviendo la cantidad adecuada del *cloruro de [(4-cloro-1,10-fenantrolina)bis(1,10-fenantrolina)]rutenio(II)* en 4 mL de *cianoacrilato de etilo* comercial. La mezcla se agitó durante unas horas hasta total disolución del indicador, sellando

correctamente el recipiente para evitar que se inicie la polimerización. Seguidamente el monómero se transvasó a los moldes de vidrio, llenándolos hasta una altura aproximada de 3 cm donde, transcurridos 3 días, se obtuvieron los monolitos de *poli(cianoacrilato)* teñidos. Estos, finalmente, fueron cortados, lijados y pulidos convenientemente para poder colocarse en el extremo de la fibra óptica (tamaño final: 2 mm de altura y un diámetro aproximado de 4.5 mm, figura 38 y 39).



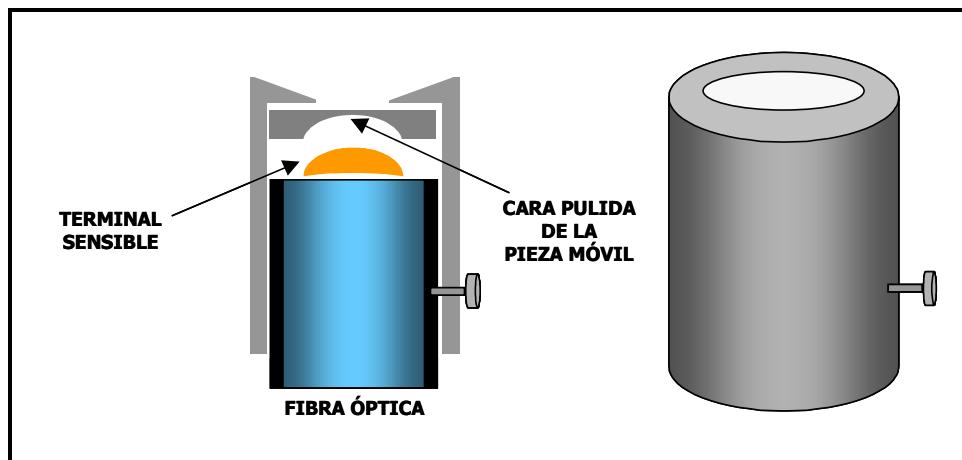
**Figura 39.** Extremo de una fibra óptica donde se ha situado el indicador [pHCl] inmovilizado en una matriz de poli(cianoacrilato). Izq.: vista superior; Centro: vista lateral; Dcha.: terminal recubierto de oro.

### 5.3. DISPOSITIVO DE MEDIDA.

Para evaluar los terminales de temperatura preparados por los procedimientos anteriormente descritos, se diseñó y fabricó un adaptador de acero inoxidable con el fin de acoplar la sonda inmovilizada a la fibra óptica. Inicialmente, se protegió el sensor de la luz externa envolviendo el terminal sensible con una película de aluminio, de modo que a pesar de no estar en contacto directo con la muestra se mantuviera el contacto térmico con la misma. En una segunda fase, se recubrió uno de los terminales sensibles con una microcapa de oro sobre grafito (CAI de Microscopía Electrónica, UCM). Sin embargo, la extremada delgadez del recubrimiento se tradujo en una mínima robustez, despegándose del sensor el recubrimiento conductor al entrar en



contacto con el agua. Finalmente, se diseñó una pieza móvil de acero inoxidable (figura 40) que acoge a la fase sensible dentro del adaptador aislándola de la luz y que permite, al mismo tiempo, intercambiar las cabezas sensoras para poder medir diferentes analitos con el mismo sistema optoelectrónico. La cavidad interna de esta pieza, en contacto con el terminal, se encuentra perfectamente pulida para reflejar al máximo la luminiscencia de la sonda, amplificando así la señal recogida por el fotomultiplicador. Ambas piezas de acero se construyeron en los Talleres de Asistencia a la Investigación de la Universidad Complutense.



**Figura 40.** Féula de acero inoxidable que recubre el terminal común de la fibra óptica bifurcada, para medidas con el terminal luminiscente sensible a la temperatura. A la izquierda se muestra un corte transversal del mismo.

## 5.4. MÉTODOS Y EQUIPOS EMPLEADOS PARA LA REALIZACIÓN DE LAS MEDIDAS.‡

### 5.4.1. SELECCIÓN DEL INDICADOR. MEDIDAS EN DISOLUCIÓN.

Con objeto de seleccionar el indicador más adecuado como sonda de temperatura, se prepararon disoluciones de los distintos complejos de Ru(II) en *carbonato de propileno* (7-16  $\mu\text{M}$ ). Con estas disoluciones, desoxigenadas mediante burbujeo con Ar durante un mínimo de 30 minutos, se llevaron a cabo determinaciones del tiempo de vida de emisión de los compuestos luminiscentes a distintas temperaturas a partir de las cinéticas de extinción de su emisión.

Las medidas de **luminiscencia con resolución temporal** se realizaron mediante la técnica de conteo de fotones individuales correlacionados con el tiempo, o **TC-SPC** (del inglés *Time-Correlated Single Photon Counting*), empleando el espectrómetro *Edinburgh Instruments FL-900*. La temperatura de las disoluciones (4-40 °C) se controló mediante un baño termostático (*Haake*), tomando lecturas reales de temperatura a partir de un termopar situado en el portacubetas del equipo. En todos los casos se seleccionó como longitud de onda de excitación 358 nm, pulsando la lámpara de descarga de nitrógeno (0.3 bar) a 40 KHz (20 KHz para tiempos de vida de emisión superiores a 5  $\mu\text{s}$ ) y utilizando un filtro de corte de 590 nm para aislar la luz procedente de la emisión de la sonda de la proveniente de la fuente de excitación.

La **caracterización espectroscópica** del indicador denominado abreviadamente [phCl] (en acetonitrilo y butironitrilo como disolventes) se realizó en un espectrofotómetro Cary 3 Bio de *Varian* y en un espectrofluorímetro LS50 B de *Perkin-Elmer* con portacubetas termostaticado (25.0 °C). Los espectros de absorción y emisión se registraron con una velocidad de barrido de 120 nm/min, tomando lecturas cada 1 nm.

La variación de la **intensidad de emisión** de este complejo con la **temperatura**, en carbonato de propileno, se llevó a cabo asimismo en el espectrofluorímetro LS50B, seleccionando como longitudes de onda de excitación y emisión 446 y 619 nm, respectivamente. La apertura de rendija empleada fue la

---

‡ Todos los equipos utilizados en las distintas etapas del desarrollo del sensor y que se mencionan en los epígrafes posteriores aparecen descritos con detalle en el capítulo *Técnicas y equipos* de esta Memoria, así como en el capítulo dedicado al dispositivo optoelectrónico desarrollado por TGI.

mínima permitida por el equipo, tanto para el canal de excitación como de emisión (5/5 nm). Durante el experimento, se recogió 1 punto cada 5 s, modificando la temperatura del portacubetas con agua procedente de un baño termostático.

#### **5.4.2. CARACTERIZACIÓN DE LOS TERMINALES SENSIBLES.**

##### **A) SELECCIÓN DEL SOPORTE IDÓNEO PARA LA SONDA.**

Se examinó la variación que experimenta con la temperatura la intensidad de luminiscencia de los terminales sensibles, preparados con los distintos polímeros descritos anteriormente. Para ello se utilizó un espectrómetro por fibra óptica **Guided-Wave 260**, en el que se colocó un filtro de banda ancha (centrado en 400 nm) y un filtro de corte (570 nm), respectivamente, en los canales de excitación y emisión.

Para establecer la validez del terminal fabricado con material sol-gel se empleó el espectrofluorímetro **LS50-B**, donde se seleccionó el máximo de absorción en el visible del indicador inmovilizado para su excitación y la longitud de onda máxima de emisión del terminal para monitorizar la variación de su intensidad con la temperatura. Este equipo posee un monocromador tanto en excitación como en emisión, por lo que no es necesario intercalar filtros coloreados.

Los diferentes bloques teñidos con indicador se situaron en el extremo común de una fibra óptica bifurcada, utilizando para ello el terminal de acero inoxidable descrito anteriormente (epígrafe 5.3) y se sumergieron, alternativamente, en dos baños termostáticos (*Polyscience*) a diferente temperatura. Uno de estos baños se llenó con una mezcla de agua-etilenglicol (1:1, v/v), con objeto de poder realizar medidas por debajo de 0 °C.

## **B) VARIACIÓN DE LAS PROPIEDADES FOTOFÍSICAS DEL INDICADOR DURANTE EL PROCESO DE POLIMERIZACIÓN DEL SOPORTE.**

El estudio de los cambios que experimentan las propiedades fofofísicas de la sonda [phCl] durante la polimerización del cianoacrilato, se realizó con el espectrofotómetro **Guided Wave-260**, registrando un espectro de luminiscencia cada hora durante diez días consecutivos. Para ello se colocó en un portacubetas termostatzado a 25.0 °C un molde de vidrio con el indicador disuelto en cianoacrilato (114 µM). La combinación de filtros empleada en este experimento fue 445 y 515 nm, respectivamente, en los canales de excitación y emisión. En este caso se eligió un filtro de corte que permitiera el paso de una pequeña fracción de luz procedente de la fuente, con objeto de obtener una referencia interna con la que corregir las posibles fluctuaciones de la lámpara a lo largo de la medida. Cada uno de los espectros se registró con una velocidad de barrido de 120 nm/min, tomando lecturas (promedio de 10 valores) cada 2 nm.

## **C) DETERMINACIÓN DE LOS TIEMPOS DE VIDA DE EMISIÓN DEL COMPLEJO EN FASE SÓLIDA.**

Se realizaron medidas de **luminiscencia con resolución n temporal** en fase sólida, de la sonda [phCl] inmovilizada en PCA (67 µM), con el fin de establecer la variación que experimenta con la temperatura el tiempo de vida de emisión del indicador inmovilizado en dicho polímero y, al mismo tiempo, poder comparar los resultados con los proporcionados por los valores de desfase obtenidos con el equipo DEMODE de luminiscencia con detección sensible a la fase. Para ello se colocó en el extremo de una fibra óptica bifurcada el terminal sensible protegido de la luz ambiente por el adaptador de acero inoxidable y se sumergió el terminal en un baño termostático con agua:etilenglicol (1:1, v/v) controlado a distintas temperaturas (Polyscience 9001). La fibra se conectó al espectrómetro **FL-900** de Edinburgh Instruments, pulsando el *LED* azul que incorpora en este caso a (450 nm) a 20 o 40 KHz, en función de las ventanas seleccionadas para el registro de las cinéticas (50 y 20 µs, respectivamente). En todas las ocasiones se colocó un filtro de corte (530 nm) para evitar la recolección de luz procedente de la lámpara.

#### **D) RESPUESTA DEL SENSOR DE TEMPERATURA. INTENSIDAD DE EMISIÓN.**

Antes de proceder a la caracterización analítica de los distintos parámetros de interés con el optodo desarrollado, se llevaron a cabo medidas preliminares registrando en el espectrofotómetro **Guided-Wave 260** los cambios provocados por la temperatura en la intensidad de luminiscencia del complejo. Para ello, los terminales sensibles se colocaron en el extremo de una fibra óptica bifurcada adaptada al equipo y se sumergieron, alternativamente, en dos baños termostáticos a distintas temperaturas. En esta ocasión se interpuso entre la fuente de luz y la sonda un filtro coloreado de banda ancha centrado a 400 nm.

Manteniendo el mismo dispositivo de medida, se realizó un estudio del efecto de la concentración de indicador inmovilizado en el polímero sobre la respuesta del optodo. Para ello se registraron espectros de emisión a 0 y 40 °C con terminales sensibles preparados disolviendo distintas cantidades del complejo en el *cianoacrilato* de partida.

#### **E) VALIDACIÓN DEL OPTODO LUMINISCENTE POR DETECCIÓN SENSIBLE A LA FASE.**

Finalmente, la caracterización analítica del sensor de fibra óptica se llevó a cabo por **detección sensible a la fase** en el **dispositivo optoelectrónico** fabricado por **TGI (DEMODE)**. Para ello, se conectó el adaptador de acero inoxidable descrito anteriormente, provisto del terminal sensible, a una fibra óptica bifurcada (*Dolan-Jenner E-472*). Todas las medidas de luminiscencia realizadas con este equipo se llevaron a cabo empleando un filtro interferencial de 420 nm en el canal de excitación y un filtro de corte de 590 nm en la emisión.

#### **• FRECUENCIA ÓPTIMA DE MODULACIÓN DEL LED DE EXCITACIÓN.**

Con un mismo terminal sensible se determinó el desfase inducido por los cambios de temperatura en la luminiscencia del indicador, modulando la fuente de luz a distintas frecuencias. Para ello, se sometió el sensor a ciclos de temperatura controlada, introduciendo la fibra óptica sucesivamente en dos baños ajustados a 0.0 y 40.0 °C, respectivamente (*Polyscience*). Para cada una de las frecuencias seleccionadas se realizaron 3 ciclos de variación de la temperatura.

- **EFFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE INDICADOR EN EL SOPORTE. REPETIBILIDAD, REPRODUCIBILIDAD Y TIEMPO DE RESPUESTA.**

Se prepararon distintos terminales sensibles a la temperatura disolviendo en el monómero inicial cantidades diversas del complejo [phCl]. A partir de la disolución madre de cianoacrilato teñido se obtuvieron seis terminales para cada una de las concentraciones. Tras el correspondiente curado, cortado y pulido de los mismos, se realizaron con tres terminales de cada lote ciclos de temperatura 0-40 °C, recogiendo los cambios producidos en la luminiscencia de cada sensor por *detección sensible a la fase*. En este estudio el diodo de excitación se moduló en todos los casos a 70 KHz, frecuencia óptima previamente determinada (apartado 4.5.2. del capítulo dedicado a los *Resultados y Discusión* de este optodo).

- **EFFECTO DEL OXÍGENO DISUELTO SOBRE LA RESPUESTA DEL SENSOR A LA TEMPERATURA.**

Para comprobar que el oxígeno molecular presente en las aguas no constituye una fuente de interferencia en el sistema de medida con el optodo de temperatura desarrollado, se sumergió el terminal sensible (obtenido a partir de una disolución 67  $\mu\text{M}$ ), introducido en el adaptador de acero, en agua termostatzada y equilibrada al aire ( $\sim 21\% \text{ O}_2$ ), sobre la que se burbujeó más tarde Ar durante una hora, manteniendo siempre constante la temperatura del agua con un baño termostático (*Haake*). La fuente de luz del equipo DEMODE se moduló a 70 KHz.

- **TIEMPO DE VIDA APARENTE DE LA Sonda INMOVILIZADA.**

Se sometieron dos terminales sensibles del mismo lote (obtenidos a partir de disoluciones 67  $\mu\text{M}$ ) a ciclos de temperatura en el intervalo comprendido entre 80 y -30°C, recogiendo el desfase de la sonda en el prototipo DEMODE con el *led* azul modulado a 70 KHz. Para ello se sumergieron ambos terminales en sendos baños termostáticos (Polyscience,  $\pm 0.25 \text{ }^\circ\text{C}$ ), uno de los cuales se llenó con una mezcla agua/etilenglicol (1:1 v/v) para evitar la congelación del fluido refrigerante.

## 6. CONCLUSIONES (*optodo de temperatura*).

A continuación se resumen, a modo de conclusiones, los principales resultados obtenidos en el desarrollo del nuevo sensor de fibra óptica para la medida de la temperatura.

- Se ha estudiado la variación de la luminiscencia de cinco complejos de Ru(II) con la temperatura en disoluciones de carbonato de propileno desoxigenadas. A partir de este estudio se seleccionó como indicador óptimo para constituir la fase sensora del optodo de temperatura el complejo **[(4-cloro-1,10-fenantrolina)bis(1,10-fenantrolina)]rutenio(II)**, por exhibir la mayor termoestabilidad y sensibilidad hacia este parámetro físico de cuantos se estudiaron.
- Tras el ensayo de diversos **soportes** para inmovilizar el indicador (copolímero hidroximetil-metilmetacrilato, poli(cianoacrilato), resinas epoxi y policondensados de ácido silícico de tipo sol-gel), se eligió el **cianoacrilato** por conferir al complejo una mayor variación de su luminiscencia con la temperatura, así como un menor tiempo de respuesta y reproducibilidad en los ciclos de medida, debido a su mayor conductividad térmica. Además, este polímero es el más conveniente por la facilidad en la manufactura de los terminales sensibles e impermeabilidad al oxígeno interferente.
- Se ha optimizado un procedimiento de **fabricación** de los terminales ópticos, que comprende la disolución de la sonda en el monómero, la polimerización del mismo a temperatura ambiente, la extracción del polímero del molde, el cortado del bloque de cianoacrilato teñido y el pulido de la cara que se situará en contacto con la fibra óptica para realizar las medidas.
- Se ha demostrado la utilidad del nuevo optodo luminiscente para la medida de la temperatura, tanto en **intensidad** como a través de la **cinética** y el **desfase** de la luminiscencia procedente de los terminales sensibles.
- El sensor desarrollado se ha interrogado con éxito con el prototipo DEMODE, equipo optoelectrónico fabricado por T.G.I. para realizar medidas de parámetros físico-químicos por luminiscencia con **detección sensible a la fase**, utilizando indicadores pertenecientes a la familia de los complejos poliazaheterocíclicos quelatantes de Ru (II).

- La **caracterización analítica** y **validación del sensor** han permitido determinar la **frecuencia óptima** de modulación de la fuente de excitación (70 KHz), así como la influencia de la **concentración** de la sonda en los terminales sensibles, la **reproducibilidad** en la fabricación de los mismos y la **precisión** en las medidas. De dicho estudio se desprende que este último parámetro depende fundamentalmente del procesado de datos que realiza el equipo, consiguiéndose mejoras significativas en la relación señal/ruido medida en detrimento del tiempo de respuesta del sensor. La sensibilidad del optodo determinada para las condiciones de medida del equipo en el momento de la evaluación del sensor fue de 0.16 °C, inferior a la precisión de los baños termostáticos utilizados para controlar la temperatura. La respuesta intrínseca del sensor es prácticamente instantánea, aunque el tiempo final de respuesta en fase ( $t_{90}$ ) puede alcanzar valores de hasta 3 minutos, debido al promediado que realiza el integrador del prototipo optoelectrónico.
- Se ha demostrado que el **oxígeno** disuelto no interfiere en las medidas del optodo de temperatura desarrollado.
- El sensor presenta una **respuesta lineal** en el intervalo 0-40 °C, facilitando así su calibrado.
- El indicador luminiscente seleccionado ha resultado ser útil también para el seguimiento del **curado de adhesivos** y otras resinas poliméricas.



## 1. INTRODUCCIÓN.

El pH es un parámetro químico cuyo control, en ocasiones de forma rápida, estricta y en continuo, es fundamental en muchos procesos de la industria química, farmacéutica y alimentaria, así como en medicina y en medioambiente. En la mayoría de estos sectores, la medida del pH se lleva a cabo utilizando el tradicional **electrodo de vidrio**, donde la lectura del pH se produce como resultado del intercambio de iones hidrógeno que tiene lugar entre la muestra y la capa de gel hidratado que recubre las superficies interna y externa del vidrio. Como consecuencia de este intercambio, se genera una diferencia de potencial entre ambas superficies, proporcional a la diferencia de pH que existe entre la disolución saturada de cloruro potásico que rellena el electrodo y la muestra.

A pesar de que el electrodo de vidrio ofrece medidas rápidas, fiables y precisas, no siempre es factible la utilización de este método para la determinación del pH. Algunos de los inconvenientes que presenta este sistema de medida son:<sup>78</sup>

- En medicina, el **tamaño** de estos electrodos, junto con la **rigidez** y **fragilidad** de su estructura, impiden su utilización en procedimientos invasivos.
- La presencia de **disolventes orgánicos** o **sólidos en suspensión** dificulta la utilización del electrodo de pH convencional en plantas depuradoras o en vertidos industriales. Por otro lado, algunos efluentes contienen **sulfuros**, los cuales reaccionan con los iones  $Ag^+$  que contiene el electrodo de referencia, formando sulfuro de plata y bloqueando la membrana de vidrio (*black death*), con la consiguiente deriva de la medida.
- La membrana de vidrio a través de la cual permean los iones hidrógeno de la disolución no puede exponerse a aquellas muestras que contienen **ácido fluorhídrico**, presente en algunos procesos industriales (ej. industria del vidrio).
- Las **proteínas, grasas, azúcares** o **determinados tampones** existentes en alimentos o muestras biológicas pueden complejarse con los iones  $Ag^+$  del electrodo bloqueando las uniones líquidas.

---

<sup>78</sup> a) Narayanan, B., Raghuraman, S. y Seow, J., *Int. Environ. Tech.*, **1998**, 8, 36. b) Armit, C., *Int. Environ. Tech.*, **1997**, 7, 24.

- Los **ambientes corrosivos** impiden la utilización de este sistema de medida, al deteriorar los cables de unión controlador-electrodo.
- La solubilidad de los electrolitos que rellenan el electrodo de medida y el de referencia depende fuertemente de la **temperatura**, pudiéndose producir la precipitación de estas sales en determinadas condiciones.
- Finalmente, la principal fuente de error de los electrodos de vidrio en el control de procesos es el **ruido electromagnético ambiental** provocado por la presencia de campos electromagnéticos externos en el lugar de medida. La puesta en marcha de un motor o la simple agitación mecánica o magnética de un reactor son algunos de los factores que pueden provocar fluctuaciones importantes en la lectura del pH.

Algunos de estos inconvenientes se han superado en la actualidad con el desarrollo de sensores de pH basados en transistores con efecto campo (**ISFET**), en los que el vidrio se sustituye por un sustrato de semiconductor de silicio con dos contactos eléctricos, entre los que se sitúa un aislante eléctrico del silicio. Los iones hidrógeno cerca de la superficie de este aislante producen un voltaje entre el aislante y el conductor, proporcional a la concentración relativa de iones hidrógeno presentes en la muestra.<sup>79</sup>

## 2. FUNDAMENTO Y ASPECTOS GENERALES DEL pH.<sup>3</sup>

La acidez de una disolución (pH) se puede expresar en función de la *actividad* de los iones hidrógeno ( $a_{H^+}$ ) presentes en ella. Matemáticamente, el pH se define como el logaritmo negativo de dicha actividad:<sup>80a</sup>

$$\text{pH} = -\log a_{H^+} \quad (20)$$

La actividad y la concentración están relacionadas (ec. 21) a través del denominado *coeficiente de actividad* ( $\gamma_{H^+}$ ), función de la fuerza iónica ( $I$ ) y de la temperatura. En disoluciones muy diluidas este coeficiente se aproxima a la unidad, siendo válida entonces la ecuación 22:

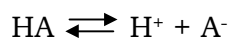
---

<sup>79</sup> Catrall, R., W., *Chemical Sensors*, Oxford. Univ. Press, Oxford (Reino Unido), 1997; p. 22.

$$\alpha_{\text{H}^+} = \gamma_{\text{H}^+} [\text{H}^+] \quad (21)$$

$$\text{pH} \approx -\log[\text{H}^+] \quad (22)$$

De acuerdo con la definición de Brønsted-Lowry, los ácidos y bases débiles se encuentran en equilibrio en disolución. Dicho equilibrio está caracterizado por la constante de acidez  $K_a$  característica de cada **indicador** ácido-base:



$$K_a = \frac{[\text{A}^-] \cdot [\text{H}^+]}{[\text{HA}]} \quad (23)$$

$$\text{pH} = \text{p}K_a + \log \frac{[\text{A}^-]}{[\text{HA}]} \quad (24)$$

La diferencia fundamental entre los métodos potenciométricos para la medida del pH y los métodos ópticos estriba en que los primeros miden **actividad** mientras que los segundos se basan en la **concentración** de la/s especie/s presentes en el medio responsable de las propiedades ópticas medidas.<sup>81</sup> Por este motivo, en la mayoría de las publicaciones que hacen referencia a optodos de pH, se ignora el efecto de la fuerza iónica y se expresa el pH en función de la concentración de la especie ácida y básica (ecuación 24). Esto, sin embargo, únicamente es aceptable en **disoluciones muy diluidas**, ya que en muestras reales hay que tener en cuenta los factores de actividad:

$$\text{pH} = \text{p}K_a + \log \frac{[\text{A}^-]}{[\text{HA}]} + \log \frac{\gamma_{\text{A}^-}}{\gamma_{\text{HA}}} \quad (25)$$

<sup>80</sup> a) Covington, A. K., Bates, R. G. y Darst, R. A., *Pure Appl. Chem.*, **1985**, 57, 531. b) Skoog, D. A., West, D. M., Holler, F. J., *Química Analítica*, 6ª ed., McGraw-Hill; p.142-145.

<sup>81</sup> Janata, J., *Anal. Chem.*, **1987**, 1351, 59.

## • EFECTO DE LA FUERZA IÓNICA Y LA TEMPERATURA.

La **fuerza iónica** de una disolución se define matemáticamente mediante la ecuación de Lewis y Randell:

$$I = 0.5 \sum_{i=1}^n c_i z_i^2 \quad (26)$$

donde  $n$  es el número total de iones presentes en la disolución,  $c$  es la concentración de cada ión y  $z$  su carga. El efecto de la fuerza iónica sobre el equilibrio ácido-base viene determinado por la teoría de Debye-Hückel, de aplicación en disoluciones diluidas (con  $I < 0.1 \text{ mol dm}^{-3}$ ):<sup>80b</sup>

$$\log \gamma_i = -\frac{Az_i^2 I^{1/2}}{1 + BdI^{1/2}} + CI \quad (27)$$

en donde,  $A$  y  $B$  son constantes que varían con la temperatura y el disolvente,  $C$  es un parámetro empírico y  $d$  es el tamaño medio de los iones. La variación que experimenta el  $pK_a$  con el aumento de la fuerza iónica del medio no es igual en todos los indicadores ácido-base. Así, por ejemplo, mientras el *rojo de metilo* aumenta su  $pK_a$  únicamente en 0.1 unidades de pH al incrementar 300 veces el valor de la fuerza iónica, el *rojo fenol* disminuye su  $pK_a$  en 1 unidad.<sup>82</sup>

Del mismo modo, la influencia de la **temperatura** sobre la constante de acidez de una disolución puede expresarse a partir de la ecuación 28:<sup>83</sup>

$$pK_a = \frac{A}{T} + B + C \log T \quad (28)$$

siendo en este caso  $A$ ,  $B$  y  $C$  parámetros que pueden obtenerse a partir de los valores de entalpía, entropía y capacidad calorífica del sistema. En general, el cambio que se observa en el  $pK_a$  para un aumento de la temperatura de la disolución de 5 °C es +0.2 unidades de pH.<sup>82</sup>

<sup>82</sup> Edmonds, T. E., Flatters, N. J., Jones, C. F., y Miller, J. N., *Talanta*, **1988**, 35, 103.

<sup>83</sup> a) Ramette, R., Culberson, C. H. y Bates, R. H., *Anal. Chem.*, **1977**, 49, 867. b) Robert-Baldo, G. L., Morris, M. J., y Byrne, R. H., *Anal. Chem.*, **1985**, 57, 2564.

### 3. SENSORES ÓPTICOS DE pH.

Los optodos de pH, como ya se ha indicado anteriormente, se diferencian básicamente del tradicional electrodo de vidrio en que miden concentración de especies ácida o básica, en lugar de actividades. Estos sistemas se basan en los cambios que se producen en las propiedades ópticas de un indicador en función del pH del medio.

A pesar de que el cambio que experimentan las propiedades ópticas de los indicadores de pH en disolución es instantáneo, la medida de este parámetro empleando optodos en los que el compuesto se encuentra soportado en una matriz polimérica suele presentar **tiempos de respuesta** mayores que los proporcionados por el electrodo de vidrio, debido a la transferencia de masa que supone el acceso de los iones hidrógeno desde la disolución de medida hasta el indicador. Las **interferencias** producidas por la **luz ambiente**, el **lavado** o **degradación** de la sonda o la **influencia de la fuerza iónica** son otros inconvenientes de los sensores ópticos de pH. A pesar de que en muchas situaciones estos optodos no pueden competir con el actualmente bien establecido electrodo de vidrio, sí pueden llegar a ser de gran utilidad en todos aquellos casos, enumerados anteriormente, donde los métodos potenciométricos están especialmente desaconsejados. Por otra parte, los sensores ópticos de pH no sólo se emplean para determinar la concentraciones de iones hidrógeno, sino que pueden utilizarse también como transductores en sensores de CO<sub>2</sub>,<sup>84</sup> amoníaco<sup>85</sup> y en algunos biosensores enzimáticos.<sup>86</sup>

#### 3.1. SOPORTES Y TIPOS DE UNIÓN.

En sus orígenes, los indicadores de pH se añadían directamente a la disolución de medida o bien se retenían sobre tiras indicadoras, las cuales sufrían frecuentemente el lavado de la sonda. Los primeros indicadores colorimétricos unidos covalentemente a un soporte (celulosa) aparecen con la comercialización del conocido *papel pH* (Merck, 1970).

<sup>84</sup> Orellana, G. y Moreno-Bondi, M. C., *Sensor Óptico, Patente Española ES 2 023 593* (nº sol. 9002740, 1990). b) Orellana, G., Moreno-Bondi, M. C., Segovia, E. y Marazuela, M. D., *Anal. Chem.*, **1992**, 64, 2210.

<sup>85</sup> West, S. J., Ozawa, S., Seiler, K., Tan, S. S. y Simon, W., *Anal. Chem.*, **1992**, 64, 533.

<sup>86</sup> Navas, A. y Ramos, M. C., *Sens. Actuators B*, **1997**, 38, 426.

La elección del soporte más adecuado constituye una de las claves fundamentales en la construcción de cualquier optodo. La función de la matriz que soporta al indicador es, básicamente, proporcionar robustez al sensor, pero influye directamente sobre la respuesta de éste. En particular, los indicadores de pH ven en muchas ocasiones modificado su  $pK_a$  con respecto al que exhiben en disolución al ser inmovilizados en un soporte polimérico (figura 45, epígrafe 3.3.), ya que éste puede dificultar o facilitar el acceso de los iones hidroxilo o de los protones hasta la sonda.<sup>87,88</sup> De modo general, la unión soporte-indicador puede ser:

- **Unión covalente.** La formación de un enlace covalente entre el soporte y el indicador sensible al pH es la forma más adecuada de evitar el lavado de la sonda. Sin embargo, este anclaje implica la presencia de grupos funcionales adecuados tanto en el polímero inmovilizador como en el indicador, por lo que no siempre es factible. Algunos de los soportes utilizados para unir covalentemente un indicador de pH son el *vidrio de poro controlado (CPG)*, las *celulosas modificadas* o las *acrilamidas*, que pueden ser copolimerizadas con la sonda molecular.
- **Unión electrostática.** Válida únicamente cuando ambas especies, ácida y básica, están cargadas. Este tipo de inmovilización que, de manera general, se basa en la utilización de *resinas* o *membranas de intercambio iónico* como soporte, presenta el gran inconveniente de que el indicador puede ser arrastrado por otras especies cargadas de la muestra.
- **Adsorción química.** En este caso la sonda queda retenida en el polímero gracias a las interacciones hidrofóbicas que se establecen entre el indicador y el soporte. Un ejemplo de este tipo de unión son los *copolímeros de estireno-divinilbenceno (Amberlitas XAD)*, resinas no polares utilizadas frecuentemente para adsorber indicadores cuando no se puede recurrir a los métodos anteriormente descritos. Como en cualquier tipo de unión no covalente, el indicador es susceptible de lavado en determinadas condiciones.

---

<sup>87</sup> Bacci, M., Baldini, F. y Scheggi, A. M., *Anal. Chim. Acta*, **1988**, 207, 343.

• **Atrapamiento.** En la actualidad, se ha popularizado la oclusión de los indicadores de pH empleados en la construcción de optodos en el interior de materiales *sol-gel*, descritos en anteriores apartados de esta Memoria (2.5.2., *Antecedentes generales*). Este sistema presenta como principales inconvenientes el control del tamaño de poro, suficientemente grande para permitir la entrada del analito pero sin que se produzca el lavado de la sonda, así como la baja reproducibilidad en la fabricación de los terminales. El atrapamiento de un indicador conlleva en algunas ocasiones la presencia en el soporte de una sustancia (*carrier* o *transportador*) encargada de introducir el analito en el soporte. Tal es el caso de las membranas plastificadas del *poli(cloruro de vinilo)*, PVC, que por su marcado carácter hidrofóbico requieren un transportador de protones, generalmente una *sal de amonio cuaternaria*.

### 3.2. CLASIFICACIÓN DE LOS OPTODOS DE pH.

En los sensores ópticos de pH, las formas ácida y básica del indicador poseen propiedades espectroscópicas diferentes, de modo que la señal detectada puede correlacionarse directamente con el pH de la muestra. En función de la propiedad que se vea modificada, estos optodos pueden clasificarse en:

#### 3.2.1. ABSORBANCIA/REFLECTANCIA.

Existen multitud de indicadores colorimétricos comerciales. La elección del más adecuado para constituir la fase sensible del sensor, depende del intervalo de pH objetivo de las medidas. En general, cada sonda es aplicable en el intervalo correspondiente a su  $pK_a \pm 1$  unidad de pH (ampliable a  $\pm 2$  perdiendo precisión en la medida).

El primer sensor de fibra óptica para pH descrito en la bibliografía se basa en los cambios que experimenta el espectro de absorción de un indicador, el **rojo fenol** (figura 41), inmovilizado en microesferas de poliacrilamida envueltas, junto a esferas de poliestireno dispersoras de luz, en una membrana de diálisis de

---

<sup>88</sup> a) Chan, C.-M., Fung, C.-S., Wong, K.-Y. y Lo, W., *Analyst*, **1998**, 123, 1843. b) Chan, C.-M., Lo, W. y Wong, K.-Y.,

celulosa.<sup>89</sup> Este optodo de pH, aplicable en el intervalo fisiológico, ha sido rediseñado posteriormente a modo de aguja hipodérmica<sup>90</sup> y evaluado en medidas *in vivo*.<sup>91</sup> Asimismo, la sustitución del *rojo fenol* por una combinación de dos indicadores, el **púrpura de bromocresol** y el **azul de bromofenol** (figura 41) ha permitido ampliar el intervalo útil de medida de este sensor para poder aplicarlo en determinaciones *in vivo* del pH de jugos gástricos.<sup>92</sup> Con el mismo objetivo, Baldini et al. emplean como pareja de indicadores el **azul de bromotimol** y el **azul de timol**, sustituyendo el gel de *poliacrilamida* por *CPG*, al que unen covalentemente los indicadores para después inmovilizarlo sobre una fibra óptica.<sup>93</sup>

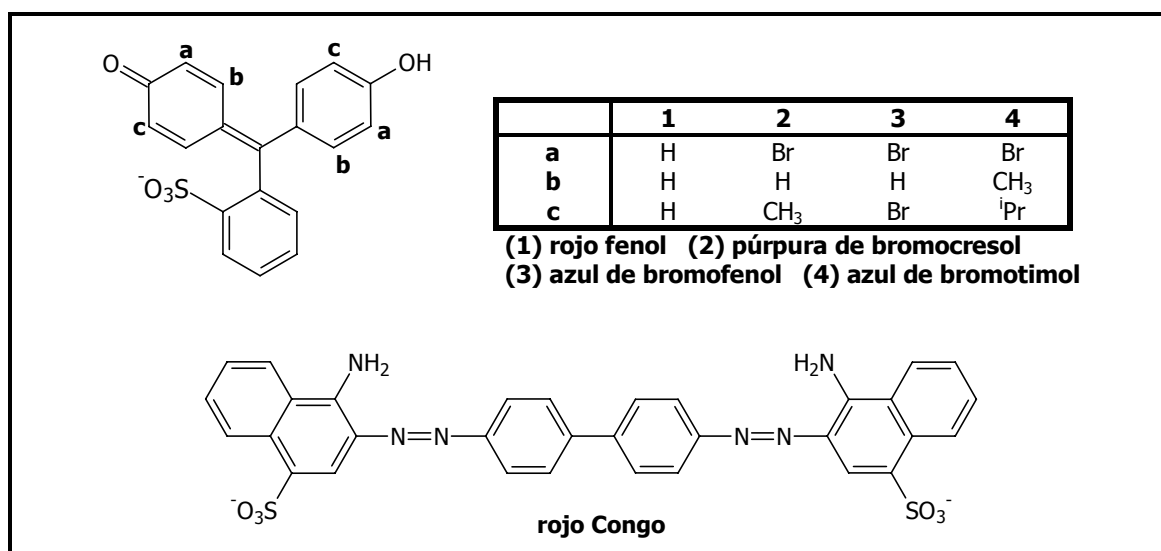


Figura 41. Indicadores coloriméricos cuyas propiedades ácido-base constituyen el fundamento de algunos sensores ópticos de pH descritos en la bibliografía.<sup>89-93</sup>

*Biosen. Bioelectron.*, **2000**, 15, 7.

<sup>89</sup> Goldstein, S. R. y Peterson, J. I., *Adv. Bioeng.*, **1977**, 81, 1977.

<sup>90</sup> Markle, D. R., McGuire, D. A., Goldstein, S. R., Petterson, R. E. y Watson, R. M., *Am. Soc. Mech. Eng.*, **1981**; p. 123.

<sup>91</sup> a) Tait, G. A., Young, R. B., Wilson, G. J., Steward, D. J. y MacGregor, D. C., *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **1984**, 15, H232.

<sup>92</sup> Netto, E. J., Peterson, J. I., McShane, M. y Hampshire, V., *Sens. Actuators B*, **1995**, 29, 157.

<sup>93</sup> Baldini, F., Bechi, P., Bracci, S., Cosi, F. y Pucciani, F., *Sens. Actuators B*, **1995**, 29, 164.



La matriz elegida como soporte para cualquier sonda molecular debe idealmente ser permeable al analito e impermeable a las posibles interferencias del método, además de poseer en su estructura los grupos funcionales adecuados para el anclaje del indicador. Así, Hisamoto et al. describen un sensor de pH para medidas en flujo basado en la inmovilización covalente de indicadores colorimétricos con grupos amino, como el **rojo Congo** o el **azul Nilo**, a un soporte con grupos carboxilo formado a partir de la copolimerización de *metacrilato de 2-hidroxietilo (HEMA)* y *ácido acrílico (AA)*. Los autores utilizan como agente acoplador el *hidrocloruro de 1-etil-3-[3-(dimetilamino)propil]carbodiimida*.<sup>94</sup> Otro ejemplo de terminal sensible de pH con unión covalente es el que utiliza la sonda **4-(4'-hidroxiacetilsulfo-2'-nitrofenilazo)-1-naftol** unida a acetato de celulosa, ambos soportados sobre una delgada película de poliéster.<sup>95</sup>

A pesar de que la unión covalente soporte-indicador es la más adecuada para cualquier tipo de sensor, el atrapamiento de la sonda en policondensados de ácido silícico (sol-gel) se utiliza cada vez más en la construcción de optodos. Los problemas derivados de la baja reproducibilidad de los terminales se subsanan en ocasiones fabricando el terminal a partir de preparados comerciales (ej. *Liquicoat Si ZLI-2132, Merck*).<sup>96</sup>

Igarashi et al. basan su optodo, aplicable para valores de pH comprendidos entre 2.5 y 4.5, en la unión electrostática de la  **$\alpha,\beta,\gamma,\delta$ -tetrakis(4-trimetilamino fenil)porfirina** sobre una cubeta de poliestireno tratada con ácido sulfúrico (figura 42).<sup>97</sup> Asimismo, el **rojo cresol** adsorbido en una resina de intercambio iónico (*Dowex 1-X10*) recubierta de *poli(tetrafluoroetileno)*, *PTFE*, se ha empleado para la determinación del punto de equivalencia en titulaciones ácido-base.<sup>98</sup> Por otra parte, la adsorción de distintos indicadores colorimétricos sobre *Amberlita* (XAD-2 o XAD-4) ha permitido la fabricación de sensores de fibra óptica para el control de pH en agua de mar<sup>99</sup> y en procesos industriales.<sup>100</sup>

<sup>94</sup> Hisamoto, H., Tsubuku, M., Enomoto, T., Watanabe, K., Kawaguchi, H., Koike, Y. y Suzuki, K., *Anal. Chem.*, **1996**, 68, 3871.

<sup>95</sup> Holobar, A., Benes, R., Weigl, B. H., O'leary, P., Raspor, P. y Wolfbeis, O. S., *Anal. Meth. Inst.*, **1995**, 2, 92.

<sup>96</sup> MacCraith, B. D., McDonagh, C. M., O'Keeffe, G., McEvoy, A. K., Butler, T. y Sheridan, F. R., *Sens. Actuators B*, **1995**, 29, 51.

<sup>97</sup> Igarashi, S., Kuwae, K. y Yotsuyanagi, T., *Anal. Sci.*, **1994**, 10, 821.

<sup>98</sup> a) Moreno, M. C., Martínez, A., Millán, P. y Cámara, C., *J. Molec. Struct.*, **1986**, 143, 553. b) Moreno, M. C., Jiménez, M., Pérez-Conde, C., y Cámara, C., *Anal. Chim. Acta*, **1990**, 230, 35.

<sup>99</sup> Monici, M., Boniforti, R., Buzzigoli, G., DeRossi, D. y Nannini, A., *Proc. SPIE*, **1987**, 798, 294.

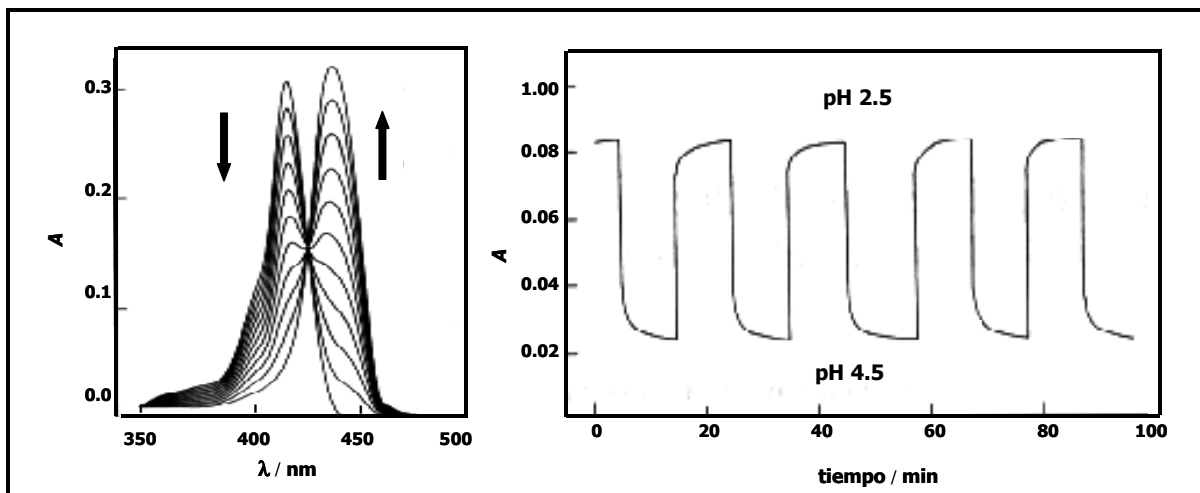


Figura 42. Izq.: Espectros de absorción de la  $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ -tetrakis(4-trimetilaminofenil)porfirina inmovilizada en una cubeta de poliestireno sulfonado, a distintos valores de pH. La flecha indica el cambio que se produce al pasar de pH 6.5 a 1.0. Dcha.: Seguimiento en continuo de los cambios que experimenta la absorbancia de la sonda a 440 nm, cuando el pH del medio se mantiene entre 2.5 y 4.5.<sup>97</sup>

### 3.2.2. FLUORESCENCIA.

A pesar de que la medida del pH con sensores colorimétricos está bien establecida, la necesidad de aumentar la **sensibilidad** y **selectividad** de los métodos de medida ha introducido el uso de indicadores fluorescentes en la construcción de terminales sensibles de pH. Sin embargo, se conocen muy pocas sondas cuya fluorescencia se vea modificada con los cambios del pH. Entre ellas, las fluoróforos más utilizadas en la bibliografía son los derivados de *pireno* y de *fluoresceína*.

Las características espectroscópicas de la sal trisódica del **ácido 1-hidroxipireno-3,6,8-trisulfónico, HPTS** (figura 43), le convierten en uno de los indicadores fluorescentes más utilizados para medidas de pH: (a) presenta un gran desplazamiento de Stokes, (b) alto rendimiento cuántico de fluorescencia, (c) excitación y emisión en la región visible del espectro electromagnético y (d) un  $pK_a$  de 7.3, idóneo para medidas en el intervalo fisiológico. Este indicador se puede excitar de manera selectiva la forma ácida (405 nm) o básica (470 nm) aunque la emisión, observable a 520 nm, procede **únicamente** de la desactivación radiativa de esta última. La forma protonada no se desactiva con emisión de luz debido al

<sup>100</sup> Boisdé G., Blanc, F., y Pérez, J. J., *Talanta*, 1988, 35.

considerable aumento de acidez que experimenta en el estado excitado, lo que se traduce en una instantánea desprotonación. La relación de intensidades de emisión obtenidas a partir de la excitación de la forma ácida y básica permiten auto referenciar los sensores que utilizan este indicador, evitando las posibles fluctuaciones de los equipos de medida.

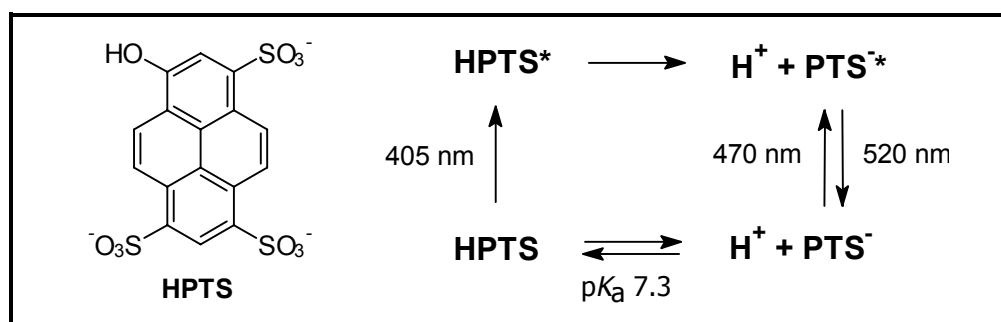


Figura 43. Estructura, parámetros espectroscópicos característicos ( $\lambda_{\text{máx}}$ ) y representación esquemática de las propiedades ácido-base del HPTS.

El HPTS se ha inmovilizado en un gran número de soportes. La presencia de los grupos sulfonato en la molécula ha permitido su unión covalente vía sulfonamida a *aminoetilcelulosa*<sup>101</sup> y *vidrio de poro controlado* (CPG),<sup>102</sup> así como la adsorción electrostática a una matriz de intercambio iónico.<sup>103</sup> Otro derivado del pireno empleado como optodo de pH es el **dietilaminometilpireno** soportado sobre un hidrogel de *poliuretano*. El sensor fabricado con este indicador realiza medidas de pH a partir de la cinética de extinción de la fluorescencia del compuesto, la cual se modifica debido a un proceso de *transferencia electrónica fotoinducida* desde el grupo amino a la estructura aromática de pireno.<sup>104</sup>

La **fluoresceína** es, junto con el HPTS, uno de los fluoróforos más empleados en la construcción de optodos de pH. Su inmovilización en una matriz de tipo sol-gel que constituye el revestimiento de una fibra óptica, ha permitido el desarrollo de un sensor intrínseco de pH.<sup>105</sup> Este indicador se utiliza mayoritariamente en forma de derivado aminado (**amino fluoresceína, AF**), ya que permite el anclaje covalente a numerosos soportes. Lobnik et al. han

<sup>101</sup> Schulman, S. G., Chen, S., Bai, F., Leiner, M. J. P., Weis, L. y Wolfbeis, O. S., *Anal. Chim. Acta*, **1995**, 304, 165.

<sup>102</sup> Offenbacher, H., Wolfbeis, O. S. y Füllinger, E., *Sens. Actuators*, **1986**, 9, 73.

<sup>103</sup> Zhujun, Z. y Seitz, W. R., *Anal. Chim. Acta*, **1984**, 160, 47.

<sup>104</sup> Draxler, S. y Lippitsch, M. E., *Sens. Actuators B*, **1995**, 29, 199.

<sup>105</sup> Browne, C. A., Tarrant, D. H., Olteanu, M. S., Mullens, J. W. y Chronister, E. L., *Anal. Chem.*, **1996**, 68, 2289.

fabricado distintos materiales sol-gel en los que estudian la respuesta al pH de la *aminofluoresceína* ocluida en su interior o anclada covalentemente, vía *isotiocianato* o *epoxi*, al sol-gel. Los autores encuentran una respuesta más rápida y con un mayor cambio en la fluorescencia del compuesto en los terminales dopados con AF, sin unión covalente.<sup>106</sup>

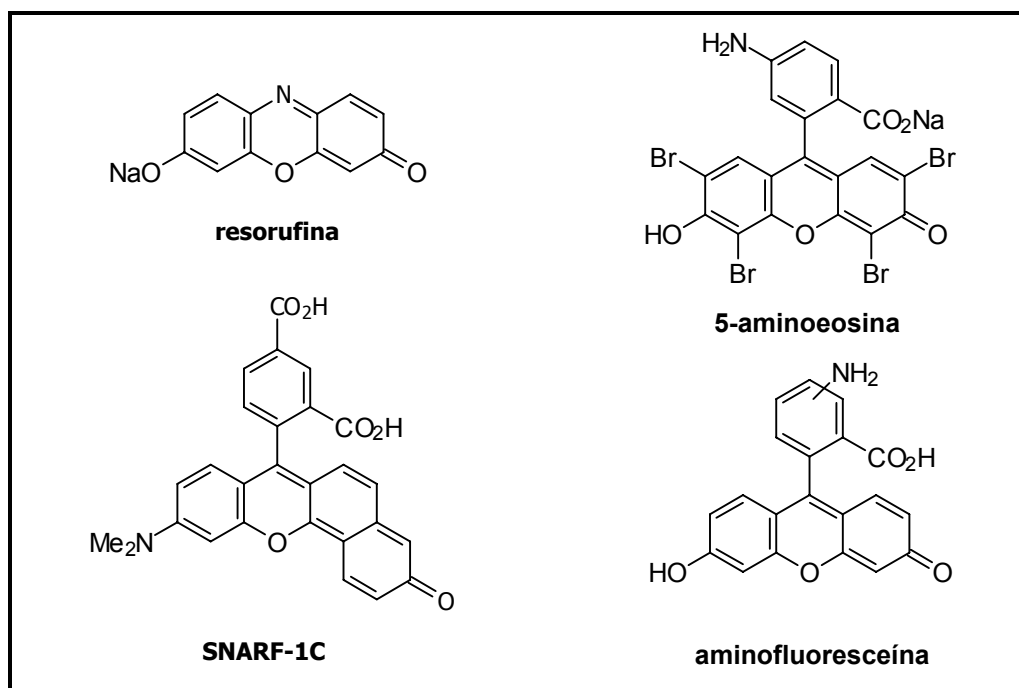


Figura 44. Estructura de varios indicadores fluorescentes empleados en optodos de pH.

Otros indicadores utilizados en optodos fluorescentes de pH son la *resorufina*,<sup>107</sup> el *ácido 7-hidroxi-4-metilcumarina-3-acético*<sup>108</sup> y la familia de las *seminaftorodaminas (SNARF)* (figura 44).<sup>109</sup>

<sup>106</sup> Lobnik, A., Oehme, I., Murkovic, I. y Wolfbeis, O., *Anal. Chim. Acta*, **1998**, 367, 159.

<sup>107</sup> Thomson, R. B. y Lakowicz, J. R., *Anal. Chem.*, **1993**, 65, 853.

<sup>108</sup> Bromberg, A., Zilberstein, J., Reismberg, S., Benori, E., Silberstein, E., Zimnavoda, J., Frishman, G. y Kritzman, A., *Sens Actuators B*, **1996**, 31, 181.

<sup>109</sup> Parker, J. W., Laksin, O., Yu, C., Lau, M.-L., Klima, S., Fisher, R., Scott, I. y Atwater, B. W., *Anal. Chem.*, **1993**, 65, 2329.

### 3.2.3. TRANSFERENCIA DE ENERGÍA RESONANTE.

En el terminal sensible de los optodos basados en *FRET* (del inglés, *fluorescence resonance energy transfer*, transferencia de energía de fluorescencia resonante) se produce una transferencia de energía de tipo culómbico no radiativa entre un luminóforo (**dador**) y un cromóforo (**aceptor**). En el caso que nos ocupa, el espectro de absorción del aceptor sufre un desplazamiento batocrómico al variar el pH de la disolución, solapando con el de emisión del dador, el cual le transfiere parte de su energía de excitación electrónica, disminuyendo su luminiscencia.<sup>14</sup>

Bambot et al. utilizan este método como base de un optodo de pH en el que inmovilizan en un soporte sol-gel un dador (**hidrazida del Rojo Texas, TRH**) y un aceptor (**azul de bromotimol, BTB**).<sup>110</sup> Esta pareja de indicadores, junto con otras combinaciones con derivados de fluoresceína (**eosina**) o indicadores colorimétricos (**rojo fenol**), se ha utilizado también en la construcción de terminales sensibles de optodos de pH basados en FRET.<sup>111,112</sup>

### 3.3. COMPLEJOS DE Ru(II) EN OPTODOS DE pH.

Los sensores ópticos que realizan medidas en **intensidad de emisión** sufren interferencias debidas a los cambios de turbidez, índice de refracción o color de la muestra, la curvatura de la fibra, así como por las fluctuaciones que se producen inevitablemente en la optoelectrónica del sistema. También es crítico en estos optodos la fotodegradación o el lavado del indicador, por lo que en general requieren una referencia interna. Los SFO luminiscentes de última generación superan estos problemas analizando la variación con el pH de la **cinética de extinción de la luminiscencia** del compuesto, o bien realizando las medidas por **detección sensible a la fase**. En este sentido, los **complejos luminiscentes de Ru(II)** presentan tiempos de vida de emisión muy superiores a los que exhiben las moléculas orgánicas fluorescentes, así como mayores desplazamientos de Stokes,

---

<sup>110</sup> Bambot, S. B., Sipior, J., Lakowicz, J. R. y Rao, G., *Sens. Actuators B*, **1994**, 22, 181.

<sup>111</sup> Lakowicz, J. R., Szmackinski, H. y Karakelle, M., *Anal. Chim. Acta*, **1993**, 272, 179.

lo que les convierte en idóneos indicadores para medidas con resolución temporal, disminuyendo los costes en la electrónica de los equipos y haciendo posible la utilización de frecuencias de modulación menores. Adicionalmente, la utilización de complejos de Ru(II) para la fabricación de optodos luminiscentes sensibles al pH permite disfrutar de toda la tecnología optoelectrónica desarrollada en los últimos años para interrogar los bien establecidos sensores de fibra óptica para la monitorización de oxígeno molecular.

En la bibliografía aparecen descritos algunos optodos de pH en los que la fase sensible está constituida por un complejo de Ru(II) cuya luminiscencia es sensible al pH. Orellana et al. fueron los primeros en proponer y demostrar la validez de los compuestos de coordinación de Ru(II) con ligandos poliazaheterocíclicos quelatantes como indicadores luminiscentes sensibles al pH.<sup>84</sup> El indicador utilizado, **[tris(2-(2-pirazinil)-1,3-tiazol)]rutenio(II)**, posee tres átomos de nitrógeno heterocíclicos no involucrados en la coordinación al centro metálico. El estado excitado emisor de dicho ion complejo supone una importante transferencia de carga intramolecular metal-ligando, particularmente hacia el anillo de pirazina fuertemente electroatractor  $\pi$ . Como resultado de ello, la basicidad del ligando complejado se incrementa casi siete órdenes de magnitud por lo que, a diferencia de lo que sucede en el estado fundamental del indicador ( $pK_a = -1.9$ ), el estado excitado es capaz de aceptar el protón procedente de ácidos de Brønsted presentes en el medio. El único requisito para que tal transferencia protónica fotoinducida se produzca, es que el ácido de Brønsted esté en concentración suficiente y tenga la fuerza necesaria para competir bimolecularmente con la desactivación unimolecular por vías radiativa y no radiativa del complejo de Ru(II) en estado electrónico excitado.

Recientemente, Price et al. han estudiado la variación de la intensidad de emisión con el pH, en el intervalo 2-6, de dos complejos de Ru(II) en los que uno de los ligandos es la **4,7-dihidroxi-1,10-fenantrolina**.<sup>113</sup> Como soporte, estos autores utilizan una matriz polimérica constituida por anillos formados a partir de cuatro unidades de metilsiloxano con óxido de polietileno como agente entrecruzante. Este ligando forma parte también de un complejo de Ru(II) inmovilizado en Nafion<sup>®</sup>, con el que Chan et al. construyen un optodo basado en cambios en la intensidad de luminiscencia del complejo con el pH.<sup>88</sup> La

---

<sup>112</sup> Jordan, D. M., David, R. W. y Milanovich, F. P., *Anal. Chem.*, **1987**, 59, 437.

naturaleza polianiónica de la matriz inmovilizadora evita las interferencias de los aniones presentes en la muestra, dificultando a la vez el acceso de los iones hidroxilo al interior de la membrana, lo que se traduce en un aumento del  $pK_a$  del indicador inmovilizado (figura 45).

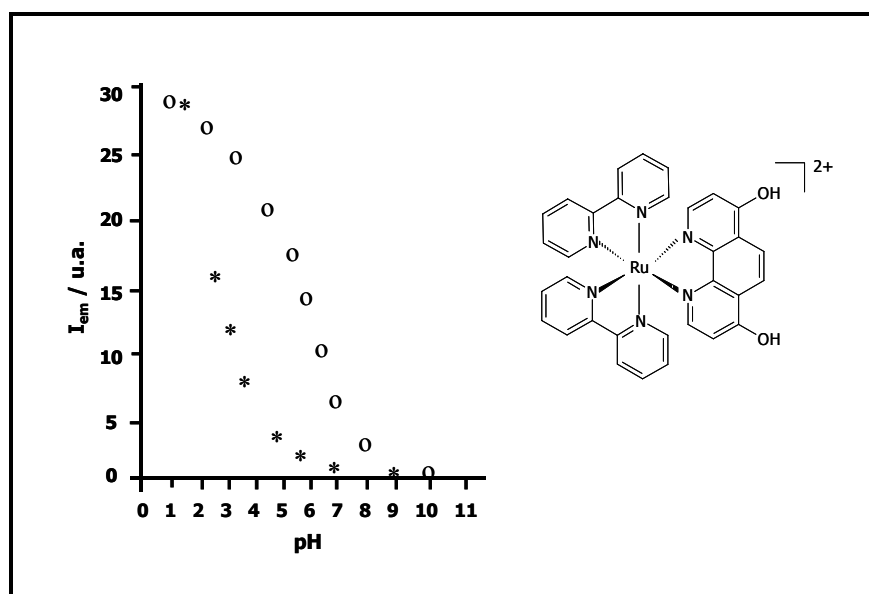
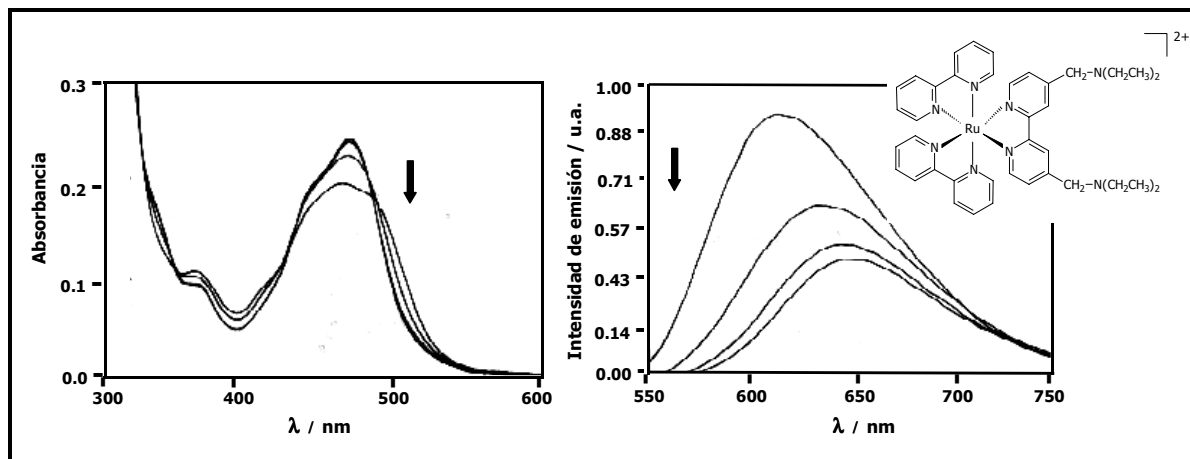


Figura 45. Variación con el pH de la intensidad de luz emitida por el complejo [bis(2,2'-bipiridina)(4,7-dihidroxi-1,10-fenantrolina)]rutenio(II) en disolución (\*) e inmovilizado en Nafion® (o).<sup>88</sup>

El único complejo de Ru(II) que se conoce hasta el momento, en el que los cambios con el pH de su luminiscencia se ha monitorizado por detección sensible a la fase, es el sintetizado y caracterizado por Murtaza et al.<sup>114</sup> En este caso, el ligando sensible al pH es la **4,4'-bis(dietilaminometil)-2,2'-bipiridina** exhibiendo el luminóforo, según los autores, un  $pK_a$  aparente de 7.5.

<sup>113</sup> Price, J. M., Xu, W., Demas, J. N. y DeGraff, B. A., *Anal. Chem.*, **1998**, 70, 265.

<sup>114</sup> Murtaza, Z., Chang, Q., Rao, G., Lin, H. y Lakowicz, J. R., *Anal. Biochem*, **1997**, 216.



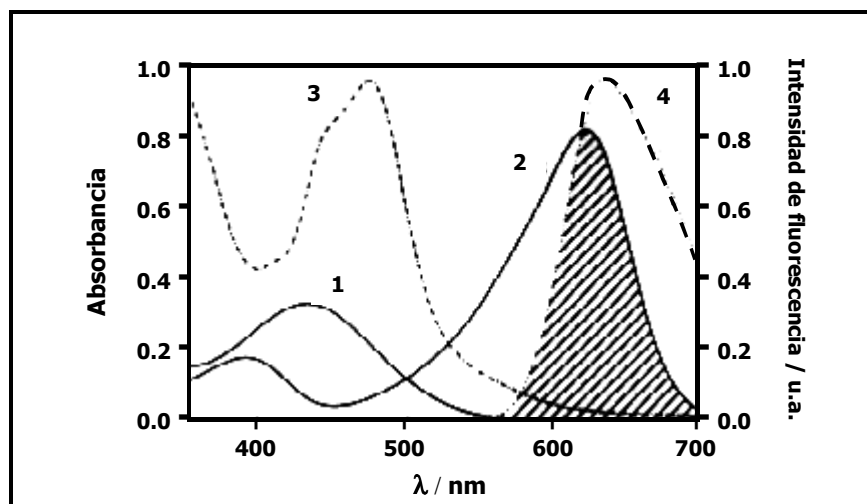
**Figura 46.** Espectros de absorción (izq.) y emisión (dcha.) del complejo [bis(2,2'-bipiridina)(4,7-bis(diethylaminometil)(2,2'-bipiridina)]rutenio(II) en disolución acuosa. La flecha indica la variación que experimentan dichos espectros con el aumento de la alcalinidad del medio.<sup>114</sup>

Lakowicz fue el primero en sugerir que los complejos de metales de transición son muy adecuados como dadores en optodos basados en transferencia de energía resonante, ya que pueden excitarse con económicos diodos emisores de luz y permiten bajas frecuencias de modulación.<sup>111</sup> Basándose en este principio, se ha desarrollado un sensor de pH en el que el par iónico constituido por el **[tris(4,4'-difenil-2,2'-bipiridina)rutenio(II)]** (dador) y el **azul de bromotimol** (aceptor), inmovilizado en un hidrogel de poliuretano, es sensible al pH en el intervalo 7-9 (figura 47)<sup>115</sup>. Los autores excitan la fase sensible con un diodo emisor azul modulado a 75 KHz y llevan a cabo las medidas de pH por *detección sensible a la fase*. Otra pareja dador-aceptor de estas características descrita recientemente en la bibliografía es la constituida por el complejo metálico **[tris(1,10-fenantrolina)rutenio(II)]** y una **sulfoftaleína**.<sup>116</sup>

<sup>115</sup> Kosch, U., Klimant, I., Werner, T. y Wolfbeis, O. S., *Anal. Chem.*, **1998**, 70, 3892.

<sup>116</sup> Kosch, U., Klimant, I. y Wolfbeis, O. S., *Fresenius J. Anal. Chem.*, **1999**, 364, 48.





**Figura 47.** Espectros de absorción de la forma ácida (1) y básica (2) del azul de bromotimol (BTB), así como del complejo homoléptico [tris(4,4'-difenil-2,2'-bipiridina)rutenio(II)] (3) en disolución acuosa. Se observa como un aumento en la alcalinidad de la disolución provoca el solapamiento de la banda de emisión del luminóforo (4) y absorción del BTB.<sup>115</sup>

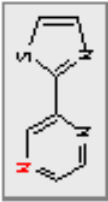
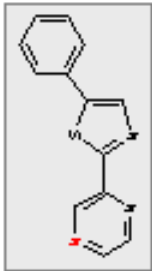
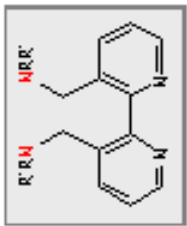
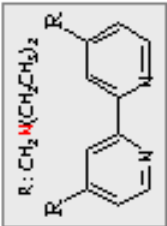
Los cortos tiempos de vida de emisión de fluoróforos comerciales, del orden de los ns, cuya sensibilidad al pH está bien establecida, obliga a utilizar elevadas frecuencias de modulación de las fuentes de excitación (~ 100 MHz) si los optodos que los incluyen se basan en métodos con resolución temporal por detección sensible a la fase. Una técnica que permite utilizar estos indicadores modulando a bajas frecuencias consiste en mezclar en el terminal sensible uno de estos fluoróforos con un luminóforo de  $\tau$  largo insensible al analito, ambos excitables y que emitan a la misma longitud de onda. En estas condiciones, la modulación y desfase de la emisión a bajas frecuencias (KHz) es proporcional a la intensidad de luz emitida por el fluoróforo sensor, de modo que se pueden llevar a cabo medidas utilizando ángulos de desfase o tiempos de vida de emisión con fluoróforos en los que, incluso, el tiempo de vida de desactivación puede ser constante con los cambios de pH, con tal de que varíe su intensidad de emisión.

Basándose en esta técnica, Lakowicz et al. desarrollan un sensor de pH en el que recubren una de las paredes de la cubeta de emisión donde realizan las medidas con **tris[2,2'-bipiridina]rutenio(II)** embebido en poli(alcohol vinílico) (PVA). Posteriormente, rellenan la cubeta con **6-carboxifluoresceína** en disolución y excitan la mezcla de luminóforos con un láser de cw- $\text{Ar}^+$  a 488 nm, modulado entre 2 y 10 MHz.<sup>13</sup> En este intervalo de frecuencias, la modulación de la emisión es equivalente a la fracción de la emisión total debida al fluoróforo de tiempo de vida corto, la cual varía con el pH. En este caso, el complejo de Ru(II)

exhibe un tiempo de vida de emisión, inmovilizado sobre PVA, de 1.18  $\mu$ s (370 ns en disolución) y el indicador de pH de 4 ns. La utilización de complejos metálicos con un  $\tau$  mayor posibilitaría la modulación de la fuente con frecuencias más bajas pero estaría condicionado, sin embargo, a la elección de un soporte para el indicador impermeable al oxígeno disuelto, ya que éste desactiva eficazmente la emisión de los luminóforos de tiempo de vida de desexcitación elevado.

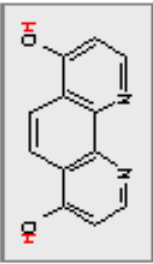
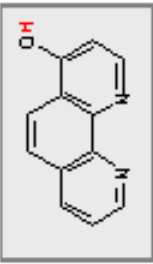
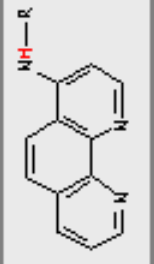
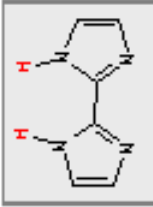
En las tablas que se recogen a continuación se resumen los sensores luminiscentes de pH descritos en la literatura que emplean complejos polipiridílicos de Ru(II), así como las principales patentes que hacen referencia a sensores ópticos para la medida del pH.

Tabla 15. Resumen de los sensores ópticos de pH que emplean complejos luminiscentes de Ru(II) descritos en la bibliografía.

Ligando sensible al pH	Complejo de Ru(II)	Principio de medida	Soporte	Intervalo de pH	Ref.
 pzth	$[\text{Ru}(\text{pzth})_2]^{2+}$ $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{pzth})]^{2+}$ (a) $[\text{Ru}(\text{pzth})(\text{tap})_2]^{2+}$ (a)	Intensidad y tiempo de vida de emisión	CM-Sephadex SP-Sephadex	1. 2.5 – 4.5 2. 1.5 – 4.5 3. 2 – 6.5	84
 ppeth	$[\text{Ru}(\text{ppeth})_2]^{2+}$	Intensidad y tiempo de vida de emisión	CM-Sephadex SP-Sephadex	2 – 5	118
 L	$[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{L})]^{2+}$ (a)	Intensidad de emisión	Ninguno	(b)	119
 deam2b	$[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{deam2b})]^{2+}$ (a) $[\text{Ru}(\text{dip})_2(\text{deam2b})]^{2+}$ (a)	Intensidad y tiempo de vida de emisión	Ninguno polisiloxano cálcico / óxido de polietileno	6.5 – 8.5 3 – 5, 8 – 10	114 120

4. a) bpy: 2,2'-bipiridina; tap: 1,4,7,8-tetrazaafenantreno; dip: 4,7-difenil-1,10-fenantrolina.  
b) R (ppeth): Me-Ph (2.4), Me-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>-OMe (2.4), Me-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>-OMe (1.9), Et (5.9, 7.8), [CH<sub>2</sub>CH(OH)]<sub>2</sub> (4.1, 8.6).

Tabla 15. (cont.)

Ligando sensible al pH	Complejo de Ru(II)	Principio de medida	Soporte	Intervalo de pH	Ref.
 dhp	$[Ru(bpv)_2(dhp)]^{2+}$ (a) $[Ru(phen)_2(dhp)]^{2+}$ (b) $[Ru(dip)_2(dhp)]^{2+}$ (a)	Intensidad y tiempo de vida de emisión	Nafion <sup>®</sup> polisiloxano cídico / óxido de polietileno	1 – 8 2 – 6	88 113
 hp	$[Ru(phen)_2(hp)]^{2+}$ (b)	Intensidad y tiempo de vida de emisión	ninguno	2 – 6	72
 hp-R	$[Ru(phen)_2(deaeap)]^{2+}$ (b) $[Ru(phen)_2(tanphen)]^{2+}$ (b) $[Ru(phen)_2(Phhp)]^{2+}$ (b)	Intensidad y tiempo de vida de emisión	ninguno	7 – 11 8 – 12 9 – 12	120
 bim	$[Ru(s2d)_2(bim)]^{2+}$ (b) $[Ru(s2b)_2(bim)]^{2+}$ (b)	Intensidad y tiempo de vida de emisión	Nylon catiónico, vidrio	4 – 7 5 – 9	84a, 120

b) phen: 1,10-ferrotrina; deaeap: 4-(4-dietilaminoetilamino)-1,10-ferrotrina; tanphen: 4-{1,5,9-triazanonil}-1,10-ferrotrina; Phhp: 4-(2-ferilindracina)-1,10-ferrotrina; s2a: 4,7-d(sulfonil)-1,10-ferrotrina; s2b: 4,4'-disulfato-2,2'-bipiridina.

Tabla 15. (cont.)

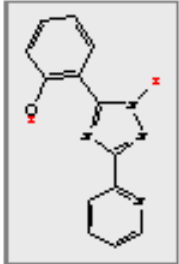
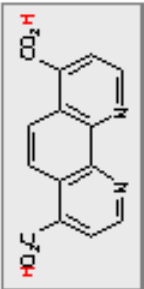
Ligando sensible al pH	Complejo de Ru(II)	Principio de medida	Soporte	Intervalo de pH	Ref.
 hPhpytz	$[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{hPhpytz})]^{2+}$ (a)	Intensidad de emisión	Sol-gel (sílice)	3 – 8	121
 dbb	$[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{dbb})]^{2+}$ (a)	Intensidad de emisión	Sol-gel (sílice)	3 – 7	121
ninguno	$\text{RuL}_3^{2+}$ , (indicadores colorimétricos) <sup>107</sup>	Transferencia de energía (Intensidad y tiempo de vida de emisión)	PVC	7 – 9	115
ninguno	$\text{RuL}_3^{2+}$ , 6-carboxyfluoresceína	Indirecto (tiempo de vida de emisión, mezcla de fluoróforos)	PVA	5 – 9	13

Tabla 16. Principales patentes que hacen referencia a sensores ópticos de pH.

No Patente	Año	Título	Inventor/es	Soporte	Indicador/es
US5942189	1999	Luminescence-optical method and sensor layer for quantitative determination of at least one chemical component of a gaseous or liquid sample	Widlbeis, O. S., Werner, T., Klimant, I., Koch, U. y Leiner, M. J. P.	PVC con un transportador de protones	Par iónico dador aceptor; transferencia de energía. Dador: complejos de Ru, Os, Ir, R.d, Pd, Pt o Re con (2,2'-bpy), (4,4'-difenil-2-2'-bpy) o phen Aceptor: cromóforo sensible al pH
US5900215	1999	Fiber optic sensor	Seifert, K. R., Lynch, L., Johnson, D. K., Kalla, J. y Fowler, W.	polímero de uretano-acrilato	HPTS, fluoresceína y sus derivados
US5853669	1998	Sensor membrane for indicating the pH of a sample, the fabrication and use thereof	Widlbeis, O. S.	PVA, celulosa, gelatina o hidrogel sobre ftalatos, policarbonatos, poli(amidas), siliconas o poli(acrilamidas) entrecruzadas	indicadores colorimétricos
US5774603	1998	Optical chemical sensor	Moore, C. P., Robert, J. C., Blue, R. G. y Stewart, G.	sol-gel de Zr/Si (sensor de onda evanescente)	azul Nil, fluoresceína, oxazina, verde de bromocresol...
US5628310	1997	Method and apparatus to perform transcutaneous analyte monitoring	Rao, G., Samacinski, H. y Lakowicz, J. R.	capilar de 1 mm de diámetro interno con los dos indicadores en disolución	CarboxiSNARF-6 y Texas Red (TRH) (transferencia de energía)
US5378492	1995	Optical fibre pH microsensor and method of manufacture	Bankert, C. S., Hahn, S. y Hu, H. K.	poli(eter) poli(isocianato)	HPTS
US5280548	1994	Emission based fiber optic sensor for pH and carbon dioxide analysis	Atwater, B. W. y Laksin, O.	poli(hidroxiethylmetacrilato), poli(vinilpirrolidona), celulosas, dextranos o polisacáridos	SNARF-1C, SNARF-1C-dex, SNARF-1C-ITC, SNARF-2C, SNARF-1C diacetato
US5273716	1993	pH optrode	Northrup, M. A. y Langry, K. C.	poli(acrilamida)	HPTS

Tabla 1B. (cont.)

Nº Patente	Año	Título	Inventor/es	Soporte	Indicador/es
US5166990	1992	Multiple optical fiber event sensor and method of manufacture	Riccielli, S. D., Sherr, T. A., Homick, R., Nelson, A., Bankert, C. S., Hui, H. K.	celulosas, hidrogel o poli(uretano)	indicadores fluorescentes
US5118405	1992	Luminescent probe complex for measuring pH and method for measuring pH	Kaneko, M., Asakura, T., Hideki, N., Shimomura, T. y Sugise, H.	Nafion, poli(estireno) sulfonado, ác. poli(metacrílico), poli(acrilamida), celulosas	Complejos de Ru(II) con ligandos bipyridina con grupos carboxílicos, sulfonato, hidroxilo, amonio o piridinio
US5308581	1992	Substance of an optical fluorescence measuring arrangement for measuring the pH of a sample and optical sensor with such an indicator substance	Lippitsch, M., Leiner, M. J. y Karpf, H.	---	luminóforos con comportamiento ácido-base en el estado excitado
US5096671	1992	Fiber optic chemical sensors incorporating electrostatic coupling	Kane, J. A. y Pinchuk, L.	DEAE-celulosas copolimerizada con sulfotilmetacrilato, hidroxietilmetacrilato y cloruro de acrilato	HPTS
US5039482	1991	Optical pH and gas concentration	Saaski, E. W., McCrae, D. A., Hartl, J. C., Lawrence, D. M. y Wolthuis, R. A.	celulosas	ácido 4-hidroxi-2-naftalenosulfónico derivatizado
US5005576	1991	Optical probe (pO <sub>2</sub> , pH, pCO <sub>2</sub> )	Gunther, M.	adhesivo de silicona	(no especificado)
ES2023593	1990	Sensor óptico	Orellana, G. y Moreno-Bondí, M. C.	---	<b>Complejos de Ru(II)</b> con ligandos poliazaheterocíclicos con átomos de N no involucrados en la coordinación o ligandos con carácter ácido-base

Table 16. (cont.)

Nº Patente	Año	Título	Inventor/es	SopORTE	Indicador/es
US4965087	1990	Method of making a sensor element for fluorescence-optical measurement	Wolfeis, O. S., Kromeis, H., y Offenbacher, H.	gel de sílice, vidrio con un adhesivo de poliuretano	indicadores fluorescentes
US4803049	1989	Hirschfeld, T., B. y Wang, F. T.	pH sensitive optrode	CPG (vía aminoaril o aminopropil silano)	fluoresceína, rodamina
US4801655	1989	Murray, R. C. y Goorsky, M. S.	Fiber optic pH sensor having low drift rate	poli(acrilamida)	rojo fenol
US4785814	1988	Kane, J.	Optical probe for measuring pH and oxygen in blood and employing a composite membrane	poli(hidroxiethylmetacrilato) y poli(acrilamida)	fluoresceína
US4682895	1987	Fiber optic probe for quantification of colorimetric reactions	Castello, D.	acetato de celulosa	indicadores colorimétricos
US4582589	1986	pH sensor	Ushizawa, N., Murakami, T., Shimomura, T. y Oyama, N.	poli(hidroxiethylmetacrilato), nitrocelulosa, acetilcelulosa, poli(carbonato)	1-aminoipirano y piridina (copolimerizados por electrooxidación)
US4548907	1985	Fluorescent fluid determination apparatus	Seitz, W. R. y Zhujun, Z.	resinas intercambio iónico	HPTS



#### 4. PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS.

En los antecedentes de este optodo se ha destacado la relevancia que ha adquirido en los últimos años la medida del pH por métodos ópticos, tanto en el área médica, como medioambiental o en procesos industriales. Por este motivo se estableció como uno de los objetivos del Proyecto en el que se incluye esta Memoria el **desarrollo de un sensor de fibra óptica sensible al pH**, que permitiera medir en el intervalo comprendido entre pH 6 y 9 sustituyendo a los métodos potenciométricos convencionales.

Para llevar a cabo este objetivo, se planteó el diseño y síntesis de complejos de Ru(II) cuyas propiedades ópticas dependieran de la concentración de iones hidrógeno del medio y cuyo tiempo de vida de emisión fuera lo suficientemente elevado para poder ser evaluado por **detección sensible a la fase** en el sistema **DEMODE** desarrollado por TGI.

El indicador seleccionado debe poseer, al menos en uno de los ligandos, el **centro ácido o básico** responsable de la sensibilidad al pH y, al mismo tiempo, las características estructurales necesarias para facilitar la inmovilización del mismo en un soporte polimérico adecuado. La capacidad dadora/aceptora de protones puede provenir de un heteroátomo no quelatado al metal, o bien de algún grupo funcional (-NH<sub>2</sub>, -NH-CO-R, -COOH, -OH) unido directamente al ligando y situado en posición *para* con respecto a las posiciones de coordinación, de forma que en función de la concentración de iones hidrógeno del medio su protonación/desprotonación dé lugar a los cambios en la luminiscencia del compuesto esperados.<sup>84</sup>

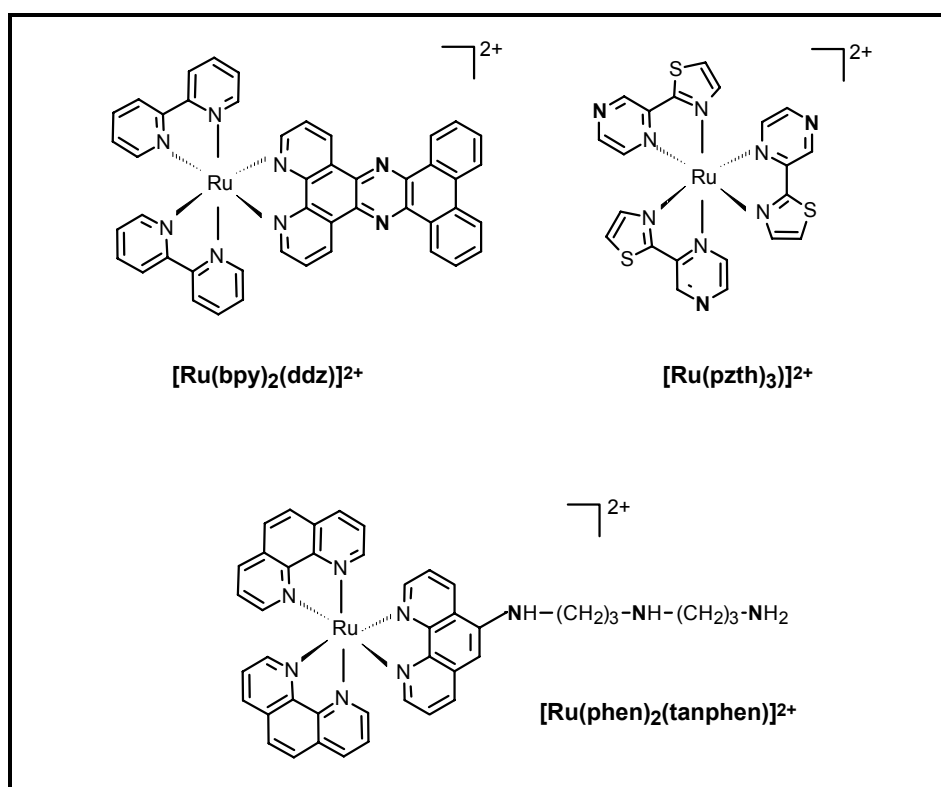
La **matriz polimérica** que aloje al luminóforo deberá favorecer el acercamiento del analito hasta el indicador (en este caso, los protones o grupos hidroxilo presentes en la disolución de medida) y, al mismo tiempo, debe conducir a fases sensibles robustas y resistentes al lavado de la sonda, evitando en lo posible la interferencia de otras especies capaces de desactivar la luminiscencia del complejo de Ru(II), como el oxígeno molecular.

Finalmente, la **resolución de pH** y el **tiempo de respuesta** del optodo desarrollado deben ser competitivos con los sensores potenciométricos empleados en la actualidad para la medida del pH en los campos de interés aplicados (medioambiental y control de procesos).



## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Para construir la fase reactiva del sensor de fibra óptica de pH, se evaluaron inicialmente distintos complejos de Ru(II) con ligandos poliazaheterocíclicos bidentados, sintetizados con anterioridad en nuestro grupo de investigación para otros fines,<sup>73,84b</sup> que poseen en su estructura grupos funcionales con comportamiento ácido-base (figura 48).



**Figura 48.** Estructura de los complejos luminiscentes de Ru(II) evaluados inicialmente como sondas de pH: [bis(2,2'-bipiridina)(dibenzo[h,j]dipirido[3,2-a:2',3'-c]fenazina)rutenio(II), [tris(2-(2-pirazinil)thiazol)rutenio(II) y [bis(1,10-fenantrolina)4-(1',5',9'-trisazonil-1,10-fenantrolina)rutenio(II)].

Sin embargo, como se describirá más adelante, la respuesta de pH obtenida con estos luminóforos en disolución no resultó ser adecuada para las medidas medioambientales objeto de este Proyecto, por lo que se procedió al diseño molecular de nuevas sondas.

## 5.1. DISEÑO MOLECULAR DE LOS INDICADORES ÓPTICOS.

• **[Ru(F15ap)<sub>3</sub>]<sup>2+</sup>**, [tris(5-perfluorooctanamida-1,10-fenantrolina)]rutenio(II). El primer indicador de pH cuya síntesis se planteó como uno de los objetivos de este Proyecto fue un complejo homoléptico de Ru(II) con ligandos de tipo 1,10-fenantrolina sustituidas en la posición 5 del anillo por amidas perfluoradas. Los múltiples átomos de flúor que posee cada ligando, junto con la cesión  $\sigma$  ligando-metal que se produce al formarse el complejo, ejercen un fuerte efecto electroatractor sobre el grupo amida, lo que facilitaría su desprotonación a valores de pH inferiores a lo esperado para compuestos de este tipo (tabla 17).<sup>122</sup> De este modo se consigue que su intervalo de variación con el pH sea más adecuado para los objetivos de este sensor óptico. La finalidad de las largas cadenas halogenadas en la estructura de estos ligandos radica, como veremos más adelante, en conferir al indicador la hidrofobicidad suficiente para evitar el posterior lavado de la sonda del soporte (de tipo hidrófobo) donde se encuentre inmovilizada.

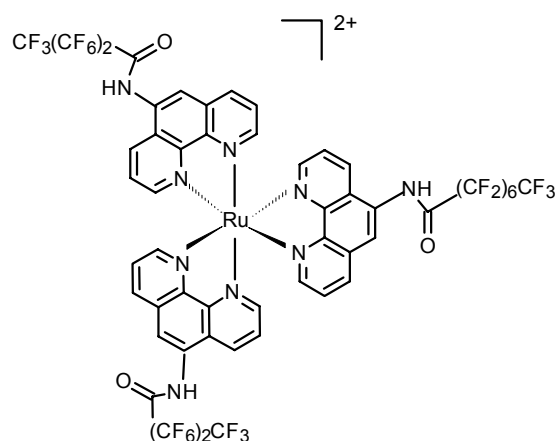
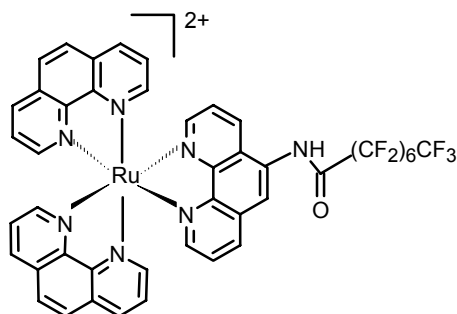


Tabla 17. Constantes de acidez de algunas amidas.<sup>122</sup>

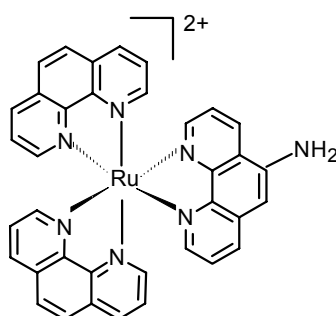
amida	$pK_a$
benzamida	>19.0
<i>N</i> -metilbenzamida	>19.0
acetanilida	17.6
fenilacetanilida	17.3
formamida	17.2
fenoxiacetamida	17.2
<i>p</i> -bromobenzamida	17.1
benzanilida	16.5
<i>p</i> -nitrobenzamida	15.9
<i>p</i> -bromobenzanilida	15.7
formanilida	15.6
tioacetamida	14.7
tricloroacetanilida	9.5

<sup>122</sup> Homer, R. B. y Johnson, C. D., *Acid-base and complexing properties of amides*, en *The Chemistry of Amides* (PATAI), J. Zabicky (ed.), London Interscience, Londres (Reino Unido), 1970, cap. 3 y 5.

• **[Ru(phen)<sub>2</sub>(F15ap)]<sup>2+</sup>**, [bis(1,10-fenantrolina)(5-perfluorooctanamida-1,10-fenantrolina)]rutenio(II). A fin de modular el carácter hidrofóbico del complejo anteriormente descrito, se diseñó asimismo la preparación del correspondiente indicador heteroléptico con un único ligando perfluoroamida. Con esta modificación, cabe esperar una variación importante en las propiedades de solubilidad de la sonda, manteniendo al mismo tiempo su sensibilidad al pH.

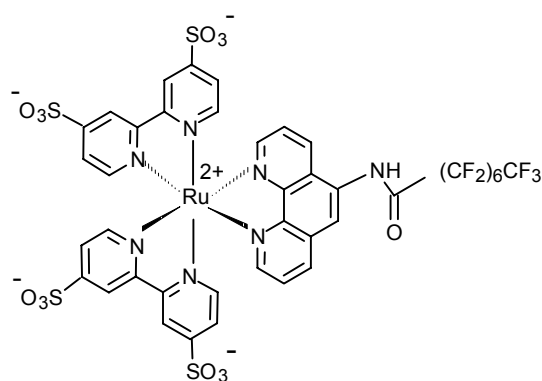


• **[Ru(phen)<sub>2</sub>(5-NH<sub>2</sub>p)]<sup>2+</sup>**, [bis(1,10-fenantrolina)(5-amino-1,10-fenantrolina)]rutenio(II). Se diseñó también, de forma paralela, un complejo metálico con dos ligandos 1,10-fenantrolina y el correspondiente aminoderivado precursor del ligando perfluoroamida. Su caracterización espectroscópica y sus propiedades ácido-base deben permitir evaluar si se produce la degradación de los compuestos con ligandos F15ap durante la etapa de síntesis o purificación de los luminóforos.



• **[Ru(s2b)<sub>2</sub>(F15ap)]<sup>2+</sup>**, [bis(4,4'-disulfo-2,2'-bipiridina)(5-perfluorooctanamida-1,10-fenantrolina)]rutenio(II). Asimismo, se diseñó un nuevo indicador de carácter heteroléptico, que conservara las propiedades ácido-base de las amidas perfluoradas y, al mismo tiempo, que estuviera dotado de grupos funcionales en alguno de sus ligandos que permitieran el anclaje covalente de la sonda a un

soporte sólido adecuado.<sup>123</sup> El nuevo luminóforo conserva el ligando sensible al pH (F15ap), a la vez que posee en la estructura de los dos ligandos auxiliares varios grupos sulfonato que posibilitan la unión covalente tipo sulfonamida al polímero seleccionado para su inmovilización, confiriendo al mismo tiempo a la molécula la carga negativa necesaria para facilitar la eventual unión electrostática a una matriz catiónica. Además, la presencia de grupos sulfonato en la molécula aumenta la solubilidad del indicador en agua, facilitando su caracterización en este medio.



• **[Ru(s2d)<sub>2</sub>(pyim)]<sup>2-</sup>**, [bis(4,7-di(sulfofenil)-1,10-fenantrolina)(2-(2'-piridil)imidazol)]rutenio(II). Finalmente, basándonos en el comportamiento ácido-base que presentan en su estado excitado los complejos de Ru(II) con heteroátomos dadores/aceptores de protones no involucrados en la quelatación al centro metálico (ver antecedentes optodo de pH)<sup>84,124,125</sup> se preparó un nuevo indicador luminiscente que incorpora en el ligando clave un nitrógeno heterocíclico cuya desprotonación da lugar a los cambios en las propiedades ópticas del compuesto necesarios para el desarrollo del optodo de pH. Dada la baja emisión que caracteriza a los complejos con ligandos de tipo imidazol,<sup>126,22</sup> se optó por introducir como ligandos auxiliares dos fenantrolinas sulfonadas sustituidas en las posiciones 4 y 7 por sendos anillos bencénicos (s2d). Estos sistemas aromáticos, de conjugación más extendida, dan lugar a un aumento del tiempo de

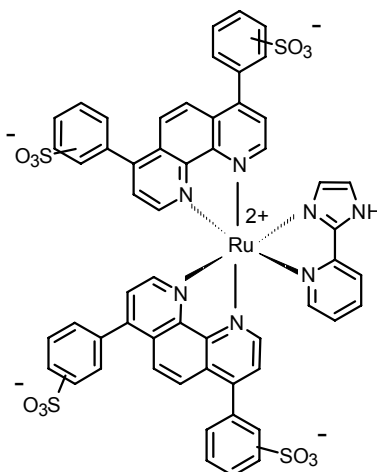
<sup>123</sup> Orellana, G., Moreno-Bondi, M. C., García-Fresnadillo, D. y Xavier, M. P., *Método de unión a polímeros de un compuesto indicador sensible al analito, para la fabricación de sensores ópticos y su dispositivo*, Patente Española ES 2 130 964 (n° sol. 9602181, **1996**).

<sup>124</sup> Marazuela, M. D., Moreno-Bondi, M. C. y Orellana, G., *Appl. Spectrosc.*, **1998**, 52, 1314.

<sup>125</sup> Orellana, G., de Dios, C., Moreno-Bondi, M. C., y Marazuela, M. D., *Proc. SPIE-Int. Soc. Opt. Eng.*, **1995**, 2508, 18.

<sup>126</sup> Haga, M-A., *Inorg. Chim. Acta*, **1983**, 75, 29.

vida de emisión del indicador, compensando así la escasa luminiscencia de estos complejos.<sup>127</sup> El ligando comercial s2d (batofenantrolina sulfonada) consiste en una mezcla de isómeros m,m, m,p y p,p, cuya composición depende del lote de fabricación, pero en la que, generalmente, predomina el primero de ellos.



## 5.2. SÍNTESIS, PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DE LOS INDICADORES.

Los indicadores sensibles al pH se han sintetizado siguiendo protocolos descritos en la bibliografía, a los que se han aplicado las oportunas modificaciones en función de la experiencia obtenida con compuestos similares en nuestro grupo de investigación. En este epígrafe de la Memoria se discuten, además de los procedimientos de síntesis, los resultados obtenidos en la caracterización estructural de los nuevos compuestos preparados, por comparación con datos bibliográficos.<sup>128</sup>

<sup>127</sup> Krause, *Struct. Bonding*, **1987**, 67, 1.

<sup>128</sup> Pretsch, E., Clerc, T., Seibl, J. y Simon, W., *Tablas para la elucidación estructural de compuestos orgánicos por métodos espectroscópicos*, ed. Alhambra, **1991**.

### 5.2.1. LIGANDOS HETEROCÍCLICOS.

Dos de los ligandos con centros ácido-base utilizados para preparar las sondas de pH evaluadas, el 2-(2'-piridil)imidazol (pyim) y la 5-perfluorooctanamida-1,10-fenantrolina, habían sido sintetizados y caracterizados con anterioridad en el laboratorio del Prof. G. Orellana (ver *Parte experimental*, apartado 6.2.1.).

La **5-amino-1,10-fenantrolina** (apartado 6.2.1.) se obtuvo por reducción del correspondiente nitroderivado comercial con hidrazina, utilizando paladio sobre carbono como catalizador. La diimida formada directamente sobre éste, actúa de forma selectiva como especie reductora en el proceso, hidrogenando el grupo nitro sin afectar a los anillos aromáticos.<sup>129,146</sup> sencillo método de síntesis permite obtener el producto puro por simple recristalización, tras la eliminación del catalizador del medio de reacción.

El espectro **IR** de este compuesto confirma la desaparición de las intensas bandas de tensión simétrica y asimétrica características del nitrocompuesto de partida (a 1340 y 1510  $\text{cm}^{-1}$ , respectivamente) y permite observar las bandas propias de una amina primaria aromática a 3416, 3323 (tensiones N-H de amina libre) y 3227  $\text{cm}^{-1}$  (tensión N-H de amina asociada).

En el espectro de  **$^1\text{H-RMN}$** , realizado en dimetil sulfóxido deuterado, se aprecia el singlete ancho de los protones amínicos a 6.10 ppm. El protón H6, situado en posición  $\alpha$  con respecto al átomo de carbono que soporta el grupo amina, aparece como un singlete apantallado 1.3 ppm con respecto al desplazamiento químico que exhibe en la fenantrolina sin sustituir, debido al efecto  $+K$  que proporciona el par de electrones situado sobre el nitrógeno del sustituyente. El resto de los protones aromáticos sufren apantallamiento en el ligando aminado (tabla 18), siendo el efecto más acusado en las posiciones del anillo conjugadas con el  $\text{NH}_2$ . La resolución del espectro permite observar los acoplamientos tanto a corta como a larga distancia, lo que facilitó la asignación de todas las señales.

El espectro de  **$^{13}\text{C-RMN}$**  presenta 12 señales, cinco de ellas muy débiles, atribuibles a los carbonos cuaternarios de la molécula. El grupo amino ejerce el esperado efecto desapantallante sobre el carbono que le soporta (C5), observando

---

<sup>129</sup> Nasielski-Hinkens, R. y Benedek-Vamos, *J. Chem. Soc., Perkin Trans.*, **1975**, 1, 1229.



el efecto contrario para el carbono situado en posición  $\alpha$  con respecto a éste (C6) y sus posiciones equivalentes por conjugación (aunque en éstas en menor medida).

**Tabla 18.** Desplazamientos químicos de protón y carbono (en DMSO- $d_6$ ) de la 5-amino-1,10-fenantrolina (5-NH<sub>2</sub>p). Se muestran también los de la fenantrolina sin sustituir (en DMSO- $d_6$ ) para destacar el efecto producido por el sustituyente en el anillo aromático.

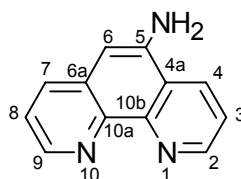
<sup>1</sup> H-RMN ppm	H2	H9	H4	H7	H5	H6	H3	H8	NH <sub>2</sub>
phen <sup>a</sup>	9.26		8.61		8.12		7.88		---
5-NH <sub>2</sub> p	8.99	8.63	8.63	7.98	---	6.81	7.44	7.70	6.10

<sup>13</sup> C ppm	C2	C9	C10a	C10b	C4	C7	C4a	C6a	C5	C6	C3	C8
phen <sup>b</sup>	149.8		145.4		136.0		128.3		126.5		123.8	
5-NH <sub>2</sub> p	149.3	144.8	140.5	146.2	132.7	130.8	121.8	130.5	142.6	101.7	122.0	123.1

a) Ref. <sup>130</sup>.

b) Ref. <sup>131</sup>.



### 5.2.2. BIS-QUELATOCOMPLEJOS DE RU(II).

Se sintetizaron dos nuevos bisquelatocomplejos de Ru(II) como precursores para la preparación de los respectivos compuestos heterolépticos, ya que el tercer biscomplejo utilizado había sido sintetizado con anterioridad en nuestro laboratorio. Con el fin de llevar a cabo la síntesis de compuestos de coordinación con dos ligandos azaheterocíclicos se siguió un procedimiento análogo al descrito para trisquelatocomplejos (calentamiento a reflujo del ligando en presencia de RuCl<sub>3</sub> y en atmósfera inerte), pero añadiendo la cantidad estequiométrica del ligando y exceso de cloruro de litio al medio de reacción. De este modo, la elevada concentración de iones cloruro dificulta la entrada de un tercer ligando quelatante en la esfera de coordinación del metal. El tiempo de reacción depende

<sup>130</sup> Miller, J. D. y Prince, R. H., *J. Chem. Soc.*, **1965**, 3185.

<sup>131</sup> Crook, M. J., Lewis, A. P. y McAuliffe, G. S. G., *Org. Magn. Reson.*, **1984**, 22, 388.

de la capacidad coordinativa de los ligandos. Así, en la preparación del  $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{Cl}_2]$  el calentamiento a reflujo se mantuvo durante 3 h, mientras que el  $[\text{Ru}(\text{s2d})_2\text{Cl}_2]^{4-}$  requirió el doble de tiempo para completar la reacción, debido a la menor basicidad de los ligandos sulfonados como resultado de la conjugación de los dos anillos bencénicos en posición *para* con respecto a los nitrógenos heterocíclicos quelatantes (figura 49).

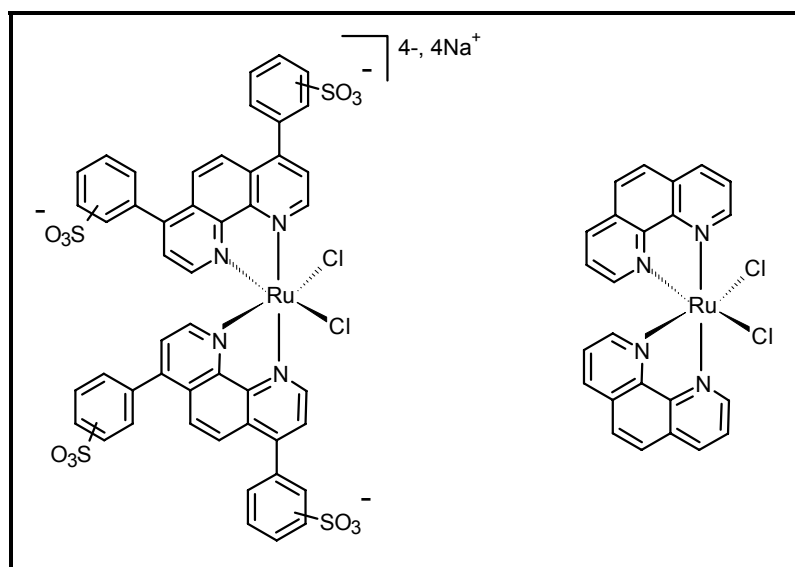


Figura 49. Bisquelato complejos de Ru(II) sintetizados en este trabajo.

El aislamiento de estos compuestos se realizó por reprecipitación lenta del crudo de reacción de acetona. El sólido precipitado, de color violeta oscuro, difiere significativamente del complejo homoléptico que puede formarse como subproducto de reacción, ya que este último es de color rojizo y da lugar a una intensa mancha fluorescente en CCF (por excitación a 366 nm). Este criterio de pureza, junto con la banda de absorción en la región visible del espectro electromagnético que muestra el sólido precipitado disuelto en dimetilformamida (máximo a 547 nm, correspondiente a la banda de transición MLCT  $t_{2g} \rightarrow \pi^*$ ) y que confirman la quelatación del metal por los ligandos, nos permite establecer que los productos obtenidos corresponden a los biscomplejos de Ru(II) objetivo.-

### 5.2.3. QUELATOCOMPLEJOS DE Ru(II).

Los métodos de preparación de los indicadores de pH sintetizados están basados en los descritos en la bibliografía para este tipo de compuestos, introduciendo las modificaciones necesarias en función de la solubilidad y reactividad de los ligandos. De forma general, los **complejos homolépticos** se obtienen por calentamiento a reflujo, en un disolvente prótico y bajo argón, del correspondiente ligando azaheterocíclico quelatante (en exceso) con tricloruro de rutenio comercial. La atmósfera inerte facilita la reducción por el disolvente caliente del compuesto de coordinación formado inicialmente. La elección del disolvente, por otro lado, depende de la solubilidad de los reactivos y de la temperatura que requiera el proceso. Así, con ligandos menos básicos (con menor poder de quelatación) se suele elegir etilenglicol o glicerina como disolvente, ya que permite alcanzar temperaturas más elevadas. Otros medios de reacción comúnmente empleados en la síntesis de complejos de Ru(II) son el metanol, etanol y mezclas alcohol/agua ya que, a pesar de que con ellos las temperaturas de reflujo son inferiores, se eliminan más fácilmente en la posterior purificación del luminóforo. La síntesis de los **complejos homolépticos** de Ru(II) catiónicos suele producir compuestos puros por simple precipitación con un disolvente en el que el indicador no sea soluble (por ej. éter), posterior disolución en agua y reprecipitación del complejo con un contraión voluminoso ( $\text{PF}_6^-$ ).

Los **complejos heterolépticos** se preparan a partir del correspondiente bisquelatocomplejo, también por calentamiento a reflujo y en atmósfera de argón. Estos compuestos, sin embargo, son más difíciles de purificar que los anteriores, ya que durante el proceso de reacción puede producirse la sustitución de ligando en el bisquelatocomplejo inicial, dando lugar a mezclas de complejos homo y heterolépticos de difícil separación debido a su similitud estructural y de propiedades. Por lo general, estos indicadores requieren la purificación en columna (rápida) de *Sephadex*<sup>®</sup> tras la precipitación del crudo de reacción. La elección de la fase sólida depende de la carga global que presente el complejo; así, los **compuestos catiónicos** se adsorben sobre *carboximetil* o *sulfopropil* (*CM* o *SP*) *Sephadex*<sup>®</sup>, eluyendo después con disoluciones acuosas de cloruro sódico de fuerza iónica creciente que desplazan al indicador retenido sobre la resina aniónica. Se trata de un excelente método de purificación que consigue separar fácilmente el complejo heteroléptico de los reactivos de partida y subproductos de

reacción, de distinta carga y polaridad. Sin embargo, presenta la gran dificultad de la posterior eliminación del cloruro sódico (en concentraciones muy elevadas) que se eluye con el producto. A pesar de que el lavado del mismo con metanol frío elimina gran parte de la sal, los microanálisis de los compuestos purificados con esta técnica revelan la existencia de moléculas de cloruro sódico en el producto *purificado*. Los **complejos aniónicos**, por otra parte, son más difíciles aún de purificar, ya que la adsorción de los mismos sobre resinas catiónicas, como el *dietilaminoetil* (DEAE) *Sephadex*<sup>®</sup>, es irreversible, no pudiendo extraerse después con ningún disolvente. Con estos compuestos hemos utilizado generalmente como fase estacionaria, aunque no siempre con resultado positivo, *LH Sephadex*<sup>®</sup>. En esta resina lipofílica los compuestos se adsorben por interacciones hidrofóbicas con la fase sólida, eluyéndose después con agua, disolventes polares o mezcla de ambos por diferencia de polaridad (se desorben primero los más polares).

A continuación se especifican, para cada uno de los nuevos complejos de Ru(II) sintetizados, las modificaciones introducidas en los métodos generales de síntesis y purificación descritos anteriormente, analizando los resultados obtenidos de la posterior caracterización estructural (ver *Parte experimental*, apartado 6.2.3.).

#### **A) [Tris(5-perfluorooctanamida-1,10-fenantrolina)]rutenio(II), [Ru(F15ap)<sub>3</sub>]<sup>2+</sup>.**

El sustituyente alquílico perfluorado de los tres ligandos que quelatan al metal convierte a este complejo en altamente insoluble en el medio de reacción (etilenglicol), por lo que el simple enfriamiento del disolvente da lugar a la precipitación del producto deseado sin ser necesarias ulteriores etapas de purificación. El intercambio del contraión cloruro por PF<sub>6</sub><sup>-</sup> disminuye aún más la solubilidad del compuesto, permitiendo la obtención de una segunda cosecha de producto de las aguas de filtrado. La pureza de ambos sólidos se comprobó inicialmente por CCF y, a continuación, con el resto de técnicas empleadas en la caracterización estructural de estos compuestos.

El espectro **IR** realizado en pastilla de bromuro potásico muestra, además de una banda ancha de tensión N-H típica de amida asociada, las tensiones propias del grupo carbonilo (amida I) a 1718 cm<sup>-1</sup>. El indicador con contraión PF<sub>6</sub><sup>-</sup>

se distingue del que posee como contraión el  $\text{Cl}^-$  por la intensa banda a 843 nm que presenta en su espectro, característica de la tensión de enlace P-F.<sup>128</sup>

La **cesión  $\sigma$**  que tiene lugar desde los ligandos al metal, junto al efecto electroatractor de los átomos de flúor, aumentan la acidez de los protones amídicos, permitiendo el intercambio de los mismos con los protones del agua que acompaña al disolvente deuterado. Esto explica que no se observe en el **espectro de  $^1\text{H-RMN}$** , la señal propia del protón de amida y que la señal del agua aparezca muy ensanchada y a valores de campo superiores a los que muestra habitualmente en estos disolventes. Los protones  $\alpha$  y  $\alpha'$  de la fenantrolina, que en el ligando libre son los más desapantallados (tabla 19), son superados en campo por los protones  $\gamma$  y  $\gamma'$  al complejarse con el rutenio, debido a la **anisotropía magnética de la corriente de anillo** del ligando vecino, situado inmediatamente debajo de cada uno los protones en  $\alpha$  (ver figura 3D a pie de tabla 19).<sup>132</sup> Finalmente, el protón  $\delta'$  aparece a valores de desplazamiento químico inferiores cuando el espectro se registra en metanol con respecto a acetonitrilo deuterado, debido probablemente a que la acidez que muestra la amida en el disolvente prótico es superior,<sup>133</sup> lo que se traduce en una mayor densidad electrónica sobre el nitrógeno amídico y, por tanto, un mayor apantallamiento del  $\text{H}\delta'$ . Es importante destacar también que no se ha producido la hidrólisis de la amida durante la síntesis y posterior purificación del complejo, ya que en este espectro de  $^1\text{H-RMN}$  no se observa la señal propia del grupo amino aromático (6.15 ppm, tabla 22).

Los protones de los ligandos perfluorados en el complejo con contraión  $\text{PF}_6^-$  aparecen más desapantallados, efecto especialmente pronunciado en las posiciones más próximas al sustituyente ( $\gamma''$  y  $\delta'$ ). Teniendo en cuenta que la solubilidad del indicador disminuye bruscamente cuando se sustituye el anión  $\text{Cl}^-$  por  $\text{PF}_6^-$  es probable que el compuesto se encuentre en metanol asociado en forma de par iónico en contacto cuando su contraión es el fuertemente electronegativo anión hexafluorofosfato. Un efecto similar se ha observado con el complejo  $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ , donde el desplazamiento químico del  $^{99}\text{Ru}$  aparece hacia valores de campo superiores cuando se intercambia el  $\text{Cl}^-$  por  $\text{PF}_6^-$ .<sup>134</sup>

<sup>132</sup> Orellana, G., Álvarez-Ibarra, C. y Santoro, J., *Inorg. Chem.*, **1988**, 27, 1025.

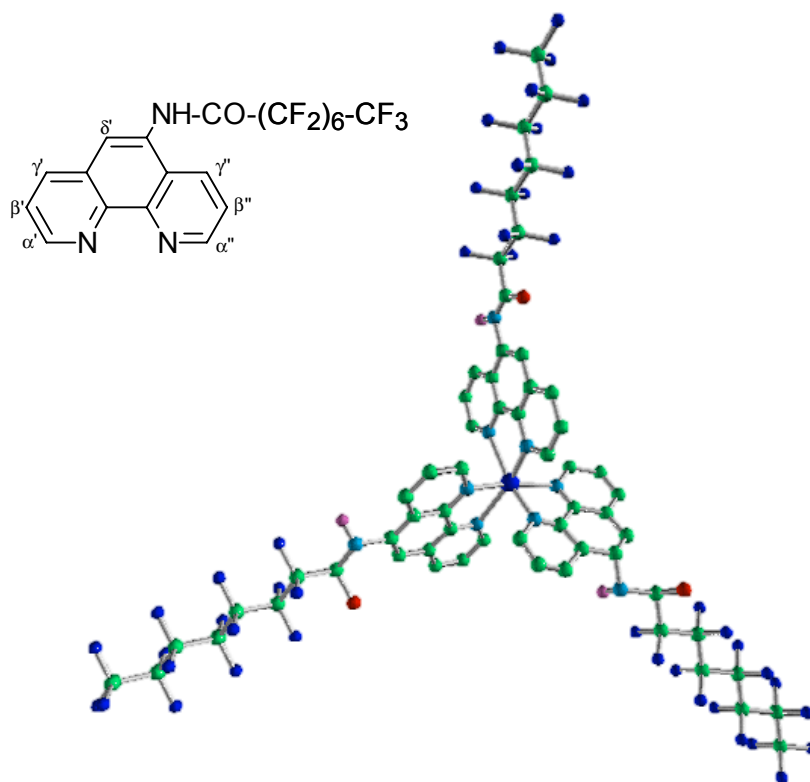
<sup>133</sup> Popovych, O. y Tomkins, R. P. T., *Non aqueous solution chemistry*, Wiley, Nueva York (EE.UU.), **1981**; pp. 32-75.

<sup>134</sup> Orellana, G., Kirsch-De Mesmaeker, A. y Turro, N. J., *Inorg. Chem.*, **1990**, 29, 882.

**Tabla 19.** Desplazamientos químicos de los protones del ligando F15ap libre y cuando forma parte de un complejo homoléptico de Ru(II).

<sup>1</sup> H-RMN / ppm	H $\alpha''$	H $\alpha'$	H $\gamma'$	H $\gamma$	H $\delta'$	H $\beta''$	H $\beta'$
<b>F15ap<sup>a</sup></b>	9.09	9.06	8.12	8.09	7.92	7.59	7.54
<b>[Ru(F15ap<sub>3</sub>)]Cl<sub>2</sub><sup>b</sup></b>	8.07	7.99	8.54	8.51	8.19	7.67	7.61
<b>[Ru(F15ap<sub>3</sub>)]Cl<sub>2</sub><sup>c</sup></b>	8.06	7.94	8.76	8.47	8.49	7.62	7.55
<b>[Ru(F15ap<sub>3</sub>)](PF<sub>6</sub>)<sub>2</sub><sup>b</sup></b>	8.21	8.15	8.70	8.57	8.42	7.83-7.71	

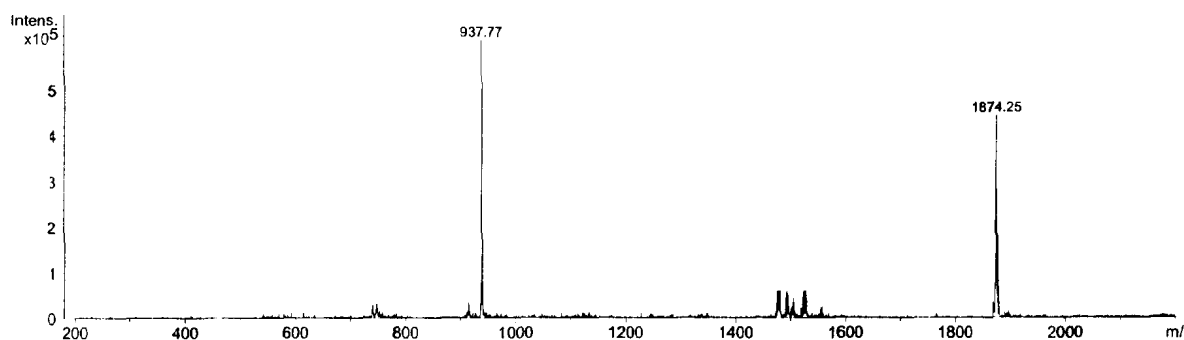
- a) CDCl<sub>3</sub>.  
 b) CD<sub>3</sub>OD.  
 c) CD<sub>3</sub>CN.



Los resultados del **microanálisis** efectuado sobre el producto revelan la presencia de etilenglicol (procedente del medio de reacción) formando parte de la red cristalina del complejo, observable también en el espectro de <sup>1</sup>H-RMN anteriormente descrito.

La **espectrometría de masas**, empleando la técnica de ionización por electropulverización (ESI, del inglés *electrospray ionization*), resulta particularmente útil en estos compuestos, ya que sus espectros de resonancia magnética nuclear generalmente son muy complejos. En este caso, el espectro de la muestra electropulverizada registrado con polaridad **positiva** confirma que se

trata del producto buscado, ya que aparecen dos picos a 938 (el más intenso) y a 1874. Mientras que el primero corresponde al ión complejo intacto  $[\text{Ru}(\text{F15ap})_3]^{2+}$ , el último correspondiente a la pérdida de un protón de uno de los ligandos amida, lo que le confiere una única carga positiva al ión complejo.



### **B) [Bis(1,10-fenantrolina)(5-perfluorooctanamida-1,10-fenantrolina)] rutenio(II), $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{F15ap})]^{2+}$ .**

Este complejo heteroléptico posee un único ligando perfluorado, por lo que aumenta considerablemente su solubilidad en el medio de reacción (metanol). Por este motivo, no se produce la precipitación directa del compuesto por enfriamiento del crudo, como en el caso del complejo homoléptico correspondiente, sino que es necesario intercambiar el contraión cloruro por hexafluorofosfato para disminuir la solubilidad del compuesto, situación más habitual en los complejos de Ru(II) con ligandos poliazaheterocíclicos quelatantes.<sup>76</sup>

La purificación de este luminóforo (apartado 6.2.3.) se realizó por cromatografía en columna rápida utilizando como fase estacionaria CM-Sephadex<sup>®</sup>. Dado que en este tipo de separación se utilizan como eluyente disoluciones acuosas de fuerza iónica creciente, fue necesario intercambiar de nuevo los contra aniones, en un paso previo, para poder cargar en la columna el

sólido disuelto en agua. Una vez eluidas las impurezas, el complejo queda adsorbido en la fase sólida, siendo necesaria su extracción por agitación de la misma en una mezcla metanol-cloruro sódico 2 M (1:1, v/v). Los aspectos más relevantes de la caracterización estructural se resumen en los siguientes puntos:

El espectro **IR** del compuesto muestra las absorciones típicas de amida ( $\nu_{\text{NH}}$ ,  $\nu_{\text{C=O}}$  y  $\nu_{\text{N-C=O}}$ ), además de las correspondientes tensiones de enlace C-F del ligando perfluorado y P-F del contraión.

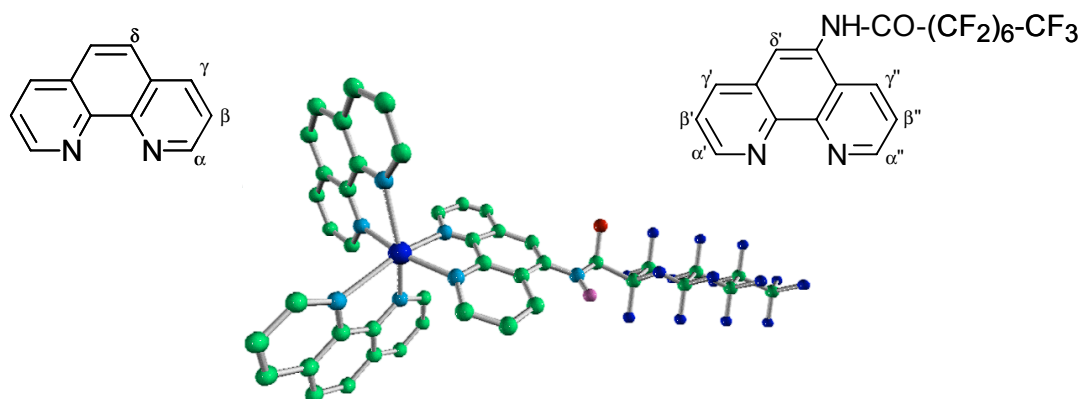
Al igual que se observa en el ión complejo homoléptico, la desaparición de la señal de protón amídico en el espectro de  **$^1\text{H-RMN}$** , que en amidas aromáticas aparece entre 7.5 y 9.5 ppm,<sup>128</sup> va acompañada de un ensanchamiento de la señal del agua que aparece junto al disolvente. Esto confirma que se produce el rápido intercambio protónico entre el agua y la amida debido a la inusual acidez que muestra ésta con respecto a las amidas aromáticas ordinarias. Por otra parte, los desplazamientos químicos de los  $\text{H}\alpha$  de la 1,10-fenantrolina complejada al metal son inferiores a los que exhibe el ligando libre (ver tabla 20) debido, como discutimos anteriormente, a la **anisotropía magnética** de los anillos heterocíclicos vecinos que afecta fundamentalmente a estas posiciones del anillo (figura a pie de tabla). Esto provoca, asimismo, que en el complejo los  $\text{H}\gamma$  superen en campo a los  $\text{H}\alpha$ .

**Tabla 20.** Desplazamientos químicos de los protones del complejo  $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{F15ap})]^{2+}$ , en  $\text{CD}_3\text{CN}$ . Se muestran también los valores correspondientes a los ligandos libres y al indicador homoléptico.

$^1\text{H-RMN}$ / ppm	$\text{H}\alpha''$	$\text{H}\alpha'$	$\text{H}\gamma'$	$\text{H}\gamma$	$\text{H}\delta'$	$\text{H}\beta''$	$\text{H}\beta'$
<b>F15ap</b> <sup>a</sup>	9.09	9.06	8.12	8.09	7.92	7.59	7.54
<b><math>[\text{Ru}(\text{F15ap})_3]^{2+b}</math></b>	8.06	7.94	8.76	8.47	8.49	7.62	7.55
<b><math>[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{F15ap})]^{c}</math></b>	8.10	8.01	8.61	8.51	8.42	7.68	7.61
$^1\text{H-RMN}$ / ppm	$\text{H}\alpha$		$\text{H}\gamma$		$\text{H}\delta$	$\text{H}\beta$	
<b>phen</b> <sup>d</sup>	9.26		8.61		8.12	7.88	
<b><math>[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{F15ap})]^{c}</math></b>	8.06		8.60		8.26	7.63	

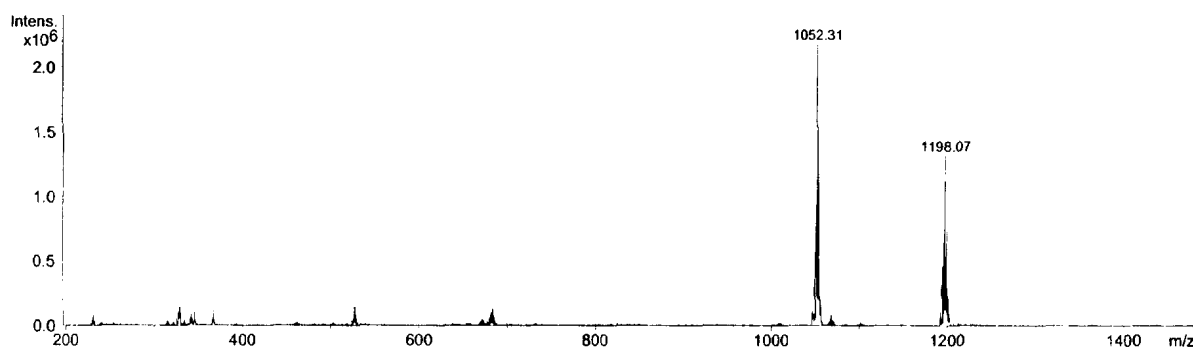
- a)  $\text{CDCl}_3$ .  
 b)  $\text{CD}_3\text{CN}$ , tabla 19.  
 c)  $\text{CD}_3\text{CN}$ .  
 d)  $\text{DMSO-d}_6$ .<sup>130</sup>





A partir de los valores experimentales del **microanálisis** del producto se concluye que por cada molécula de indicador se incorpora en la precipitación una molécula de cloruro sódico y tres de metanol procedentes de la purificación del complejo (apartado 6.2.3., *Parte experimental*).

La **espectrometría de masas** con detección de iones **positivos** confirma la formación del producto buscado, mostrando el pico correspondiente al ión molecular del complejo con pérdida del protón amídico (1052). El pico a 1198 corresponde al ión molecular anterior solvatado por cuatro moléculas de metanol y una de agua. La observación de este tipo de iones, que poseen una o más moléculas de disolvente, es habitual en la técnica ESI, como resultado de la desorción parcial de las moléculas de disolvente(s) de las microgotas formadas en la electropulverización.



**C) [Bis(4,4'-disulfo-2,2'-bipiridina)(5-perfluorooctanamida-1,10-fenantrolina)] rutenio(II), [Ru(s2b)<sub>2</sub>(F15ap)]<sup>2-</sup>.**

La incorporación de grupos sulfonato en los ligandos auxiliares de este indicador confiere a la molécula una carga global negativa, lo que impide la utilización de los métodos convencionales de preparación y purificación de complejos de Ru(II) descritos hasta el momento. Como se comentó en la introducción a los métodos de síntesis, los complejos aniónicos pueden purificarse por cromatografía en columna rápida empleando un Sephadex<sup>®</sup> lipofílico (LH) que permite la utilización de disolventes orgánicos polares como eluyentes. Para aumentar la efectividad de separación en esta columna es necesario que los compuestos recorran la mayor longitud posible de fase estacionaria. Por este motivo, se preparan columnas estrechas, cargadas con 50 cm de LH-Sephadex, en las que las moléculas más polares se eluyen en primer lugar. Esta columna no siempre resulta efectiva, dada la similitud estructural que presenta en ocasiones el compuesto deseado con otros subproductos de reacción. En esta ocasión (apartado 6.2.3.) se empleó agua desionizada como eluyente, recogiendo en las primeras fracciones el ligando y el bisquelatocomplejo sin reaccionar que precipitaron, junto con el producto objetivo, con la mezcla acetona-éter añadida al crudo de reacción. Finalmente, se liofilizaron las fracciones finales, comprobando por diferentes técnicas que contenían el producto puro buscado.

El espectro **IR** del compuesto es similar a los descritos para los complejos anteriores, mostrando las bandas características de amida. Se observan, además, dos bandas muy intensas correspondientes a las tensiones asimétrica y simétrica de los grupos sulfonato.

La asignación de las señales que aparecen en el complicado espectro de **<sup>1</sup>H-RMN** de este indicador se realizaron por comparación con los desplazamientos químicos observados para el ligando perfluorado cuando forma parte del complejo homoléptico [Ru(F15ap)<sub>3</sub>]<sup>2+</sup>, descrito anteriormente, y con las características espectrales del compuesto [Ru(s2b)<sub>2</sub>(tdap)]<sup>2-</sup>, sintetizado con anterioridad en nuestro laboratorio (tdap: 5-tetradecanamida-1,10-fenantrolina).<sup>72</sup> El ligando de tipo fenantrolina posee un sistema aromático más extenso que los ligandos bipiridina, lo que da lugar a una anisotropía magnética más amplia. En los complejos [Ru(F15ap)<sub>3</sub>]<sup>2+</sup> y [Ru(phen)<sub>2</sub>(F15ap)]<sup>2+</sup>, que poseen tres ligandos de tipo

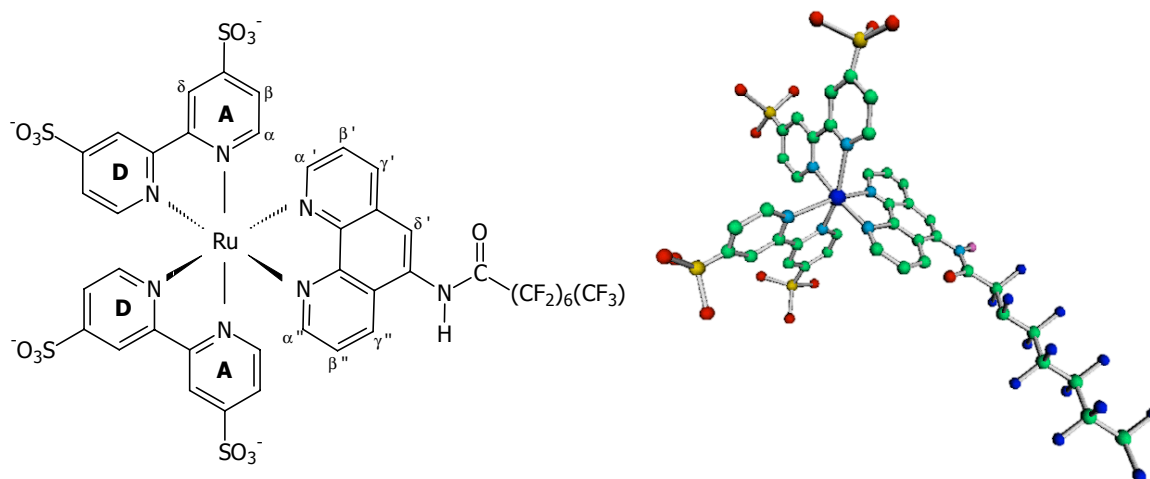
fenantrolina, el efecto apantallante de las corrientes de anillo afectaba por igual a todos los protones  $\alpha$ . En el indicador que nos ocupa, sin embargo, al poseer dos ligandos bipiridina, el efecto es más marcado sobre los anillos más próximos al ligando F15ap ("A"), lo que se refleja con la diferenciación de los mismos en su espectro de resonancia (tabla 21).<sup>132</sup> Los protones de la fenantrolina aparecen en el espectro en el orden esperado, discutido anteriormente para los otros dos indicadores con ligandos perfluorados.

**Tabla 21.** Asignación de las señales del espectro de  $^1\text{H-RMN}$  del complejo  $[\text{Ru}(\text{s2b})_2(\text{F15ap})]^{2-}$  en función de los desplazamientos químicos obtenidos con el homólogo homolético y con otro indicador similar sintetizado con anterioridad en nuestro laboratorio.

$^1\text{H-RMN}$ / ppm	$\text{H}\gamma'$	$\text{H}\gamma$	$\text{H}\alpha''$	$\text{H}\alpha'$	$\text{H}\delta'$	$\text{H}\beta''$	$\text{H}\beta'$
$[\text{Ru}(\text{F15ap})_3]^{2+}$ <sup>a</sup>	8.54	8.51	8.07	7.99	8.19	7.67	7.61
$[\text{Ru}(\text{s2b})_2(\text{tdap})]^{2-}$ <sup>a,b</sup>	8.77	8.63	8.20	8.11	8.52	7.86	7.80
$[\text{Ru}(\text{s2b})_2(\text{F15ap})]^{2-}$ <sup>a</sup>	8.73	8.60	8.26	8.21	8.01	7.90	7.85
$^1\text{H-RMN}$ / ppm	$\text{H}\delta$		$\text{H}\alpha$		$\text{H}\beta$		
	D	A	D	A	D	A	
$[\text{Ru}(\text{s2b})_2(\text{tdap})]^{2-}$ <sup>a,b</sup>	9.00	8.95	8.13	7.73	7.84	7.58	
$[\text{Ru}(\text{s2b})_2(\text{F15ap})]^{2-}$ <sup>a</sup>	8.99	8.94	8.11	7.74	7.83	7.59	

a)  $\text{CD}_3\text{OD}$ .

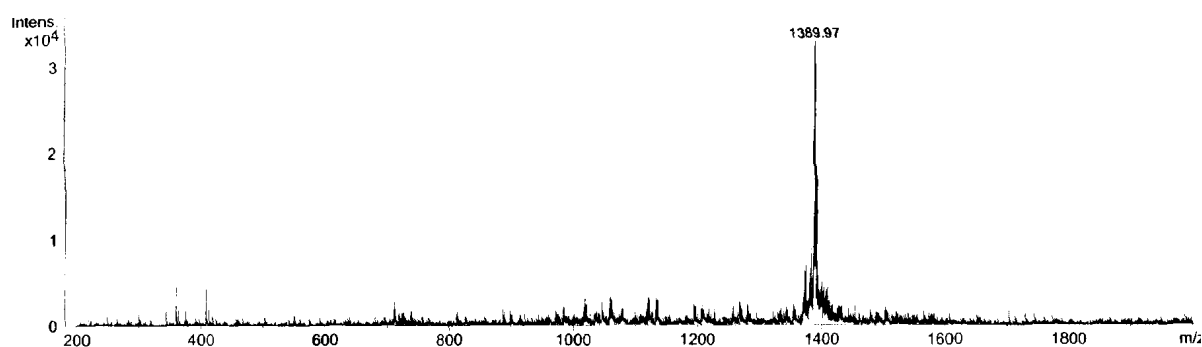
b) ref. 72.



El complejo sintetizado admite dos tipos de contraiones en función de la carga global que exhiba. Así, si se consideran compensadas dos cargas negativas de los sulfonatos con las dos positivas del Ru(II) el exceso de carga negativa se compensaría con dos iones sodio. Sin embargo, teniendo en cuenta la lejanía de

los grupos sulfonato de la esfera de coordinación es probable que cada uno de ellos forme par iónico con un  $\text{Na}^+$  y sean dos  $\text{Cl}^-$  los que compensen la carga del rutenio. En este sentido, el **microanálisis** realizado del compuesto es igualmente válido para las dos estructuras propuestas (ver apartado 6.2.3., *Parte experimental*), por lo que no permite descartar ninguna de ellas.

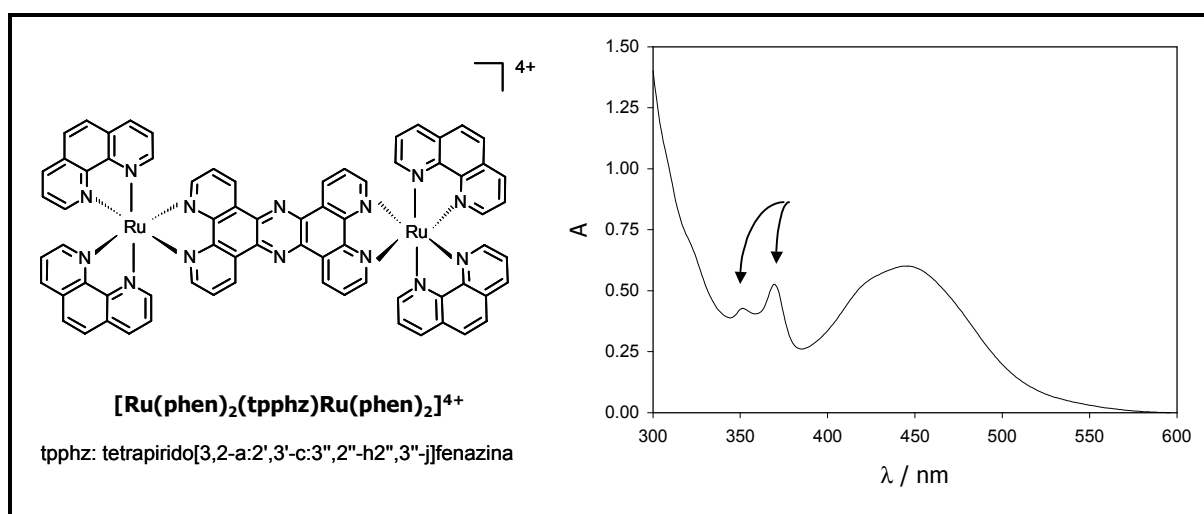
Finalmente, se confirmó por **espectrometría de masas** la formación del complejo deseado. El espectro registrado con detección de iones **positivos** mostró un pico correspondiente al ión molecular del compuesto con adición de tres cationes sodio, necesarios para conseguir una carga global positiva ( $\text{M}^+$ ). Esto no sólo confirma la formación del producto buscado, sino que permite afirmar que éste posee dos cargas negativas compensadas por dos iones  $\text{Na}^+$ , desechando la otra opción planteada.



#### D) [Bis(1,10-fenantrolina)(5-amino-1,10-fenantrolina)]rutenio(II), [Ru(phen)<sub>2</sub>(5-NH<sub>2</sub>p)]<sup>2+</sup>.

Este indicador se sintetizó con objeto de poder comprobar, tanto por los resultados de su caracterización estructural, como por sus propiedades fotoquímicas y ácido-base, si se produce hidrólisis del ligando F15ap que forma parte de los complejos anteriormente descritos. El proceso de síntesis (apartado 6.2.3.) evoluciona con formación de un producto secundario como resultado de la autocondensación de dos ligandos 5-NH<sub>2</sub>p del luminóforo sintetizado, dando lugar al complejo bimetálico [Ru(phen)<sub>2</sub>(tpphz)Ru(phen)<sub>2</sub>]<sup>4+</sup> (tpphz: tetrapiridofenazina),

como pudo comprobarse por las bandas de absorción a 350 y 370 nm que aparecen en el espectro del subproducto aislado y que corresponden, según datos bibliográficos, a absorciones  $n \rightarrow \pi^*$  de los complejos con ligandos de tipo fenazina (ver figura 50).<sup>73,135</sup> La separación de ambos productos se realizó por cromatografía rápida en columna de CM-Sephadex, dada la naturaleza catiónica de los mismos, eluyendo la mezcla con disoluciones acuosas de cloruro sódico 0.2 M y 0.5 M (producto principal y secundario, respectivamente).



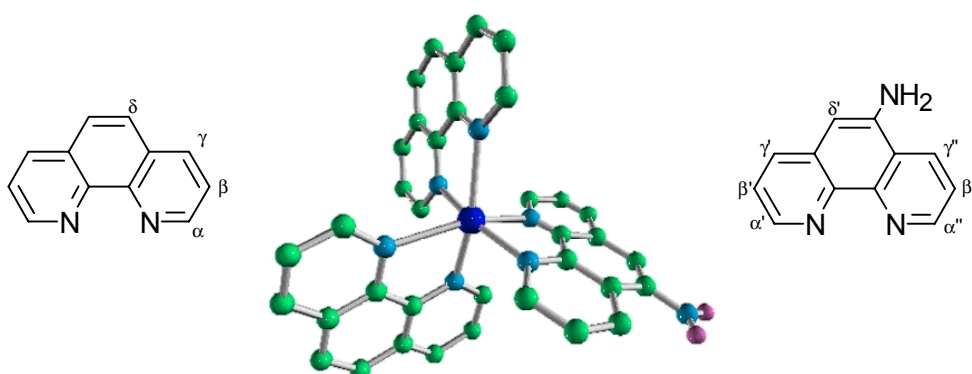
**Figura 50.** Estructura y espectro de absorción, en disolución acuosa, del complejo bimetalico  $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{tpphz})\text{Ru}(\text{phen})_2]^{4+}$ , subproducto de preparación de  $[\text{Ru}(\text{phen})_2(5\text{-NH}_2\text{p})]^{2+}$ . Las flechas marcan las bandas de absorción características del anillo de fenazina.

La asignación de las señales del espectro de  $^1\text{H-RMN}$  del complejo aminado se realizó por comparación con las mostradas por el  $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{F15ap})]^{2+}$ . En la tabla 22 se observa que los valores de desplazamiento químico de los protones de los ligandos auxiliares son prácticamente coincidentes en ambos luminóforos. La 5-amino-1,10-fenantrolina, por su parte, sufre el desapantallamiento de sus protones  $\gamma$  y  $\delta$  al quelatar el metal por efecto de la cesión  $\sigma$  que se produce desde el ligando al metal. Este efecto no se observa en el resto de posiciones, apantalladas por la anisotropía magnética de los ligandos vecinos y la retrocesión  $\pi$  del metal.

<sup>135</sup> Bolger, J., Gourdon, A., Ishow, E. y Launay, J. P., *Inorg. Chem.*, **1996**, 35, 2942.

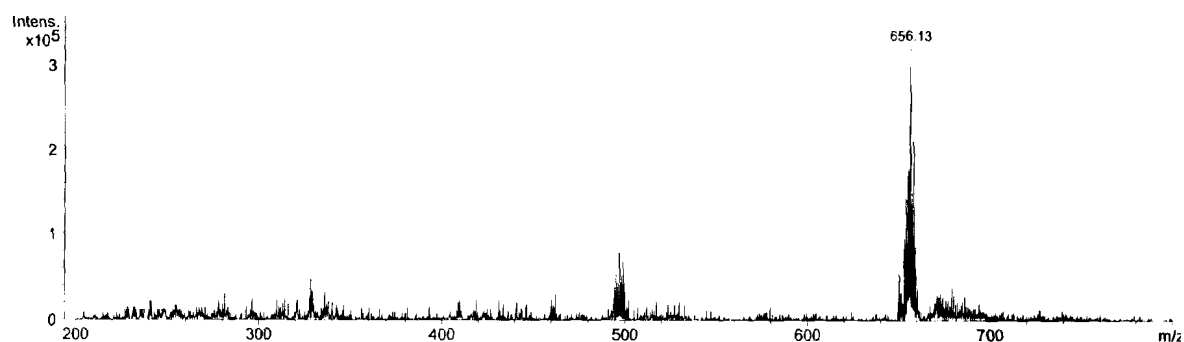
Tabla 22. Desplazamientos químicos de los protones del complejo  $[\text{Ru}(\text{phen})_2(5\text{-NH}_2\text{p})]^{2+}$ .

$^1\text{H-RMN ppm}$	$\text{H}\alpha''$	$\text{H}\alpha'$	$\text{H}\gamma'$	$\text{H}\gamma$	$\text{H}\delta$	$\text{H}\beta''$	$\text{H}\beta'$	$\text{NH}_2$
<b>5-NH<sub>2</sub>p<sup>a</sup></b>	8.99	8.63	8.63	7.98	6.81	7.44	7.70	6.10
<b><math>[\text{Ru}(\text{phen})_2(5\text{-NH}_2\text{p})]^{2+ \text{ b}}</math></b>	8.07	7.98	9.02	8.18	7.19	7.36	7.56	6.15
$^1\text{H-RMN ppm}$	$\text{H}\alpha$		$\text{H}\gamma$		$\text{H}\delta$	$\text{H}\beta$		
<b>phen<sup>a</sup></b>	9.26		8.61		8.12	7.88		
<b><math>[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{F15ap})]^{2+ \text{ b}}</math></b>	8.06		8.60		8.26	7.63		
<b><math>[\text{Ru}(\text{phen})_2(5\text{-NH}_2\text{p})]^{2+ \text{ b}}</math></b>	8.03		8.61		8.26	7.63		

a) en DMSO-d<sub>6</sub>.b) en CD<sub>3</sub>CN.

Los valores experimentales del **microanálisis** realizado al producto revela la presencia de moléculas de disolvente y cloruro sódico en el sólido, resultado habitual en los complejos purificados en columna de CM-Sephadex.

Finalmente, el **espectro de masas** por electropulverización y detección de iones **positivos** muestra el pico correspondiente al ión molecular del compuesto con pérdida de un protón, confirmando así la formación del complejo heteroléptico buscado.



**E) [Bis(1,10-fenantrolina-4,7-di(fenilsulfonato)(2-(2'-piridil)imidazol)]  
rutenio(II), [Ru(s2d)<sub>2</sub>(pyim)]<sup>2-</sup>.**

El método empleado para la preparación de este indicador (apartado 6.2.3.) es similar al descrito para el [Ru(s2b)<sub>2</sub>((F15ap))]<sup>2-</sup>, dada la naturaleza aniónica de ambos compuestos. La purificación del complejo heteroléptico se realizó asimismo en columna rápida de LH-Sephadex, empleando como eluyente una disolución de hidróxido sódico 1 mM. De este modo, se consigue que el ligando pyim se encuentre en su forma básica conjugada, reteniéndose con mayor fuerza en la columna y permitiendo la elución de la impureza, que aparece en las primeras fracciones recogidas. La desorción del producto puro de la columna se produce por sustitución del eluyente alcalino utilizado por agua. La pureza de las fracciones eluidas que contienen producto se comprobó registrando la cinética de desactivación de la luminiscencia de las mismas, ya que la impureza que contienen algunas de ellas ([Ru(s2d)<sub>3</sub>]<sup>4+</sup>) exhibe un tiempo de vida en disolución acuosa perfectamente definido (0.95 μs) y muy superior al que presenta el complejo [Ru(s2b)<sub>2</sub>((pyim))]<sup>2-</sup> en medio básico. La confirmación estructural del producto se realizó utilizando las técnicas descritas anteriormente para el resto de los complejos sintetizados.

El espectro **IR** muestra una banda ancha de tensión N-H propia del imidazol.<sup>76</sup> Las bandas más intensas corresponden a las tensiones asimétrica y simétrica de los grupos sulfonato de los ligandos auxiliares.

El ligando s2d empleado en la preparación de este indicador se comercializa como mezcla de isómeros en los que los grupos sulfonato se sitúan en distintas posiciones de los anillos bencénicos (*m, m*; *m, p* y *p, p*, predominando el primero de ellos. Por este motivo, en la región del espectro de <sup>1</sup>H-RMN donde aparecen los protones de estos anillos aromáticos se observa un multiplete imposible de resolver. La asignación del resto de las señales del complejo se recogen en la tabla 23.

**Tabla 23.** Espectros de  $^1\text{H}$ -RMN del ligando pyim en su forma libre y cuando se encuentra formando parte de complejos homo y heteroléticos de Ru(II).

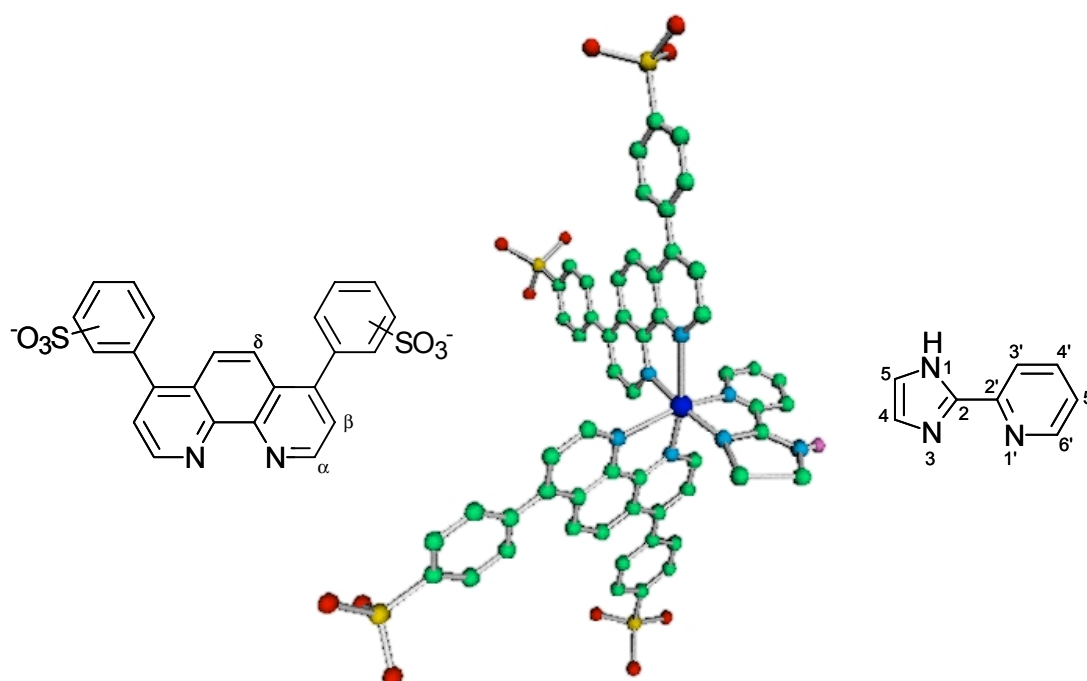
$^1\text{H}$ -RMN ppm	H $\alpha$	H $\beta$	H $\delta$	H5	H4	H3'	H4'	H5'	H6'	NH
pyim <sup>a</sup>	---	---	---	7.35	8.28	7.92	7.36	8.65	13.0	
[Ru(pyim) <sub>3</sub> ] <sup>2+</sup> <sup>a</sup>	---	---	---	7.61	6.56	8.65	7.98	7.35	7.70	3.7
[Ru(s2d) <sub>3</sub> ] <sup>2-</sup> <sup>b</sup>	8.45	7.80	8.32	---	---	---	---	---	---	
[Ru(s2d) <sub>2</sub> pyim] <sup>2-</sup> <sup>b</sup>	c	d	8.16	7.12	6.32	8.25	7.94	6.95	7.69	---

a) en DMSO-d<sub>6</sub>.<sup>76</sup>

b) en CD<sub>3</sub>OD.

c) 8.50, 8.32, 8.25 y 8.20 ppm.

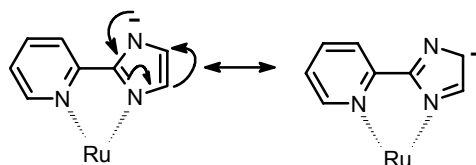
d) Señales incluidas en un multiplete : 7.85-7.72 ppm.



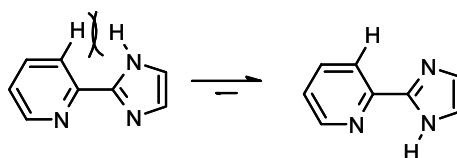
La ausencia del H intercambiable del imidazol es consecuencia de la existencia de pequeñas cantidades de NaOH en la muestra como resultado de la purificación por cromatografía en columna, empleando una disolución acuosa de NaOH como eluyente (ver sección 6.2.3. de la *Parte experimental*). La naturaleza del ión imidazolato del ligando pyim coordinado queda de manifiesto en el desplazamiento químico observado por los protones H3' y H5 del mismo (tabla 23), no sometidos a efectos importantes de anisotropía magnética de anillos vecinos.<sup>76</sup> Así, mientras que la señal de H5 de un imidazol coordinado a un Ru(II) aparece a 7.6 ppm,<sup>76</sup> el apantallamiento de más de 0.4 ppm observado para dicho



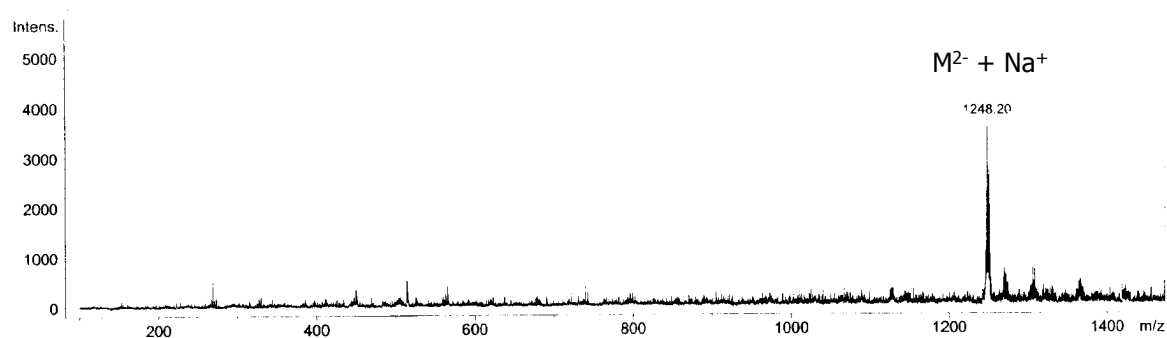
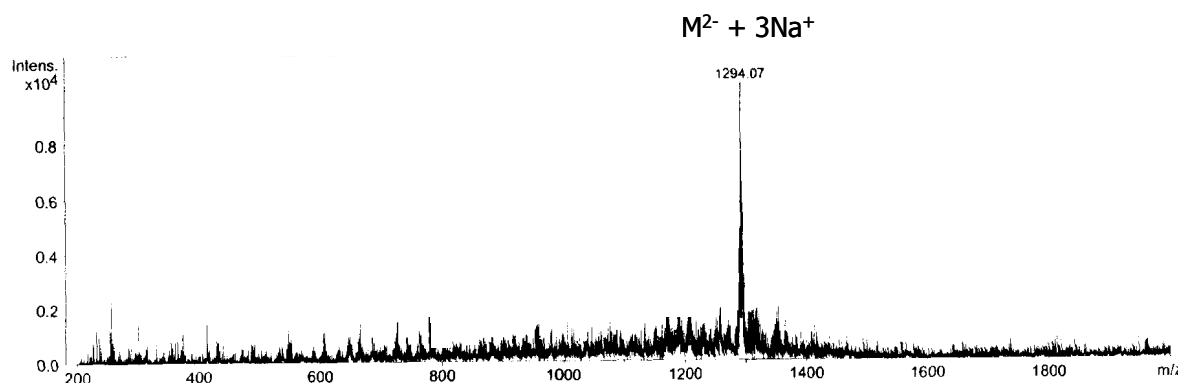
protón en el  $[\text{Ru}(\text{s2d})_2(\text{pyim})]^{2-}$  sólo puede justificarse si se encuentra en su forma básica conjugada:



Esta situación también se refleja en el desplazamiento químico del protón H3' del anillo de piridina ya que, siendo su posición normal 8.6 ppm por efecto desapantallante de Van der Waals provocado por la proximidad del H imidazólico (tabla 22),<sup>76</sup> aparece en el  $[\text{Ru}(\text{s2d})_2(\text{pyim})]^{2-}$  en una posición similar a la que ocupa en el ligando libre (8.2 ppm), donde la interacción estérica se alivia por rotación en torno al enlace C-C interheterocíclico:<sup>76</sup>



Los resultados del **microanálisis** realizado al nuevo indicador revelan la presencia de moléculas de agua y NaOH en el producto. Este resultado es razonable si se tiene en cuenta que el complejo ha sido purificado en medio básico. Al igual que sucedía con el complejo aniónico  $[\text{Ru}(\text{s2b})_2(\text{F15ap})]^{2-}$ , esta técnica no aclara cómo se compensan las cargas de los grupos sulfonato y el rutenio(II) en la molécula. Sin embargo, de nuevo en el **espectro de masas** por electropulverización y detección de iones **negativos** aparece el pico correspondiente al ion molecular  $\text{M}^{2-}$ , por lo que consideraremos de aquí en adelante que ésa es la carga global de estos indicadores aniónicos.



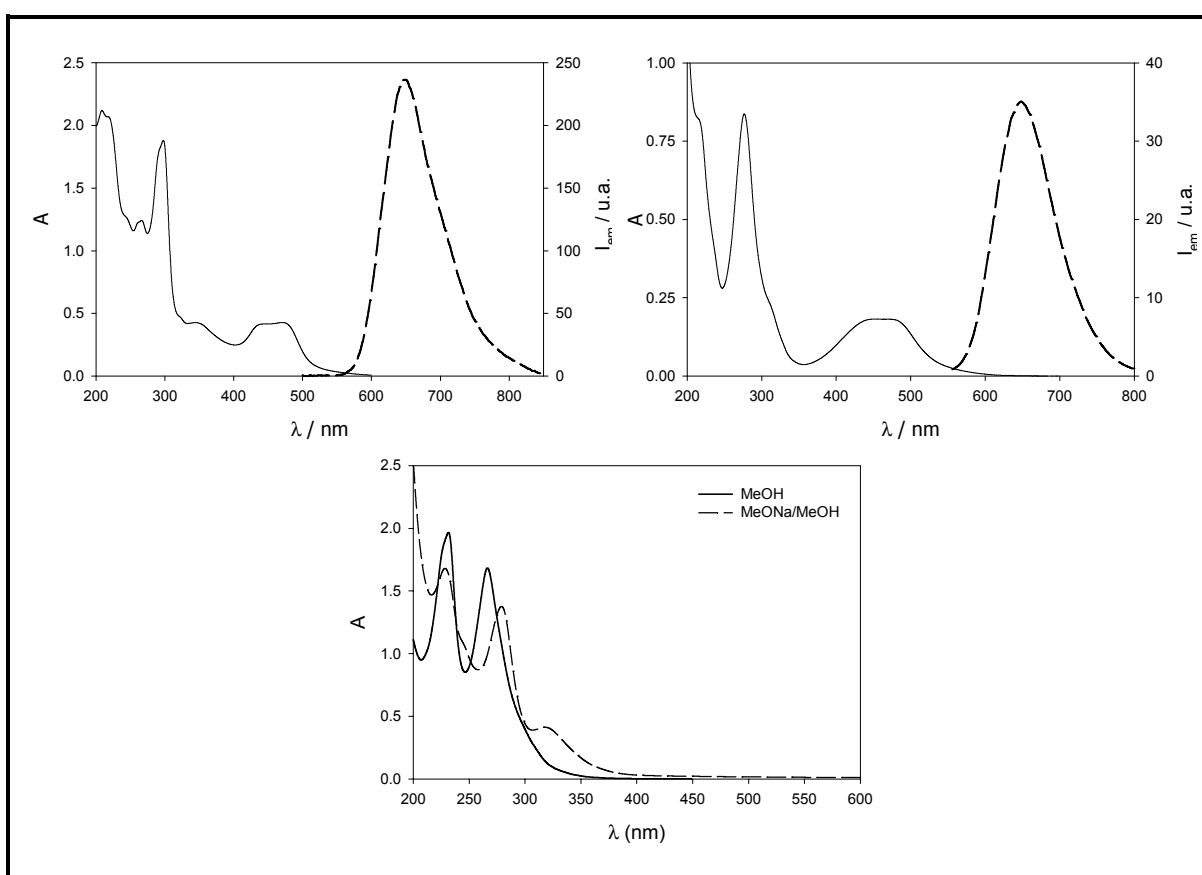
### 5.3. CARACTERIZACIÓN DE LOS NUEVOS INDICADORES EN DISOLUCIÓN.

#### 5.3.1. PARÁMETROS ESPECTROSCÓPICOS.

Una vez realizada la caracterización estructural de los indicadores sintetizados, es necesario determinar algunos parámetros espectroscópicos de interés, como son las longitudes de onda máximas de absorción en el visible y de emisión (tabla 24), imprescindibles para excitar adecuadamente las sondas y monitorizar después el cambio producido en su luminiscencia por la concentración de iones hidrógeno presentes en el medio.

Todos los indicadores muestran, además de intensas **bandas de absorción** en la región *ultravioleta* propias de los tránsitos electrónicos  $\pi \rightarrow \pi^*$  intraligando, las bandas de absorción  $d \rightarrow \pi^*$  (MLCT) en la zona *visible* del espectro

electromagnético que caracterizan a los complejos de Ru(II) (ver epígrafe 3.4.1. de la sección *Antecedentes generales*), desde las que se produce la emisión de luminiscencia. El ligando perfluoroamida, asimismo, presenta una banda de absorción  $n \rightarrow \pi^*$  en torno a 340 nm<sup>122</sup> cuya intensidad, como se detalla en apartados posteriores, depende fuertemente del pH del medio, tanto en el ligando libre como complejoado al metal (ver figura 51). Una banda de similares características se observa también (aprox. a 350 nm) en medio alcalino en el complejo [bis(2,2'-bipiridina)(4,7-dihidroxi-1,10-fenantrolina)]rutenio(II).<sup>88</sup>



**Figura 51.** Espectros de absorción UV-VIS (—) y emisión de luminiscencia (- - -) de los complejos  $[\text{Ru}(\text{s2b})_2(\text{F15ap})]^{2-}$  (izq.) y  $[\text{Ru}(\text{s2d})_2(\text{pyim})]^{2-}$  (dcha.), a 25.0 °C, en disoluciones acuosas equilibradas al aire. Los espectros de emisión, sin corregir por la respuesta instrumental, se registraron excitando en el máximo de absorción de la banda MLCT. En la figura inferior se muestran los espectros de absorción del ligando libre F15ap protonado (metanol) y en medio fuertemente alcalino (metóxido sódico/metanol).

Los **espectros de emisión** registrados exhiben un gran desplazamiento de Stokes, debido a la relajación vibracional que se produce tras la excitación y a la naturaleza triplete del estado excitado emisor. El efecto conjugativo del grupo sulfonato determina una importante estabilización del LUMO ( $\pi^*$ ) de los ligandos azaheterocíclicos quelatantes que contienen dichos grupos (s2b y s2d). Por este motivo, la emisión desde el estado excitado  $^3\text{MLCT}$  ( $d \rightarrow \pi^*$ ) de los complejos de Ru(II) que poseen uno o más ligandos sulfonados siempre se producirá (regla de Kasha) desde el orbital  $\pi^*$  de los mismos, por su menor energía en comparación con la altura energética de otros ligandos quelatantes no sustituidos o dotados de grupos electrodadores. Esto se traduce en máximos de emisión superiores a los obtenidos con el resto de los complejos estudiados (tabla 24).

**Tabla 24.** Longitudes de onda máximas de absorción ( $\lambda_{\text{abs}}^{\text{máx}}$ ) y emisión ( $\lambda_{\text{em}}^{\text{máx}}$ ) de los indicadores de pH sintetizados. Se recoge asimismo, para alguno de ellos, los coeficientes de absorción molar correspondientes a las  $\lambda_{\text{abs}}^{\text{máx}}$  y los rendimientos cuánticos de emisión ( $\Phi_{\text{em}}$ ) en agua.

Indicador	$\lambda_{\text{abs}}^{\text{máx}} / \text{nm}$ ( $\epsilon / \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) <sup>a</sup>	$\lambda_{\text{em}}^{\text{máx}} / \text{nm}$ <sup>b</sup>	$\Phi_{\text{em}}$ <sup>c,d</sup>
[Ru(phen) <sub>2</sub> (5-NH <sub>2</sub> p)] <sup>2+</sup>	202, 221, 262, 420(h), 449 <sup>d</sup>	600 <sup>d</sup>	0.069
[Ru(phen) <sub>2</sub> (F15ap)] <sup>2+</sup>	207, 228, 265, 423(h), 450 <sup>d</sup>	607 <sup>d</sup>	--- <sup>f</sup>
[Ru(F15ap) <sub>3</sub> ] <sup>2+</sup>	219, 264, 337, 429(h), 450 <sup>e</sup>	602 <sup>e</sup>	--- <sup>f</sup>
[Ru(s2b) <sub>2</sub> (F15ap)] <sup>2-</sup>	209 (75000), 219 (74000), 263 (75000), 297 (70000), 341 (12600), 445(h), 465 (18000) <sup>d</sup>	644 <sup>d</sup>	0.015
[Ru(s2d) <sub>2</sub> (pyim)] <sup>2-</sup>	215 (h, 90000), 277 (94000), 313 (h), 449 (20000), 473 (20000) <sup>d</sup>	648 <sup>d</sup>	0.002

a)  $\lambda \pm 1 \text{ nm}$ ,  $\epsilon \pm 5\%$  ( $n = 4$ ).

b)  $\lambda \pm 1 \text{ nm}$ . Valores sin corregir por la respuesta instrumental.

c) 25.0 °C, argon. Típicamente,  $\Phi_{\text{em}} \pm 5\%$  ( $n = 5$ ).

d) agua, (h): hombro.

e) metanol.

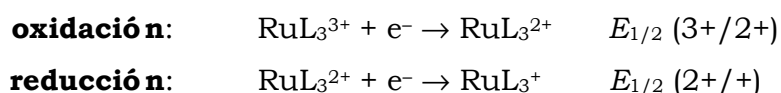
f) No determinado

Se determinaron asimismo los **coeficientes de absorción molar** y los **rendimientos cuánticos** de emisión de los indicadores que fueron finalmente seleccionados para construir el optodo de pH (los dos complejos de Ru(II) sulfonados, ver *Parte experimental* apartado 6.3.). El bajo  $\Phi$  obtenido para el luminóforo con un ligando *piridil-imidazol* puede deberse, como se indicó anteriormente en el apartado correspondiente al diseño molecular de las sondas (5.1.), a la rápida desactivación no radiativa que se produce desde el estado

excitado emisor del complejo, vía conversión interna y relajación vibracional a través del enlace N-H de esta molécula con transferencia de energía al disolvente.<sup>126</sup> No obstante, el factor determinante de la eficaz conversión interna  $\pi^* \rightarrow d$  es sin duda la baja energía del orbital  $\pi^*$  (LUMO) de los ligandos quelatantes de tipo azol (ley del desnivel energético),<sup>22</sup> en comparación con sus homólogos de seis miembros de tipo azina.

### 5.3.2. CARACTERIZACIÓN ELECTROQUÍMICA.

Los primeros procesos de oxidación y reducción de una molécula involucran, respectivamente, a sus orbitales HOMO y LUMO. En los complejos luminiscentes de Ru(II), como se indicó anteriormente (ver también apartado 3.3. de los *Antecedentes generales* de esta Memoria), el orbital ocupado de mayor energía (HOMO) corresponde al  $t_{2g}$  del metal, siendo el  $\pi^*$  del ligando el orbital vacío de menor energía (LUMO). Por tanto, se puede obtener información del contenido energético de estos orbitales a partir de los primeros potenciales de oxidación y reducción que muestran los indicadores:



La evaluación en disoluciones acuosas de diferente acidez de los complejos de Ru(II) con ligandos perfluoroamida reveló, como se expone más adelante, distinto comportamiento en la emisión del indicador homoléptico con respecto a los complejos heterolépticos con tales ligandos ácidos. Así, al aumentar la alcalinidad del medio, el  $[\text{Ru}(\text{F15ap})_3]^{2+}$  ve incrementada su luminiscencia, mientras que la emisión del  $[[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{F15ap})]^{2+}$  se desactiva. Para justificar este hecho se determinaron experimentalmente, por voltamperometría cíclica, los potenciales de semionda de la familia de complejos  $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$ ,  $[[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{F15ap})]^{2+}$  y  $[\text{Ru}(\text{F15ap})_3]^{2+}$  (ver *Parte experimental*, apartado 6.3.).

Teniendo en cuenta que el proceso de reducción electroquímica de los complejos polipiridílicos de Ru(II) está localizado secuencialmente en cada uno de

los ligandos quelatantes,<sup>136</sup> los valores del primer potencial de reducción de los mismos nos informan del contenido energético del orbital  $\pi^*$  aceptor del electrón. De esta forma, se puede apreciar claramente que el orbital  $\pi^*$  del *F15ap* se encuentra inestabilizado con respecto al ligando phen, por el carácter electrodonador (+K) del grupo funcional amida, como resulta de la comparación entre sí de los correspondientes complejos heterolépticos (tabla 25). Estas características electrónicas determinan la diferente naturaleza del estado excitado emisor <sup>3</sup>MLCT de los complejos  $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{F15ap})]^{2+}$  (centrado en el ligando *phen*) y  $[\text{Ru}(\text{F15ap})_3]^{2+}$  (centrado en el ligando *F15ap*) anteriormente mencionados.

**Tabla 25.** Potenciales de oxidación y reducción ( $\pm 0.01$  mV) de una familia de complejos de Ru(II), en acetonitrilo, respecto al ENH (electrodo normal de hidrógeno).

	$[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$	$[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{F15ap})]^{2+}$	$[\text{Ru}(\text{F15ap})_3]^{2+}$
$E_{1/2} (3+/2+) / \text{V}$	1.26	1.29	1.38
$E_{1/2} (2+/+) / \text{V}$	-1.39	-1.40	-1.63

### 5.3.3. COMPORTAMIENTO ÁCIDO-BASE EN DISOLUCIÓN. SELECCIÓN DE LOS INDICADORES.

El registro preliminar de los espectros de absorción de los luminóforos sintetizados en disoluciones tamponadas a dos valores de pH extremos (pH 3.0 y 11.0), permitió obtener las longitudes de onda de absorción de las especies ácida y básica, así como la longitud de onda de excitación donde ambas especies presentan el mismo coeficiente de absorción molar (puntos *isosbéticos*). Ello permite, posteriormente, poder establecer cuál de estos indicadores presenta la máxima sensibilidad en el intervalo óptimo de medida para aplicaciones

<sup>136</sup> a) DeArmond, M. K. y Carlin, C. M., *Coord. Chem. Rev.*, **1981**, 36, 325. b) Vlcek, A. A., *Coord. Chem. Rev.*, **1982**, 43, 39.

medioambientales (pH 6.0 – pH 8.0) a partir de los cambios que experimenta su luminiscencia con el pH.

**Tabla 26.** Longitudes de onda máximas de absorción y emisión (sin corregir) de las especies ácida y básica de los complejos luminiscentes de Ru(II) evaluados (15 μM en disoluciones acuosas de tampón fosfato 10 mM, equilibradas al aire y a 25.0 °C).

Indicador	λ / nm (absorción)		λ / nm (emisión)	
	AH <sup>+</sup>	A	AH <sup>+</sup>	A
[Ru(pzth) <sub>3</sub> ] <sup>2+</sup>		460	813	653
[Ru(bpy) <sub>2</sub> (ddz)] <sup>2+</sup>		404	(a)	617
	HA	A <sup>-</sup>	HA	A <sup>-</sup>
[Ru(phen) <sub>2</sub> (tanphen)] <sup>2+</sup>		427	635	(a)
[Ru(phen) <sub>2</sub> (5-NH <sub>2</sub> p)] <sup>2+</sup>		450	600	(a)
[Ru(phen) <sub>2</sub> (F15ap)] <sup>2+</sup>		450	611	595
[Ru(F15ap) <sub>3</sub> ] <sup>2+</sup>		365, 463	615	619
[Ru(s2b) <sub>2</sub> (F15ap)] <sup>2-</sup>	344, 464	344, 474	639	648
[Ru(s2d) <sub>2</sub> (pyim)] <sup>2-</sup>	451	459	645	673

a) No determinado.

Los indicadores con grupos funcionales de tipo amino (**[Ru(phen)<sub>2</sub>(5-NH<sub>2</sub>p)]<sup>2+</sup>** y **[Ru(phen)<sub>2</sub>(tanphen)]<sup>2+</sup>**) no modifican su luminiscencia en el intervalo  $2 \leq \text{pH} \leq 9$ . Sin embargo, por encima de este último valor de pH su emisión se ve progresivamente desactivada, sin que su espectro de absorción sufra variación alguna en el intervalo ensayado ( $2 \leq \text{pH} \leq 11$ ). Ello indica que la variación de la luminiscencia de estos complejos que se observa en medio alcalino no proviene de un proceso ácido-base en el estado fundamental.

El grupo amino situado en la posición 5 del sistema de quinolina posee una acidez superior a la que presentan típicamente los grupos amino aromáticos, gracias a la eficaz deslocalización electrónica que proporciona el anillo quinolínico al anión amiduro cuando éste se sitúa en posición conjugada con el átomo de nitrógeno heterocíclico. Ésta es la situación que se da, precisamente, en los ligandos *5-NH<sub>2</sub>p* y *tanphen*. La coordinación de los mismos al átomo metálico, Ru(II), debe incrementar adicionalmente la acidez de los grupos amino, como se ha observado para otros grupos funcionales de carácter ácido (CO<sub>2</sub>H<sup>121</sup> y OH<sup>72,88,113,121</sup>). Este efecto ha de acentuarse al producirse la excitación electrónica al estado <sup>3</sup>MLCT de dichos compuestos de coordinación. El carácter localizado de dicho estado excitado provocará que el electrón promocionado desde el orbital *d*

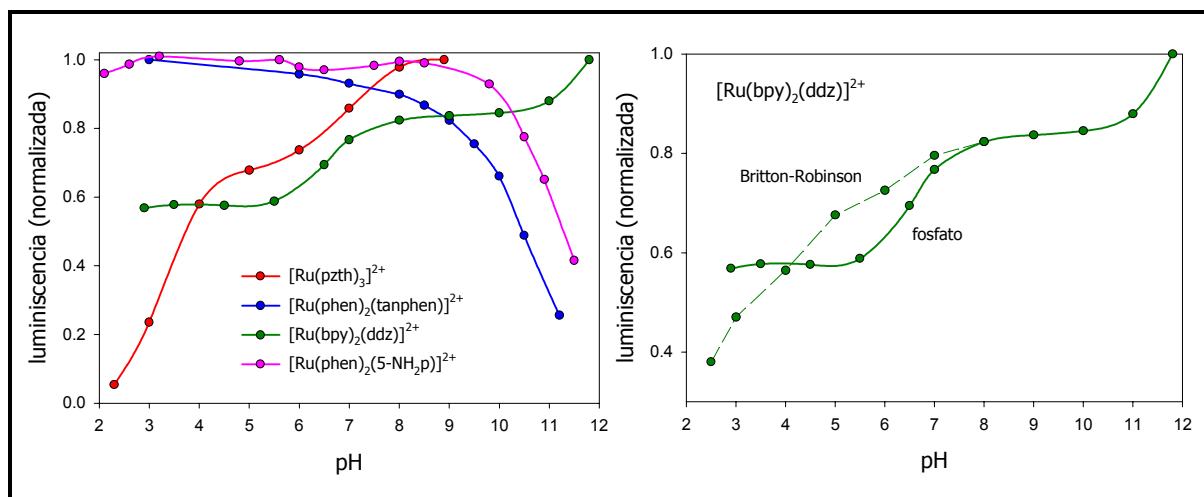
del metal se sitúa en el orbital  $\pi^*$  de los ligandos *phen* que constituyen la esfera de coordinación de los complejos heterolépticos ( $[\text{Ru}(\text{phen})_2(5\text{-NH}_2\text{p})]^{2+}$  y  $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{tanphen})]^{2+}$ ), ya que el carácter fuertemente electrodonador del sustituyente  $\text{NH}_2$  provoca la inestabilización del orbital  $\pi^*$  de los ligandos que lo contienen. Dicha localización electrónica determina que el estado excitado MLCT de tales complejos posea una acidez superior a la del correspondiente estado fundamental de los mismos. No obstante, como se ha observado para otros complejos luminiscentes de Ru(II) con ligandos heterocíclicos cuya basicidad se incrementa notablemente con la excitación electrónica,<sup>84b</sup> no podemos afirmar que se produzca un equilibrio ácido-base en el estado excitado, sino que puede tratarse de una desactivación *irreversible* por transferencia protónica a la forma básica del tampón presente en el medio fuertemente alcalino (ej.  $\text{PO}_4^{3-}$  en nuestro caso, figura 52).

A pesar de que los complejos de Ru(II) con nitrógenos heterocíclicos protonables ( $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{ddz})]^{2+}$  y  $[\text{Ru}(\text{pzth})_3]^{2+}$ ) ven incrementada su luminiscencia al aumentar el pH de la disolución (figura 52), el intervalo concreto de máxima variación depende considerablemente del tipo de disolución reguladora empleada. Esto se confirmó sustituyendo el tampón fosfato por tampón universal Britton-Robinson (mezclas de ácidos cítrico, bórico y fosfórico)<sup>137</sup> y repitiendo el estudio con la sonda luminiscente que contiene el ligando *ddz* (figura 52). Los estudios publicados sobre la emisión que muestra el indicador  $[\text{Ru}(\text{pzth})_3]^{2+}$  en distintas disoluciones reguladoras revelan que se produce una transferencia protónica *irreversible* desde la especie ácida del tampón al complejo cuando éste se encuentra en su estado excitado, lo que explica la dependencia que muestra su luminiscencia con los propios equilibrios ácido-base del regulador de pH.<sup>84,101</sup>

---

<sup>137</sup> Perrin, D. D. y Dempsey, B., *Buffers for pH and metal ion control*, Chapman and Hall, Londres (Reino Unido), 1974; p. 48.

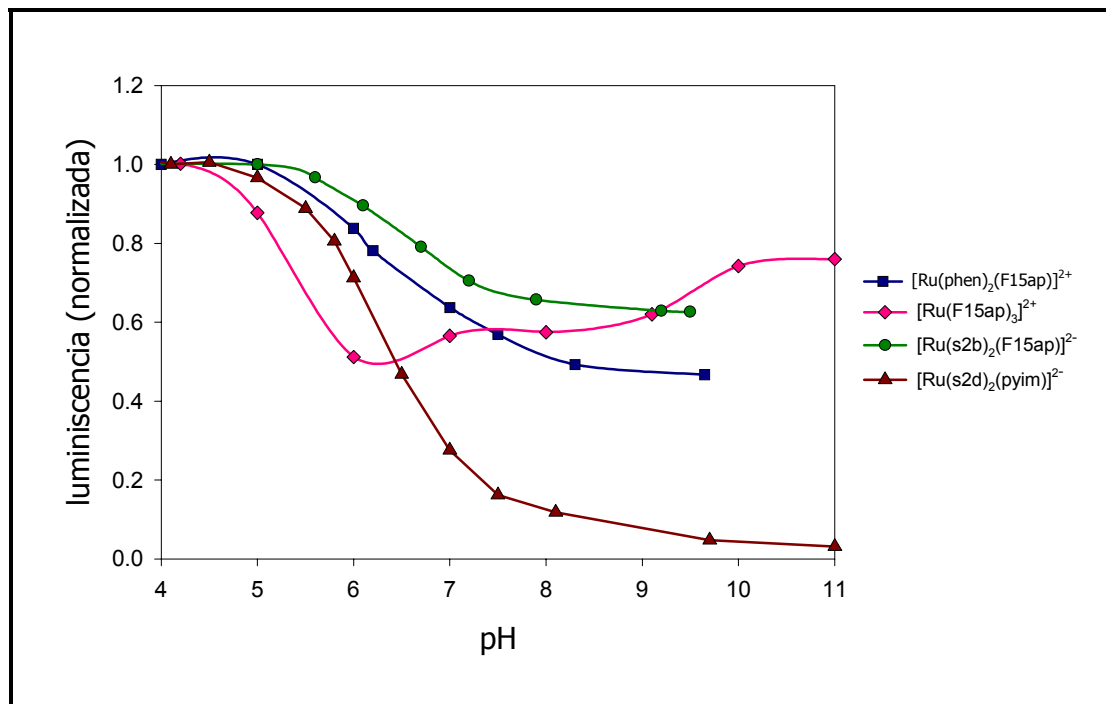




**Figura 52.** (Izq.) Variación con el pH de la luminiscencia de los complejos de Ru(II) con centros ácido-base sintetizados con anterioridad en nuestro laboratorio y del nuevo indicador con un ligando 5-amino-1,10-fenantrolina. La gráfica de la derecha muestra la dependencia de la emisión del complejo  $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{ddz})]^{2+}$  de la disolución reguladora empleada. Todos los procesos observados son completamente **reversibles**. Las medidas se realizaron en disoluciones reguladoras de fosfato (o Britton-Robinson) 10 mM, equilibradas al aire y a 25 °C, excitando las sondas en el máximo de absorción de su banda MLCT.

Los nuevos complejos de rutenio con un ligando de tipo **amida** sintetizados, sufren la pérdida del protón amídico a valores de pH inferiores a los que típicamente muestra este grupo funcional (generalmente más alcalinos, ver tabla 17, apartado 5.1.), como se demuestra de los espectros de absorción UV-VIS registrados del ligando F15ap en medio fuertemente alcalino, donde la banda  $n \rightarrow \pi^*$  de la perfluoroamida sufre un desplazamiento hipercrómico como consecuencia de la pérdida de dicho protón, siendo este cambio completamente reversible (figura 51). La mayor acidez de esta amida aromática no sólo se debe a la coordinación del ligando al metal, sino también a la presencia en la molécula de la larga cadena perfluorada que, por efecto inductivo  $-I$ , aumenta la acidez de dicho protón, acercando el valor del  $pK_a$  del grupo amida al óptimo para las medidas en aguas que se pretenden realizar. Tras la excitación del complejo, el defecto de carga que se origina sobre el metal tiende a ser compensado por los ligandos. En este sentido, el ligando ácido-base en su forma desprotonada es particularmente eficaz pues se incrementan sus propiedades  $\pi$ -dadoras. Como resultado, el estado MLCT se estabiliza y, con ello, aumenta la longitud de onda de emisión en la especie básica al tiempo que disminuye su emisión al desactivarse desde un estado excitado energéticamente inferior (ley del salto energético). En el complejo homoléptico  $[\text{Ru}(\text{F15ap})_3]^{2+}$ , sin embargo, la

desactivación de la emisión únicamente tiene lugar cuando se pierde el protón del primer ligando F15ap (figura 53), mostrando un aumento de la luminiscencia a partir de pH 6. Esto es debido a que al desprotonarse sólo uno de los ligandos el indicador pierde la simetría que le caracteriza por ser homoléptico, recuperándola en medio alcalino con la pérdida de los tres protones amídicos y, con ello, su luminiscencia original.



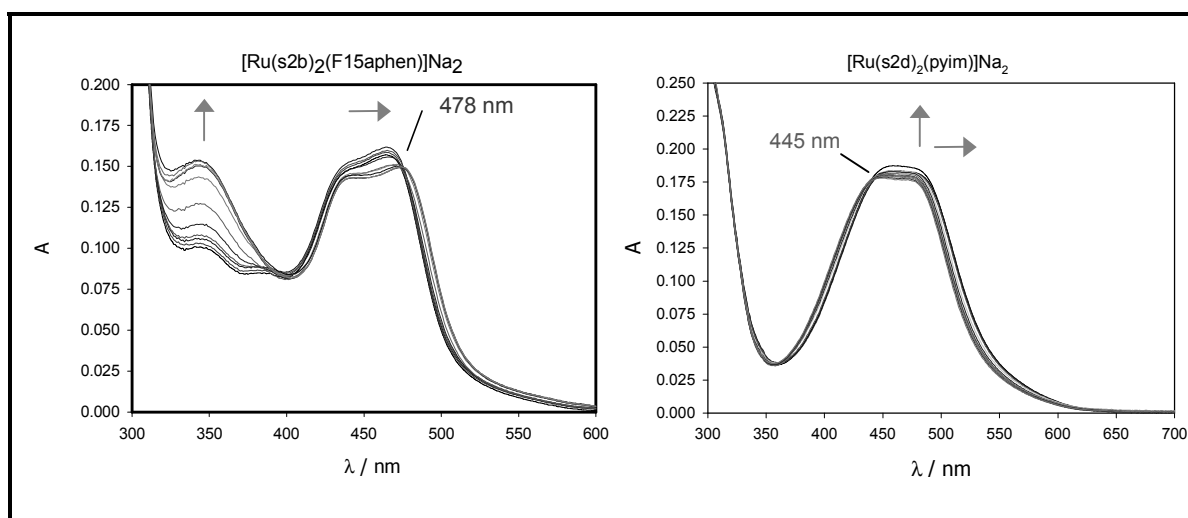
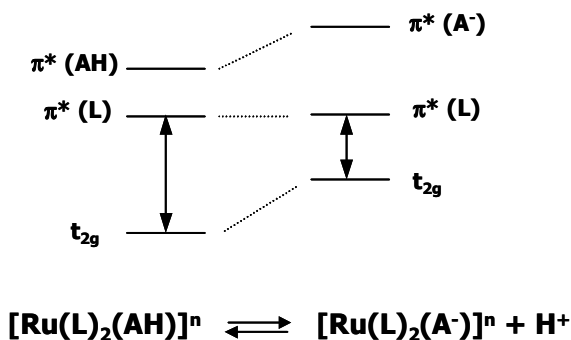
**Figura 53.** Gráfica comparativa de la sensibilidad de los nuevos complejos de Ru(II) sintetizados a los cambios del pH del medio. Los espectros de emisión se registraron a 25.0 °C en disoluciones tamponadas (fosfato 10 mM) y equilibradas al aire en las que los indicadores se encuentran en concentración 10-15  $\mu$ M. El luminóforo  $[\text{Ru}(\text{F15ap})_3]^{2+}$  se evaluó añadiendo a la disolución reguladora un 17% de MeOH, para evitar la precipitación del indicador.

Teniendo en cuenta el excelente comportamiento frente al pH exhibido por el indicador  $[\text{Ru}(\text{s2d})_2(\text{pyim})]^{2-}$  en el intervalo óptimo de medida (figura 53), donde pierde su emisión como consecuencia de la desprotonación del nitrógeno heterocíclico no quelatado del ligando sensible al pH (piridil-imidazol), se llevó a cabo una caracterización más exhaustiva de sus propiedades espectroscópicas en función de la acidez/basicidad del medio, con objeto de estudiar el comportamiento ácido-base de este complejo en su estado fundamental y excitado, así como establecer con precisión la constante de acidez de esta sonda.

El mismo estudio se realizó con el indicador **[Ru(s2b)<sub>2</sub>(F15ap)]<sup>2-</sup>** ya que, a pesar de presentar una sensibilidad al pH ligeramente inferior a su análogo catiónico (Ru(phen)<sub>2</sub>(F15ap)<sup>2+</sup>), la presencia de los grupos sulfonato en la molécula facilita su posterior anclaje a un soporte polimérico adecuado (apartado 5.4.).

### A) CONSTANTE DE ACIDEZ EN EL ESTADO FUNDAMENTAL.

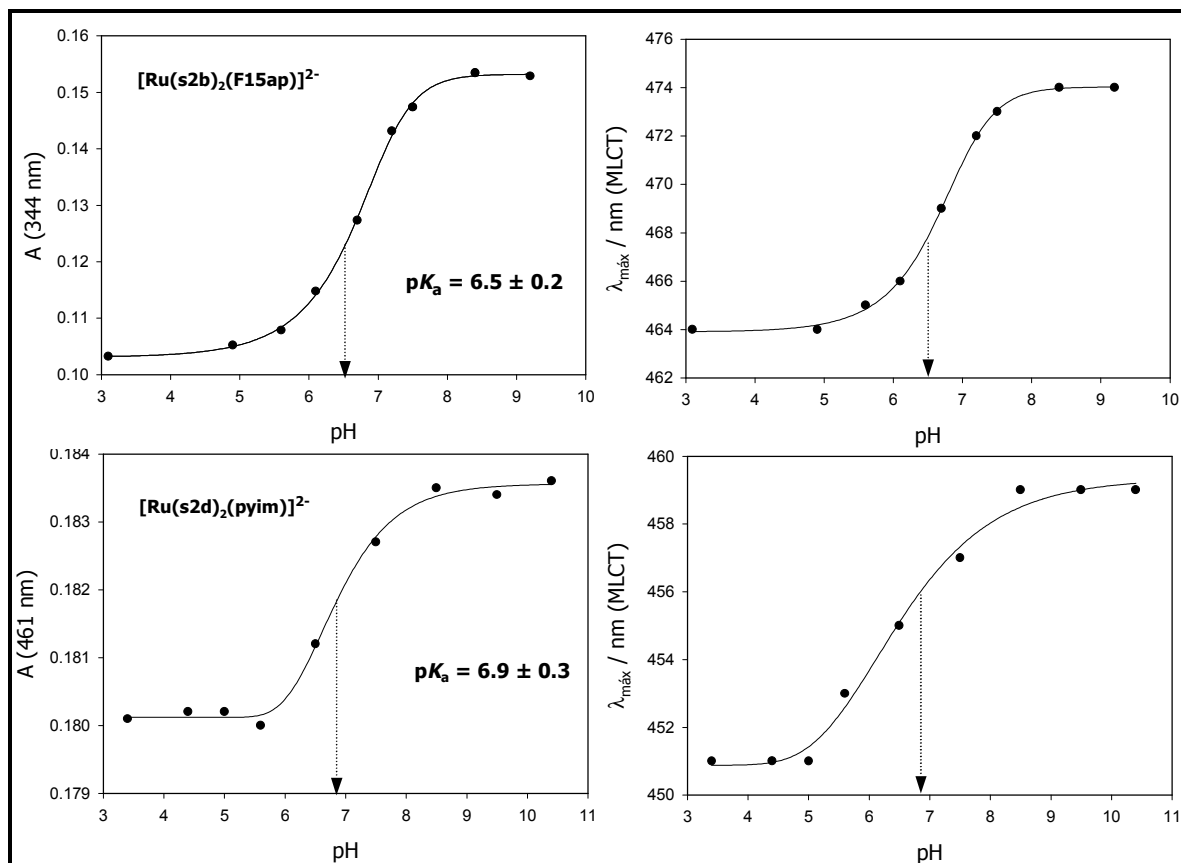
En la figura 54 se observa la variación con el pH de los espectros de absorción de los dos indicadores seleccionados. El complejo **[Ru(s2b)<sub>2</sub>(F15ap)]<sup>2-</sup>** muestra una intensa banda de absorción n→π\* propia del ligando sensible al pH (F15ap, 340 nm), la cual sufre un desplazamiento hipercrómico conforme aumenta la basicidad de la disolución. Asimismo, se aprecia un desplazamiento batocrómico de su banda MLCT, correspondiente a transiciones electrónicas de transferencia de carga metal-ligando (t<sub>2g</sub>→π\*). Con la pérdida del protón amídico aumenta el carácter σ dador del ligando perfluorado, ya que se incrementa la densidad de carga negativa sobre el nitrógeno heterocíclico quelatado al metal. Esto provoca una desestabilización del orbital t<sub>2g</sub> del rutenio, como consecuencia de la menor capacidad del ligando sensible al pH para aceptar carga del metal, lo que se traduce en una aproximación en energía de este orbital t<sub>2g</sub> a los orbitales π\* de los ligandos auxiliares, los cuales permanecen inalterados ante los cambios de pH. Por este motivo, en medio alcalino, la banda MLCT observada en el espectro de absorción se desplaza hacia longitudes de onda superiores (ver esquema). El mismo efecto se observa con la desprotonación del imidazol en el indicador **[Ru(s2d)<sub>2</sub>(pyim)]<sup>2-</sup>**, aunque el desplazamiento observado de esta banda es mucho menos acusado. En ambos complejos, los espectros de absorción son coincidentes cuando se recupera el pH inicial y, por tanto, puede afirmarse que no tiene lugar la hidrólisis de la perfluoroamida ni la sustitución de ligando en medio alcalino.



**Figura 54.** Variación de los espectros de absorción UV-VIS de los complejos  $[\text{Ru}(\text{s2b})_2(\text{F15ap})]^{2-}$  y  $[\text{Ru}(\text{s2d})_2(\text{pyim})]^{2-}$  con el pH, registrados a 25.0 °C en medio tamponado (fosfato 10 mM). La dirección de las flechas establece el cambio producido por el aumento de la alcalinidad desde pH 2 a pH 11, que origina los puntos *isosbéticos* observados (478 y 445 nm). La concentración de los indicadores se mantuvo constante en todas las medidas (11 y 13  $\mu\text{M}$ , respectivamente).

El equilibrio que se establece entre las especies ácida y básica en estado fundamental de estos dos complejos está caracterizado por la constante de acidez  $K_a$ . Esta constante puede determinarse a partir de los cambios que experimenta el espectro de absorción del indicador con el pH (valoración espectrofotométrica, ver *Parte experimental* ecuación 32, apartado 6.3.). Asimismo, el cruce de espectros proporciona el denominado **punto isobético**, longitud de onda donde coinciden los  $\epsilon$  de las dos especies y que confirma la existencia de un equilibrio entre ambas (figura 54). La representación gráfica del desplazamiento que sufren el máximo de absorción en el visible (MLCT) y la absorbancia del indicador, registrada en un punto en el que la diferencia entre los coeficientes de absorción molar de las especies ácida y básica sea máxima (para minimizar el error) puede ajustarse a

una sigmoide, cuyo punto de inflexión corresponde igualmente al  $pK_a$ , como se demuestra en la figura 55.



**Figura 55.** Representación gráfica de la variación que experimenta con el pH la absorbancia de los indicadores  $[\text{Ru}(\text{s2b})_2(\text{F15ap})]^{2-}$  y  $[\text{Ru}(\text{s2d})_2(\text{pyim})]^{2-}$  (izq.) y su máximo de absorción en el visible (MLCT, dcha.). El  $pK_a$  se ha calculado a partir de los datos experimentales y aplicando la ecuación 33 (*Parte experimental*; 95% de confianza,  $n=5$  y  $n=3$ , respectivamente). La línea de puntos que marca dicho valor corresponde, a su vez, con el punto de inflexión de la curva.

El valor así obtenido para la constante de acidez del complejo  $[\text{Ru}(\text{s2b})_2(\text{F15ap})]^{2-}$  ( $pK_a = 6.5$ ) indica que en su estado fundamental esta amida presenta una acidez superior a la típica de este grupo funcional, debido a la presencia de los átomos de fluor fuertemente electroattractores en la molécula y a la quelatación de este ligando al metal. La disminución en la constante de acidez de amidas por efecto de átomos de halógeno en la molécula se ha observado, por ejemplo, en la *tricloroacetanilida*, cuyo  $pK_a$  disminuye 8 unidades con respecto a la *acetanilida* (tabla 17, apartado 5.1.). Por otra parte, el  $pK_a$  determinado para el indicador sulfonado que contiene un ligando **piridil-imidazol** (6.9) es muy

inferior al que caracteriza la ionización del ligando libre ( $\text{pyimH} \rightarrow \text{pyim}^-$ ,  $\text{p}K_a = 13.4$ ).<sup>138</sup> Este hecho se ha observado en la mayoría de los complejos de coordinación de metales de transición y se atribuye a la fuerte cesión  $\sigma$  que tiene lugar desde el ligando al metal y que reduce la densidad electrónica sobre el ligando, aumentando así su acidez.<sup>139</sup> Los datos recogidos en la bibliografía muestran un  $\text{p}K_a$  para el complejo  $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{pyim})]^{2+}$  en medio metanol-agua (5%, v/v) de 7.9, una unidad por encima del que hemos observado al sustituir las bipyridinas como ligandos auxiliares por dos moléculas de difenilfenantrolina disulfonada. Esto se debe probablemente a la mayor capacidad electrodonadora de la entidad  $[\text{Ru}(\text{bpy})_2]$  con respecto al  $[\text{Ru}(\text{s}2\text{d})_2]$  en el nuevo indicador sensible al pH.<sup>126</sup>

## B) CONSTANTE DE ACIDEZ EN EL ESTADO EXCITADO.

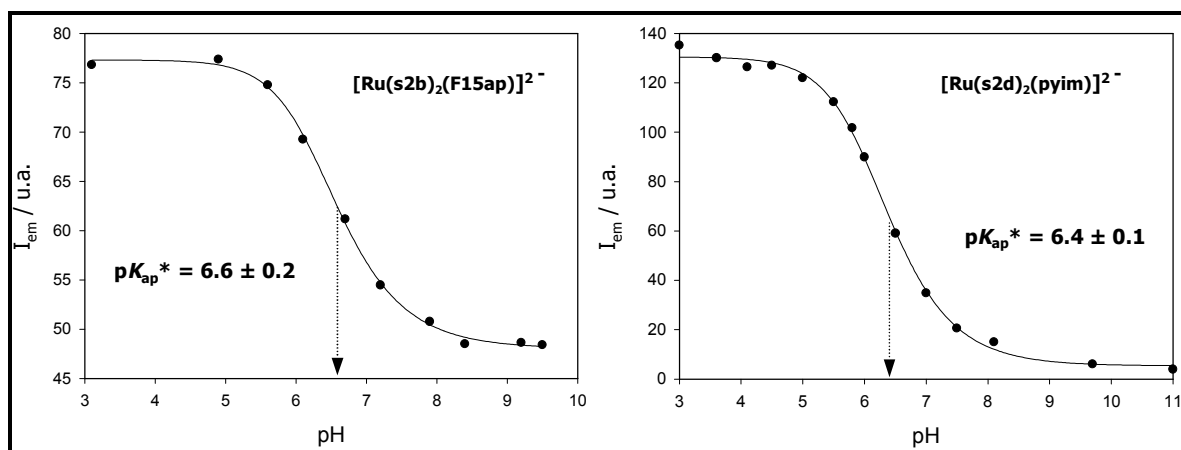
Las propiedades ácido-base de estos complejos en su estado excitado pueden ofrecer una valiosa información sobre la redistribución de carga que se produce tras la excitación, así como sobre la naturaleza del estado excitado emisor. Así, cuando la acidez del complejo aumenta con respecto al estado fundamental ( $\text{p}K_a^* < \text{p}K_a$ ), se puede afirmar que el ligando ácido-base no está implicado directamente en los procesos emisivos.<sup>139</sup> Esto se debe a que tras la excitación se promociona un electrón desde el metal hasta el orbital  $\pi^*$  de un ligando, quedando el centro metálico momentáneamente con carga formal +3. Por el contrario, una menor acidez se explica por el aumento de la densidad electrónica del ligando sensible al pH como resultado de la transferencia de carga intramolecular del metal al ligando.<sup>139</sup>

Con el fin de determinar la constante de acidez en el estado excitado de los dos complejos de Ru(II) seleccionados ( $K_a^*$ ), se excitaron las sondas en los puntos *isosbéticos* previamente obtenidos a partir de las medidas de absorbancia, registrando los cambios en la intensidad de luminiscencia de los indicadores

<sup>138</sup> Boggess, R. K. y Martin, R. B., *Inorg. Chem.*, **1974**, 13, 1525.

<sup>139</sup> Vos, J. G., *Excited-State Acid-Base Properties of Inorganic Compounds*, *Polyhedron*, **1992**, 11, 2285.

producidos por la concentración de protones del medio (figura 56). De forma análoga al procedimiento seguido para la determinación de  $K_a$ , la valoración espectrofluorimétrica realizada permite obtener la constante de acidez *aparente* ( $K_{ap}^*$ ) del estado excitado (ecuación 33, *Parte experimental*), denominada así por no corresponder realmente a la constante de equilibrio del estado excitado, ya que no tiene en cuenta las vías de desactivación radiativas que compiten con el equilibrio. Para obtener el valor real ( $pK_a^*$ ) es necesario realizar la correspondiente corrección con los valores de los tiempos de vida de desexcitación característicos de la especie ácida y básica (ecuación 34, *Parte experimental*). De nuevo el punto de inflexión de la sigmoide obtenida al representar los datos experimentales proporciona también el valor de  $pK_{ap}^*$ .



**Figura 56.** Desactivación de la luminiscencia de los dos indicadores seleccionados con el aumento de la basicidad del medio. La intensidad de emisión recogida en las gráficas corresponde a la  $\lambda_{em}^{max}$  de la forma protonada (640 y 645, respectivamente, sin corregir por la respuesta instrumental). Las disoluciones de medida (tampón fosfato 10 mM) están equilibradas al aire, a 25.0 °C. Para determinar el  $pK_a$  se aplicó la ecuación 33 (*Parte experimental*, 95% de confianza,  $n = 5$  y  $n = 7$ , respectivamente).

A pesar de que en medio alcalino se produce la desactivación parcial de la luminiscencia de la sonda, en el complejo  $[\text{Ru}(\text{s2b})_2(\text{F15ap})]^{2-}$  tanto la forma ácida como la básica son luminiscentes. Esta última muestra un espectro de emisión desplazado aprox. 10 nm batocrómicamente con respecto al que presenta el indicador protonado, confirmando que la desactivación se produce en medio alcalino desde un estado excitado energéticamente inferior, debido a la estabilización del estado MLCT como consecuencia de la compensación del defecto de carga que se produce desde el ligando al metal tras la excitación

electrónica. Este efecto está potenciado en medio básico por aumentar las propiedades  $\pi$ -dadoras del ligando ácido-base. Por otra parte, el indicador con un ligando **piridil-imidazol** que apenas emite en su forma desprotonada, muestra también un desplazamiento en su espectro de emisión de aprox. +25 nm (tabla 27). La pérdida del protón en los ligandos F15ap y pyim debe causar un efecto similar sobre el complejo, aunque más acusado en el segundo por ocurrir *directamente* sobre un átomo de nitrógeno heterocíclico y no sobre un sustituyente de un ligando más extenso que, además, se encuentra en posición 5.

El hecho de que en estos dos complejos de Ru(II) la constante de acidez del estado excitado apenas varíe con respecto a la que exhiben ambos indicadores en su estado fundamental se debe, probablemente, a que el estado excitado MLCT se localiza en ambos casos en uno de los ligandos auxiliares y no en el ligando sensible al pH. Por tanto, la influencia de la excitación electrónica sobre los ligandos F15ap o pyim será muy pequeña, al contrario de lo que ocurre por ejemplo con el complejo  $[\text{Ru}(\text{pzth})_3]^{2+}$  donde el electrón se localiza precisamente en el ligando protonable, observándose un incremento considerable en la basicidad del nitrógeno heterocíclico no quelatado al metal en el estado excitado de este complejo ( $\text{p}K_{\text{a}} = -1.9$ ,  $\text{p}K_{\text{ap}}^* = 4.5$ ).<sup>84</sup> Un ejemplo significativo de cómo el estado excitado puede afectar a la constante de acidez del ligando ácido-base cuando no es el emisor lo constituye el luminóforo [(4,7-dihidroxi-1,10-fenantrolina)bis(1,10-fenantrolina)] rutenio(II). El apreciable aumento en la acidez que muestra este compuesto en el estado excitado ( $\text{p}K_{\text{a}} = 5.0$ ,  $\text{p}K_{\text{a}}^* = 2.3$ )<sup>140</sup> indica en este caso que el ligando ácido-base no participa en los procesos emisivos, correspondiendo por tanto el orbital  $\pi^*$  de menor energía en este luminóforo a uno de los ligandos auxiliares.<sup>139</sup>

---

<sup>140</sup> Giordano, P. J., Bock, C. R. y Wrighton, M. S., *J. Am. Chem. Soc.*, **1978**, *100*, 6960.



### C) VARIACIÓN DE LOS TIEMPOS DE VIDA DE EMISIÓN CON EL pH.

Para poder determinar la auténtica constante de acidez que exhiben las nuevas sondas sintetizadas en su estado excitado, se llevó a cabo la medida de la **cinética de extinción de su luminiscencia** en las disoluciones tamponadas de diferente valor de pH preparadas. Cuando el equilibrio ácido-base tiene lugar tanto en el estado fundamental como en el excitado, intervienen conjuntamente una serie de procesos cinéticos competitivos que, en función del pH del medio, pueden originar cambios en el tiempo de vida de emisión observado. Para poder afirmar que se establece un auténtico equilibrio en el estado excitado de las sondas es necesario que la velocidad de desprotonación/protonación de la molécula excitada sea mayor que la velocidad de desactivación de las mismas. Por tanto, los tiempos de vida de emisión no deben verse afectados por los cambios de pH, aunque sí las contribuciones relativas de las especies emisoras participantes en el equilibrio.

Los ajustes necesariamente biexponenciales de las cinéticas registradas para los dos indicadores revelan que tanto la especie ácida como la básica son luminiscentes en ambos indicadores, exhibiendo el complejo  $[\text{Ru}(\text{s2b})_2(\text{F15ap})]^{2-}$  dos tiempos de vida de emisión **constantes** en todo el intervalo de pH examinado. Las contribuciones relativas varían en función de la concentración de iones hidrógeno del medio (figura 57). Podemos afirmar, por tanto, que en el estado excitado de esta sonda se produce un auténtico **equilibrio ácido-base**. La constante de acidez calculada para este equilibrio (6.7) es muy similar a la obtenida para el complejo en su estado fundamental (6.5, tabla 27), debido probablemente a que el ligando ácido-base no participa directamente en los procesos emisivos. La proximidad de los dos tiempos de vida observados (391 y 284 ns) confirma, asimismo, esta hipótesis. Por otra parte, la variación de los factores preexponenciales ( $\alpha$ ) con el pH corrobora también la existencia del equilibrio en el estado excitado. El hecho de que a pH básico estos valores no se ajusten al 0 y 100% de formas ácida y básica, respectivamente, se debe a que los factores preexponenciales dependen directamente de la longitud de onda donde haya sido recogida la cinética y donde se excitan las sondas. Únicamente excitando en el punto isobéptico (imposible en nuestro caso, por utilizar como fuente de excitación una lámpara de nitrógeno de máximos definidos) y monitorizando la extinción de la emisión en el punto isoemisivo (difícil de

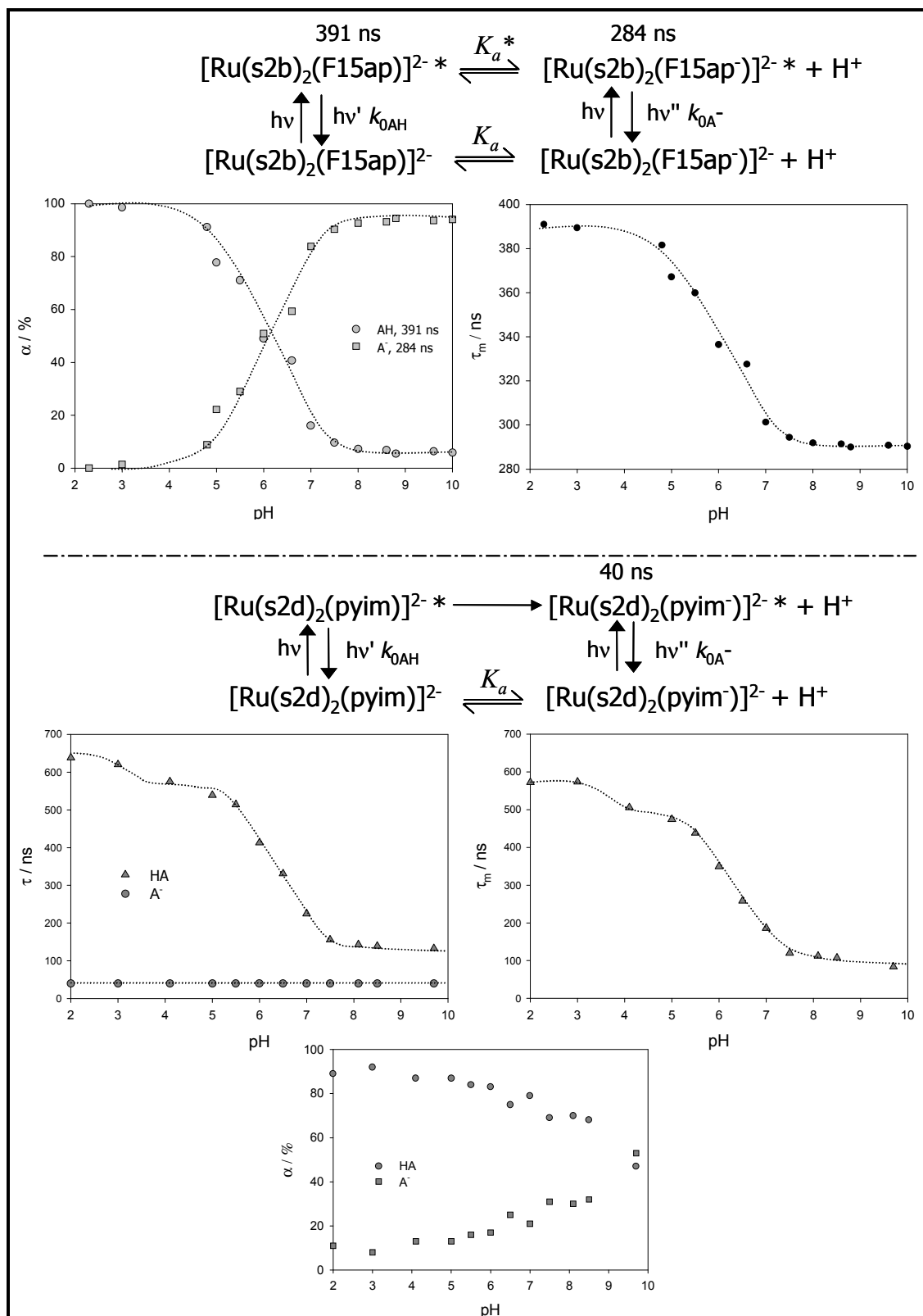
establecer cuando solapan los espectros de emisión de la forma ácida y básica) pueden correlacionarse los factores preexponenciales con la concentración de estados excitados.<sup>141</sup> Una adecuada corrección de los  $\alpha$  con los coeficientes de absorción molar de ambas especies a la longitud de onda de excitación permite, sin embargo, subsanar el efecto de la diferente absorción de ambas especies a dicha longitud de onda (ecuación 29).<sup>142</sup>

$$\frac{\alpha_{AH}}{\alpha_{A^-}} = \frac{\tau_{A^-}^0}{\tau_{AH}^0} \times \frac{\epsilon_{AH}}{\epsilon_{A^-}} \times \frac{C_{AH}}{C_{A^-}} \quad (29)$$

En el luminóforo **[Ru(s2d)<sub>2</sub>(pyim)]<sup>2-</sup>**, el análisis de las cinéticas de desactivación registradas a diferente concentración de iones hidrógeno en la disolución proporcionaron asimismo dos tiempos de vida de emisión. Uno de ellos, predominante en medio alcalino y, por tanto, correspondiente a la especie desprotonada, permanece **constante** a lo largo de todas las medidas realizadas (40 ns). El otro, sin embargo, **disminuye** a medida que aumenta la alcalinidad del medio (desde 640 a 120 ns, figura 57). El hecho de que este  $\tau$  que asociamos a la especie ácida no se mantenga constante, indica que la pérdida del protón en el estado excitado de la sonda compite con la vía de desactivación radiativa. No se establece, por tanto, un equilibrio en el estado excitado, sino que se produce la **desprotonación irreversible** del indicador. Esta condición de irreversibilidad en el proceso ácido-base está favorecida en aquellos sistemas en los que una de las dos especies exhibe un tiempo de vida muy corto (en nuestro caso 40 ns), ya que esto supone una velocidad de relajación muy alta que dificulta el retorno de la especie a su forma ácido-base conjugada. En el complejo **[Ru(s2b)<sub>2</sub>(F15ap)]<sup>2-</sup>**, sin embargo, los tiempos de vida de emisión encontrados son relativamente altos, lo que impide que la desactivación radiativa compita ventajosamente con el equilibrio ácido-base. Por otra parte, el hábito de los factores preexponenciales obtenidos a distintos valores de pH para la sonda con piridil-imidazol (figura 57) confirma la propuesta de que no tiene lugar un auténtico equilibrio ácido-base en el estado excitado de este complejo.

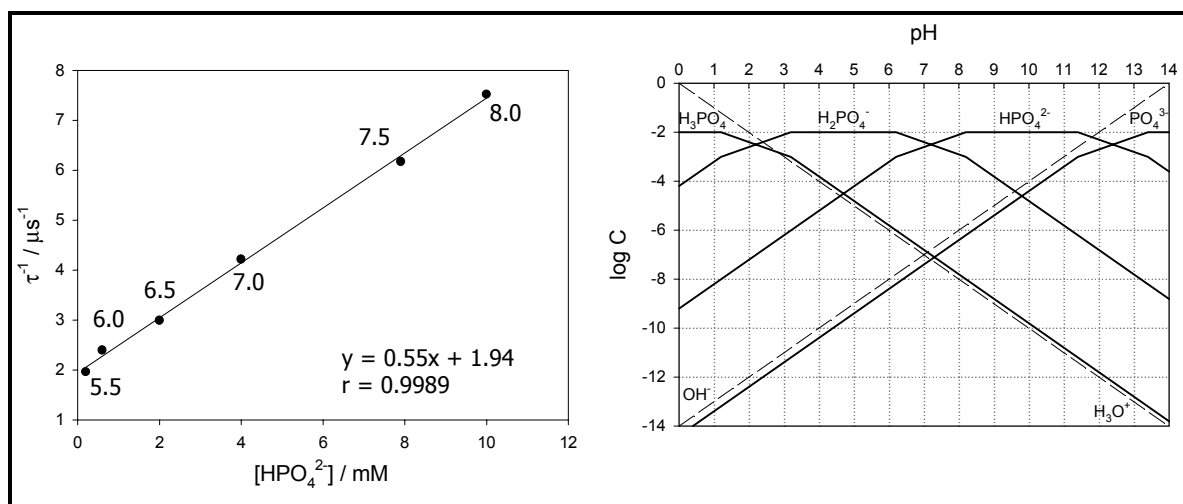
<sup>141</sup> Lakowicz, J. R., *Principles of Fluorescence Spectroscopy* (2<sup>a</sup> ed.), Kluwer Academic/Plenum Publishers, Nueva York (EE.UU.), 1999, cap. 18.

<sup>142</sup> Grinvald, A. y Steinberg, I. Z., *Anal. Biochem.*, 1974, 59, 583.



**Figura 57.** Comportamiento ácido-base de los complejos  $[\text{Ru}(\text{s2b})_2(\text{F15ap})]^{2-}$  y  $[\text{Ru}(\text{s2d})_2(\text{pyim})]^{2-}$  en disolución, extraído de las medidas de luminiscencia con resolución temporal realizadas en disolución. Las cinéticas de desactivación se registraron a 25.0 °C en disoluciones de tampón fosfato 10 mM, equilibradas al aire ( $\lambda_{\text{exc}} = 337 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 640$  y  $645 \text{ nm}$ , respectivamente; filtros de corte empleados: 515 y 570 nm;  $\tau_m = \sum \alpha_i \tau_i / \sum \alpha_i$ , ecuación 9).

En el intervalo de pH en el que el indicador  $[\text{Ru}(\text{s2d})_2(\text{pyim})]^{2-}$  muestra su máxima sensibilidad (5.5-8.0, figura 57) la especie más básica presente en la disolución responsable de la desprotonación de la sonda es el anión  $\text{HPO}_4^{2-}$  del tampón (figura 58, dcha.). La concentración de ésta aumenta en dicho intervalo hasta alcanzar un máximo (pH = 8.2) a partir del cual permanece constante (pH = 8.2-11.4, figura 58), coincidiendo con la estabilización del tiempo de vida de emisión de la forma ácida. Este hecho confirma que el comportamiento ácido-base del complejo con piridil-imidazol en el estado excitado obedece a una desactivación dinámica promovida por la forma básica predominante en el medio en el intervalo de pH medido y, por tanto, dependiente de su concentración (ver *Antecedentes* generales, apartado 2.4.2.b, ec. 4). En el intervalo de máxima acidez (pH < 4) se observa asimismo una disminución del  $\tau$  del complejo, debido a que en esa región de pH la especie básica (desactivador) del tampón pasa a ser el ión  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ , el cual aumenta también su concentración hasta alcanzar un valor constante a pH > 3.5. El hecho de que la disminución observada en el tiempo de vida sea más acusada cuando la especie desactivante es el  $\text{HPO}_4^{2-}$  se debe probablemente a que la constante de desactivación ( $k_q$ ) es superior para esta base.



**Figura 58.** Izq.: Representación gráfica de la variación que experimenta el tiempo de vida de emisión del complejo  $[\text{Ru}(\text{s2d})_2(\text{pyim})]^{2-}$  con el aumento de la concentración de la especie  $\text{HPO}_4^{2-}$  en la disolución, en el intervalo de pH 5.5-8.0. A la derecha se muestran las curvas de concentración vs pH de las distintas especies correspondientes al tampón fosfato (10 mM) empleado.

En la bibliografía se ha descrito la constante de acidez del complejo  $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{pyim})]^{2+}$  en medio metanol-agua (5%, v/v,  $\text{p}K_a = 7.9$ ,  $\text{p}K_a^* = 5.2$ ),<sup>126</sup> determinada a partir del ciclo de Förster.<sup>#</sup> Este método termodinámico, empleado por algunos autores para determinar el  $\text{p}K_a$  en aquellos casos en los que la dificultad para obtener los tiempos de vida individuales de las especies ácida y básica impiden la aplicación de la ecuación 34, permite conocer únicamente valores aproximados de la constante de acidez de los luminóforos en el estado excitado, debido el error que generalmente introduce el solapamiento de bandas (a 300 nm un error en 4 nm conlleva un desplazamiento del  $\text{p}K_a$  en 1 unidad).<sup>139</sup> Además, esta técnica presenta numerosas restricciones, algunas de ellas particularmente severas para los complejos de Ru(II): las frecuencias  $\nu_{\text{HA}}$  y  $\nu_{\text{A}}$  deben corresponder a transiciones adiabáticas entre niveles de igual multiplicidad y éstas deben ser transiciones 0-0 y, además, los cambios de entropía entre el estado fundamental y el excitado deben ser despreciables.<sup>143</sup> El autor de la publicación en la que se detalla el comportamiento ácido-base de distintos complejos de Ru(II) con ligandos derivados del imidazol,<sup>126</sup> presupone que se establece un equilibrio ácido-base en disolución únicamente basándose en el cambio que experimenta el espectro de emisión del luminóforo al desprotonarse, ya que desconoce el comportamiento de los tiempos de vida de la sonda con el pH, al no disponer de un equipo adecuado para la determinación de los mismos. El resultado de nuestros experimentos, sin embargo, sí permiten concluir que se produce la desprotonación irreversible de la sonda en el estado excitado, a la vista de los resultados que se desprenden del análisis de los  $\tau$ , por lo que no tiene sentido dar un valor de  $\text{p}K_a^*$ .

---

<sup>#</sup>  $\text{p}K_a^* = \text{p}K_a + (0.625/T)(\nu_{\text{A}} - \nu_{\text{HA}})$ , siendo  $T$  la temperatura en Kelvin y  $\nu$  las frecuencias, en  $\text{cm}^{-1}$ , de los máximos de emisión.

<sup>143</sup> Ireland, J. F. y Wyatt, P. A. H., *Adv. Phys. Org. Chem.*, **1976**, 12, 131.

**Tabla 27.** Parámetros característicos del comportamiento ácido-base de los complejos  $[\text{Ru}(\text{s2b})_2(\text{F15ap})]^{2-}$  y  $[\text{Ru}(\text{s2d})_2(\text{pyim})]^{2-}$  en disoluciones de tampón fosfato 10 mM equilibradas al aire y termostalizadas a 25.0 °C.

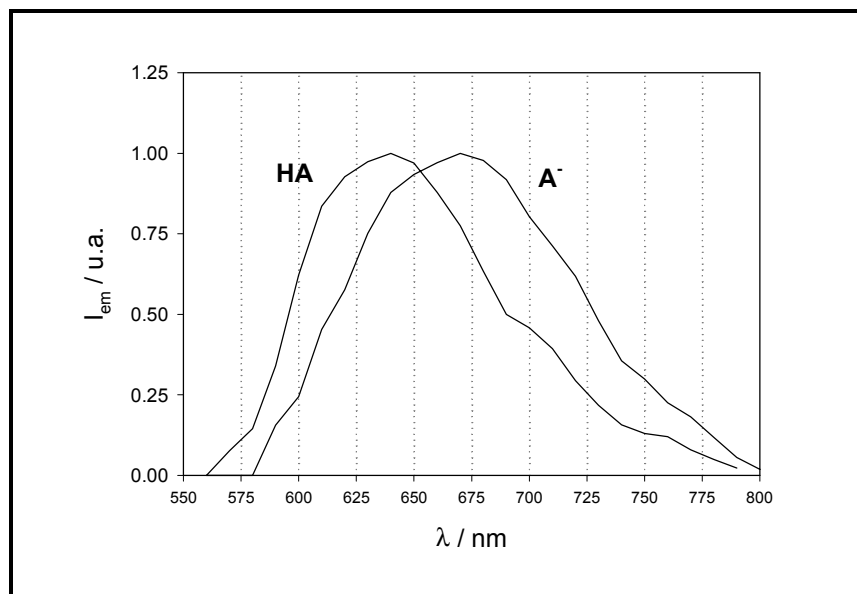
Indicador	$\lambda_{\text{máx}}^{\text{em a}}$ (HA) nm	$\lambda_{\text{máx}}^{\text{em a}}$ (A <sup>-</sup> ) nm	$\tau^{\text{b}}$ (HA) ns	$\tau^{\text{b}}$ (A <sup>-</sup> ) ns	pK <sub>a</sub>	pK <sub>ap</sub> <sup>*</sup>	pK <sub>a</sub> <sup>* c</sup>
$[\text{Ru}(\text{s2b})_2(\text{F15ap})]^{2-}$	639	648	391	284	<b>6.5</b> <sup>d</sup>	6.6 <sup>e</sup>	<b>6.7</b>
$[\text{Ru}(\text{s2d})_2(\text{pyim})]^{2-}$	645	673	638	40	<b>6.9</b> <sup>f</sup>	6.4 <sup>e</sup>	---

- a) ± 1 nm, sin corregir por la respuesta instrumental.  
 b) ± 5 %.  
 c) Calculado según la ecuación 34.  
 d) Calculado según la ecuación 32, ± 0.2.  
 e) Calculado según la ecuación 33, ± 0.1.  
 f) Calculado según la ecuación 32, ± 0.3.

Un fenómeno similar al observado con el complejo  $[\text{Ru}(\text{s2d})_2(\text{pyim})]^{2-}$  se produce con el complejo  $[\text{Ru}(\text{pzth})_3]^{2+}$ , descrito ampliamente en la bibliografía y mencionado en anteriores ocasiones a lo largo de esta Memoria. La presencia de un nitrógeno heterocíclico no quelatado en el ligando pzth da lugar a la protonación irreversible del complejo en su estado excitado, lo que se traduce en un aumento del tiempo de vida de emisión del luminóforo cuando se incrementa la acidez del medio.<sup>84</sup> En este caso las cinéticas de emisión recogidas son monoexponenciales, lo que indica que la especie ácida no emite o no muestra emisión en el intervalo de longitudes de onda evaluados (tabla 26).

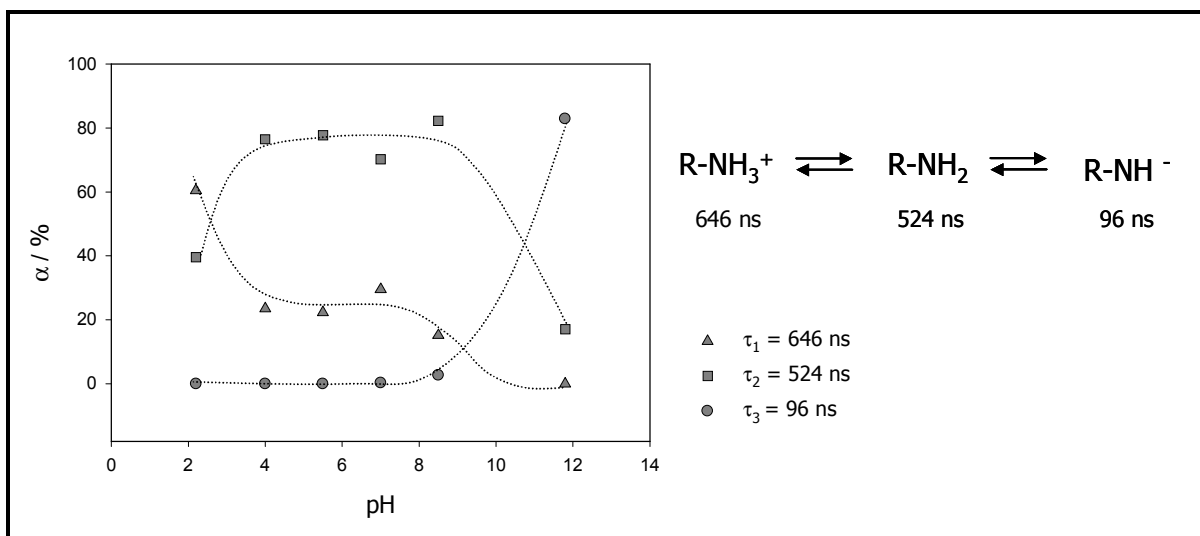
El experimento **TRS** (*time-resolved spectroscopy*, espectroscopía con resolución temporal) llevado a cabo con disoluciones del complejo  $[\text{Ru}(\text{s2d})_2(\text{pyim})]^{2-}$  preparadas en tampón fosfato 10 mM a tres valores de pH distintos (2.3, 7.0 y 10.0, ver *Parte experimental*), en el que se registra la cinética de extinción de la luminiscencia de la sonda a distintas longitudes de onda, corroboró la existencia de dos especies emisoras en la disolución (figura 59). La especie mayoritaria a pH alcalino muestra un máximo de emisión en torno a 670 nm y su desexcitación se recoge en la escala de tiempos cortos de la cinética (40 ns). Por el contrario, la especie predominante a pH 3.2 exhibe un máximo próximo a 640 nm y un tiempo de vida de emisión claramente superior al de la especie básica (638 ns, figura 59). Estos datos coinciden con los valores de los

máximos de emisión recogidos en la tabla 27, obtenidos realizando medidas de luminiscencia de la sonda en estado estacionario.



**Figura 59.** Experimento TRS llevado a cabo con el complejo  $[\text{Ru}(\text{s2d})_2(\text{pyim})]^{2-}$  disuelto en tampón fosfato 10 mM a pH 7.0 (disolución 10  $\mu\text{M}$  equilibrada al aire). Se registró la cinética de desactivación de la sonda a diferentes longitudes de onda de emisión (de 550 a 800 cada 10 nm), excitando siempre a 355 nm (láser de Nd:YAG) y empleando tres filtros de corte (420, 455 y 515 nm) para aislar la emisión de la sonda de la luz procedente de la fuente. Las curvas se obtuvieron analizando la cinética en la escala de tiempos de 119-127 (A-) y 156-430 ns (HA), respectivamente, tras el pulso láser.

Finalmente y de forma paralela al estudio realizado con las cinéticas de desactivación de los complejos seleccionados para construir la fase sensora de pH, se examinaron los tiempos de vida de emisión que exhibe en las mismas disoluciones tamponadas el indicador  $[\text{Ru}(\text{phen})_2(5\text{-NH}_2\text{p})]^{2+}$ , con objeto de comprobar si se produce en algún momento la hidrólisis de la amida perfluorada. El complejo aminado muestra tres tiempos de vida constantes (646, 524 y 96 ns) cuyas contribuciones relativas varían en función de la concentración de iones hidrógeno del medio (figura 60). Ello refleja, por tanto, la existencia de dos equilibrios en el estado excitado de este luminóforo, correspondientes a la protonación/desprotonación de la amina neutra. Los  $\tau$  obtenidos para este luminóforo no se han encontrado en su homólogo perfluorado, lo que permite descartar la hidrólisis del ligando, incluso en medios de acidez/basicidad alta.



**Figura 60.** Variación con el pH de las contribuciones relativas de los tres tiempos de vida de emisión característicos del complejo  $[\text{Ru}(\text{phen})_2(5\text{-NH}_2\text{p})]^{2+}$ . Las cinéticas de extinción de la luminiscencia de las disoluciones, equilibradas al aire, se registraron en tampón fosfato 10 mM a 25.0 °C ( $\lambda_{\text{exc}} = 358$  nm,  $\lambda_{\text{em}} = 610$  nm; filtros de corte empleados: 515 y 570 nm).



## 5.4. INMOVILIZACIÓN DE LOS INDICADORES. SELECCIÓN DEL SOPORTE.

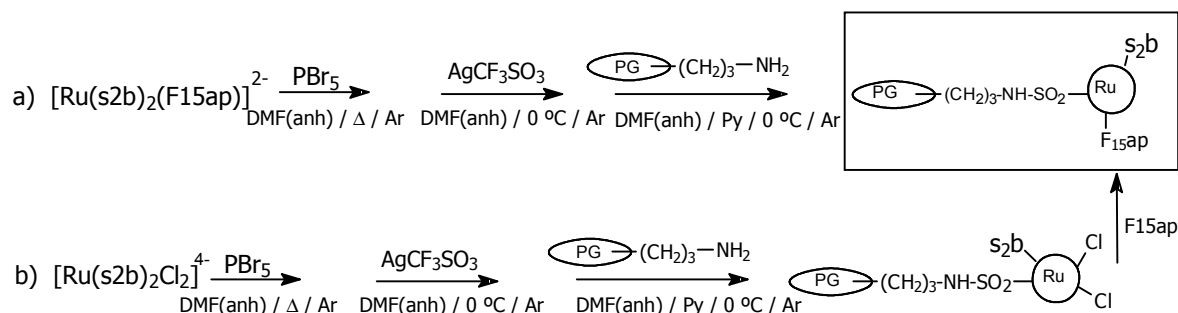
Una vez caracterizado el comportamiento ácido-base en disolución de los nuevos complejos de Ru(II) sintetizados, se procedió a su inmovilización en distintos soportes sólidos. La matriz polimérica escogida debe retener el indicador evitando su lavado al ser expuesto a las disoluciones acuosas y, al mismo tiempo, permitir el fácil acceso de las mismas hasta la sonda, proporcionando así un corto tiempo de respuesta. Una vez preparadas, las fases sensibles se colocaron en el extremo de una fibra óptica, utilizando para ella la célula de flujo termostatzada descrita en el epígrafe 6.6.1. de la *Parte experimental* de esta Memoria. Con este dispositivo, se evaluó la respuesta de las mismas a los cambios de pH del medio utilizando la **intensidad de luminiscencia** y/o la técnica basada en excitación modulada y **detección sensible a la fase** de la emisión.

Además de los soportes que se describen a continuación, se han ensayado matrices de *carboximetil celulosa* (CM-celulosa, aniónica) y *poli(cloruro de vinilo)* plastificado. En el primer caso, las fuerzas de tipo electrostático que se establecen entre el indicador y el soporte no evitan el lavado de la sonda, que es arrastrada por los iones sodio procedentes de la disolución reguladora. El PVC, por otra parte, tampoco proporcionó resultados positivos, debido probablemente a que la cantidad de iones hidrógeno que penetran en la membrana con el transportador de protones utilizado es insuficiente para hacer llegar al complejo los cambios de pH que tienen lugar en el medio externo.

### 5.4.1. INMOVILIZACIÓN COVALENTE: amino-PG.

La unión covalente de los indicadores a un soporte sólido es el método más adecuado para construir terminales sensibles robustos, en los que no se produzca el lavado de la sonda.<sup>123</sup> Por este motivo, se intentó unir covalentemente a microesferas de vidrio provisto de grupos amino superficiales, a través de un enlace tipo sulfonamida, uno de los nuevos complejos sulfonados. Para llevar a cabo la inmovilización se siguieron dos procedimientos distintos, ambos basados en el protocolo descrito por Orellana et al. para la inmovilización de complejos de Ru(II) con grupos sulfonato a este tipo de soporte (ver *Parte experimental*,

apartado 6.5.1.):<sup>123</sup> (a) formación de la sulfonamida directamente con el complejo perfluorado  $[\text{Ru}(\text{s}2\text{b})_2(\text{F}15\text{ap})]^{2-}$  y (b) unión covalente del bisquelatocomplejo sulfonado de partida a la matriz de vidrio para, una vez inmovilizado, incorporar el ligando perfluorado.



El soporte teñido en ambos casos presenta una débil banda de emisión en torno a 600 nm, indicativa de que la inmovilización ha sido efectiva con algunas moléculas de complejo. Sin embargo, la escasa luminiscencia recogida es insuficiente para poder monitorizar los cambios provocados en ella por el pH, por lo que se descartó este procedimiento. Los bajos rendimientos de reacción obtenidos se deben, probablemente, al escaso grado de funcionalización del soporte así como al ataque de los reactivos involucrados en el proceso al ligando sensible al pH.

#### 5.4.2. ADSORCIÓN: poli(tetrafluoroetileno) hidrofílico (H-PTFE).

El Teflón<sup>®</sup>, nombre comercial del *poli(tetrafluoroetileno)* (PTFE), es un polímero hidrófobo cuyas características químicas pueden permitir una adecuada adsorción de moléculas orgánicas que posean una o varias cadenas perfluoroalquílicas.<sup>144</sup> Esta característica es la que nos condujo a la síntesis de los complejos de Ru(II) provistos de, al menos, un ligando perfluoroalquilado F15ap (apartado 5.1.). No obstante, el mismo carácter hidrofóbico del PTFE puede impedir la aproximación del analito ( $\text{H}_3\text{O}^+/\text{OH}^-$ ) por lo que se optó por emplear un

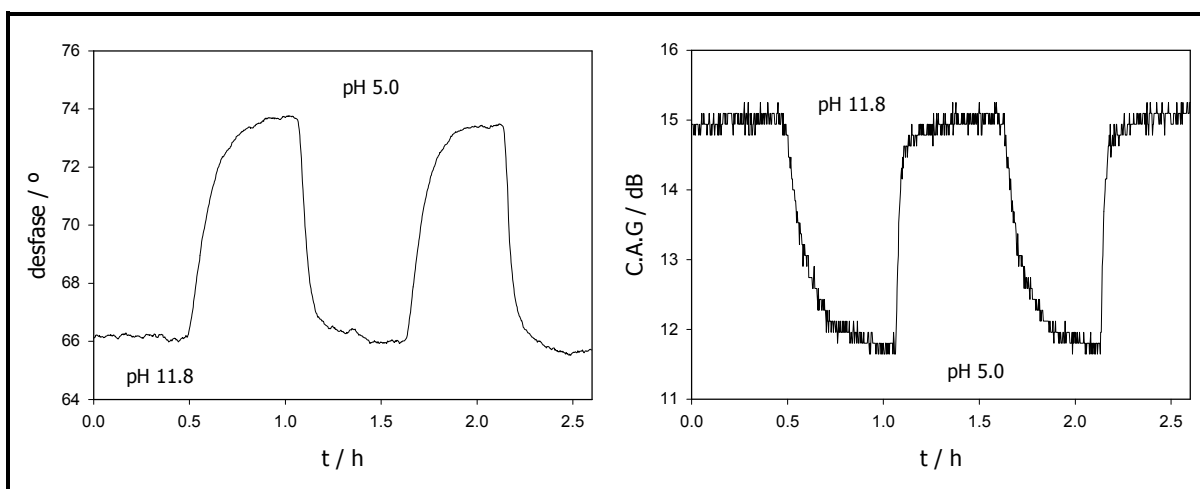
tipo especial de PTFE. Las membranas utilizadas se comercializan como filtros para medio acuoso, ya que el polímero base ha sido tratado convenientemente para permitir el paso de moléculas de agua, lo que hace que sean especialmente útiles para construir el optodo de pH, al facilitar el acceso de la disolución reguladora hasta el complejo inmovilizado.

La sonda seleccionada para evaluar este tipo de soporte fue el **[Ru(phen)<sub>2</sub>(F15ap)]<sup>2+</sup>** ya que las medidas preliminares llevadas a cabo con este indicador en disolución revelaron cambios en su luminiscencia en el intervalo de pH adecuado para medidas en aguas y, al contrario que su homólogo sulfonado, no es soluble en agua, lo que dificulta el posterior lavado del polímero. En la figura 62 se muestra una curva típica de respuesta de la fase sensible (apartado 6.5.2., *Parte experimental*) al aumento de la alcalinidad del medio, obtenida con el demostrador optoelectrónico desarrollado por T.G.I.. Este sistema de medida proporciona de forma simultánea el *desfase* de la luminiscencia del indicador sometido a excitación sinusoidal (apartado 2., *Detección sensible a la fase*) y, al mismo tiempo, la cantidad de luz que recibe el fotomultiplicador, relacionada directamente con la intensidad de emisión del indicador soportado. La ganancia aplicada automáticamente al mismo por el CAG es un parámetro que adquiere una gran relevancia en la evaluación de los soportes ensayados, ya que permite establecer si se produce la pérdida del indicador de la matriz sólida por lavado. Se observa (figura 61) que, en medio alcalino, el desfase obtenido es menor que en medio ácido debido a que la sonda desprotonada presenta un tiempo de vida de emisión inferior (ver apartado 5.3.3.). Asimismo, el CAG revela que la señal que recibe el fotomultiplicador (detector) requiere menos amplificación en medio ácido que cuando el grupo amida del indicador se encuentra desprotonado, lo que indica que en este medio la cantidad de luz emitida por el compuesto es mayor. Para llevar a cabo estas medidas, se moduló el *led* azul de excitación a 80 KHz tras comprobar que aplicando frecuencias superiores (hasta 140 KHz, frecuencia máxima permitida por la versión evaluada del sistema *DEMODE*), no se consigue una mejora significativa en la excursión de fase observada. El tiempo de

---

<sup>144</sup> Blair, T. L., Cynkowski, T. y Bachas, L. G., , *Anal. Chem.*, **1993**, 65, 945.

respuesta del indicador  $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{F15ap})]^{2+}$  soportado sobre esta matriz hidrófila, fue de 10 min ( $t_{90} = t_{-90}$ ).<sup>#</sup>



**Figura 61.** Respuesta a los cambios de pH de una membrana de H-PTFE con  $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{F15ap})]^{2+}$  adsorbido (apartado 6.5.2.). Con el control automático de ganancia (CAG, derecha) se comprueba que los ciclos son reproducibles, lo que indica que no se produce pérdida de indicador con el paso de disolución reguladora (tampón fosfato 10 mM, 0.9 mL/min). Las medidas se realizaron a 25.0 °C, modulando el led de excitación a 80 KHz.

### 5.4.3. INMOVILIZACIÓN ELECTROSTÁTICA.

Aprovechando la carga global que exhiben los nuevos complejos de Ru(II) sintetizados, se examinaron polímeros comerciales con grupos funcionales en su estructura que permiten la unión electrostática de los indicadores:

#### A) MEMBRANAS DE NAFIÓN®.

El Nafión® es un polímero insoluble constituido por un esqueleto de tetrafluoroetileno del que cuelgan cadenas de éteres vinílicos perfluorados terminados en grupos sulfónicos.<sup>145</sup> La existencia de varias zonas de diferente hidrofobicidad en el interior de esta matriz le convierte en un soporte idóneo para el atrapamiento de los complejos de Ru(II) catiónicos con ligandos perfluorados. El indicador se mantiene retenido en el polímero gracias a las fuerzas

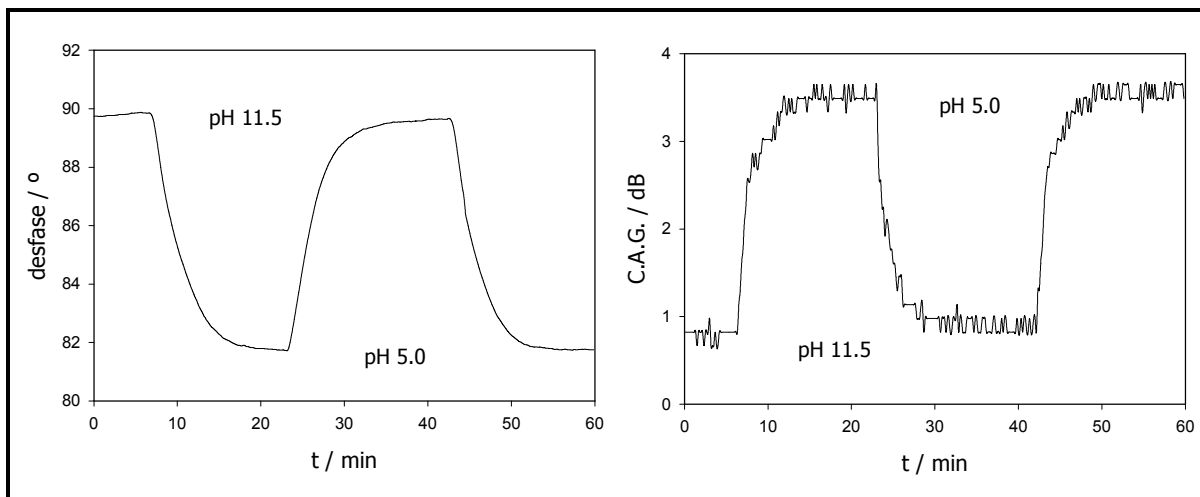
<sup>#</sup> Tiempo que tarda el terminal sensible en alcanzar el 90% de la señal total ( $t_{90}$ : pH ácido  $\rightarrow$  pH básico;  $t_{-90}$ : pH básico  $\rightarrow$  pH ácido).

<sup>145</sup> Yaeger, H. L., en *Perfluorinated ionomer membranes*, Eisenberg, A. y Yaeger, H. L. (eds.), ACS Symposium Series 180, American Chemical Society, Washington D. C. (EE.UU.), 1982; cap 4.

electrostáticas que se establecen entre la sonda cargada positivamente y los grupos sulfonato, los cuales facilitan a su vez la entrada de los protones al generar con su carga cavidades hidrofílicas en un entorno completamente hidrófobo. El Nafion<sup>®</sup> se comercializa en forma de películas delgadas y en micropartículas en suspensión de alcoholes alifáticos. La simple inmersión de las primeras en una disolución acuosa o metanólica del indicador elegido permite preparar terminales sensibles de forma sencilla. Sin embargo, el grosor que presentan estas membranas (178  $\mu\text{m}$ ) da lugar a elevados tiempos de respuesta del sensor, por lo que también fueron descartadas.

Los terminales sensibles preparados con el complejo  $[\text{Ru}(\text{F15ap})_3]^{2+}$  a partir de la suspensión de Nafion<sup>®</sup> en alcoholes (apartado 6.5.3.a, *Parte experimental*) dieron excelentes resultados en cuanto a rapidez y reproducibilidad de los ciclos de emisión en función del pH. Por otra parte, los datos experimentales revelaron que el tiempo de respuesta se reduce significativamente disminuyendo el grosor de la capa de Nafion<sup>®</sup> donde se encuentra inmovilizado el luminóforo. Sin embargo, la extrema delgadez de estas películas dificulta su utilización repetida, separándose del vidrio donde están soportadas tras su exposición al medio acuoso. Por este motivo, se procedió a la fabricación de las membranas sobre vidrio previamente tratado con una imprimación de silicona en suspensión de tolueno, con lo que se consiguió aumentar considerablemente la adherencia de esta matriz al soporte. De este modo, se pueden fabricar terminales sensibles de corto tiempo de respuesta sin poner en peligro su robustez.

La figura 62 muestra la respuesta del sensor a los cambios de pH, recogida con el sistema *DEMODE*. Se observan ciclos reversibles de corto tiempo de respuesta ( $t_{90} = t_{90} = 7 \text{ min}$ ), en los que el indicador aumenta su emisión al producirse la desprotonación, al contrario que sus homólogos heterolépticos con un ligando F15ap y de acuerdo con las medidas previas realizadas en disolución (5.3.3.). Con la pérdida de los tres protones amídicos el complejo recupera la simetría, traduciéndose en un aumento de su rendimiento cuántico de luminiscencia y, por tanto, del desfase medido. El C.A.G., por otro lado, demuestra que en medio alcalino la emisión es mayor, al reducir la amplificación que recibe la señal del fotomultiplicador.



**Figura 62.** Variación con la acidez del medio de la luminiscencia del indicador  $[\text{Ru}(\text{F15ap})_3]^{2+}$  inmovilizado en Nafion<sup>®</sup>. Dichos cambios han sido registrados en forma de desfase de la luminiscencia (izq.) y control automático de ganancia (dcha). El estudio se realizó modulando la luz de excitación a 80 KHz, termostalizando la celda de flujo a 25.0 °C y con un flujo de disolución tampón (fosfato 10 mM) de 0.9 mL/min.

Tras optimizar esta frecuencia en un estudio preliminar, el led de excitación se moduló, al igual que con las membranas de *H-PTFE*, a 80 KHz. Asimismo, los mejores resultados se obtuvieron haciendo llegar hasta el indicador la disolución reguladora con un flujo de 0.9 mL/min. A pesar de que la sonda inmovilizada responde al pH únicamente en medio alcalino ( $\text{pH} > 8$ ), este estudio permitió establecer la utilidad de estas membranas como fase sensible de un optodo de pH, siempre que el complejo de Ru(II) que se pretenda inmovilizar posea una carga neta positiva.

## B) MEMBRANAS CATIONICAS COMERCIALES.

Se procedió finalmente a la inmovilización electrostática de los complejos indicadores con ligandos sulfonados  $[\text{Ru}(\text{s2b})_2(\text{F15ap})]^{2-}$  y  $[\text{Ru}(\text{s2d})_2(\text{pyim})]^{2-}$  sobre superficies cargadas positivamente. Los distintos soportes ensayados se comercializan habitualmente para secuenciación de proteínas e inmovilización de anticuerpos o ácidos nucleicos (*blotting*):

- **Immobilon-Ny<sup>+</sup>** (Millipore): membrana de *nylon* provista de grupos funcionales cargados positivamente en disolución acuosa (amina primaria o secundaria).
- **Immobilon-CD** (Millipore): membrana catiónica hidrofílica de *polivinilideno fluorado* (PVDF) funcionalizado.

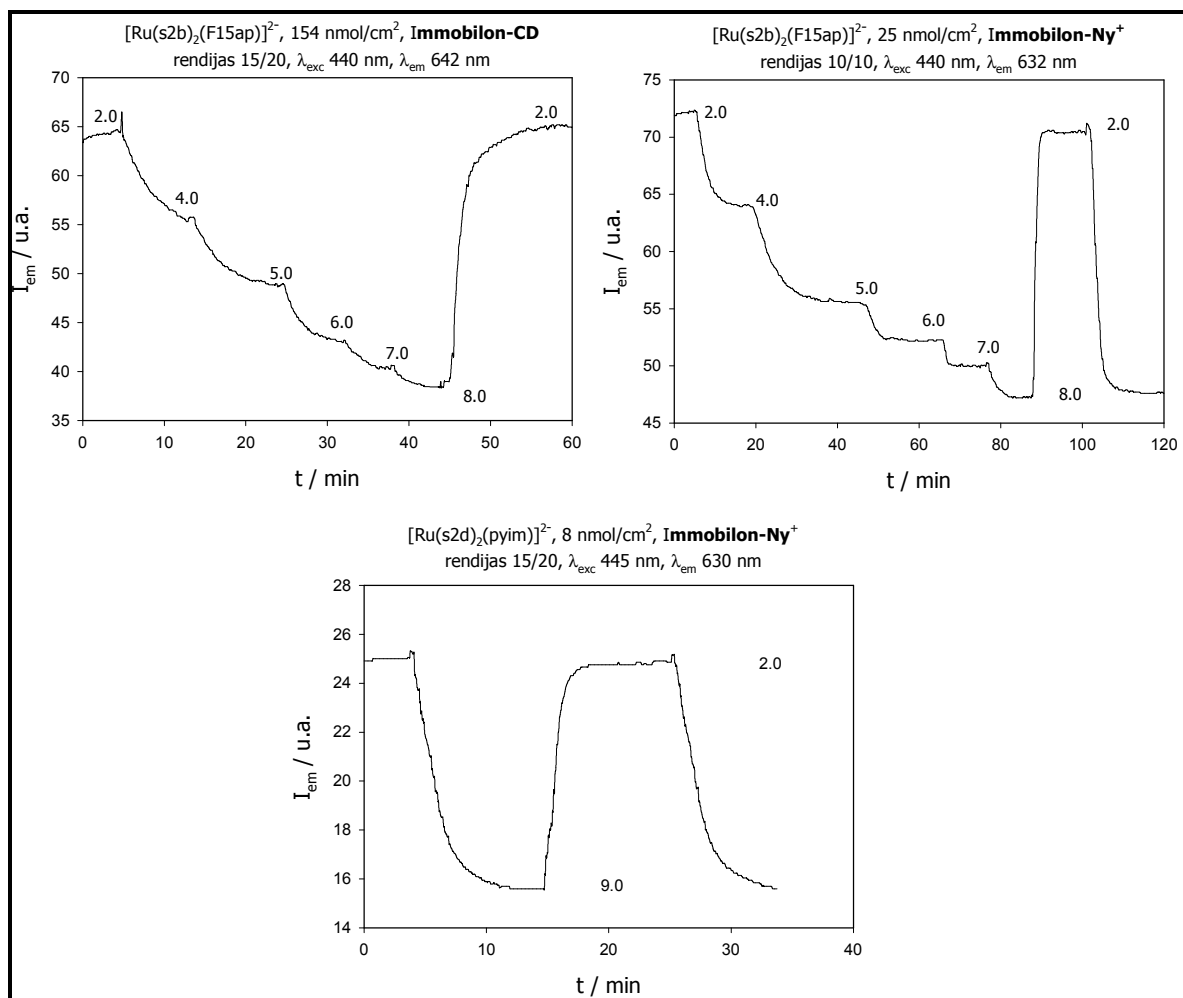
- **Biodyne-B** (Pall): al contrario que sus homólogas de *Millipore*, estas membranas catiónicas de *nylon* no se neutralizan al ser expuestas al medio alcalino ( $\geq 9$ ), lo que evitaría el posible lavado del indicador en estos casos.
- **Biodyne-Plus** (Pall): se trata también de una membrana de *nylon* catiónica, cuya característica fundamental es que posee una fluorescencia intrínseca menor, por lo que está especialmente recomendada para el tipo de estudios de pH que se describen en esta Memoria.

A pesar de que se desconoce la estructura real de estas matrices poliméricas por tratarse de información comercial reservada, los datos que ofrecen los fabricantes revelan la presencia de grupos amonio cuaternarios en su superficie (excepto en *Biodyne-B*), lo que justificaría la neutralización por desprotonación de dichos grupos funcionales al ser expuestas a medio alcalino, conduciendo al lavado de la sonda, como pudo apreciarse a partir de los estudios preliminares llevados a cabo con estas membranas. Se estableció, por tanto, un **pH máximo** de medida igual a **9.0** para realizar la evaluación de las nuevas fases sensibles preparadas, sin que se produzca pérdida del luminóforo aniónico inmovilizado.

#### • INTENSIDAD DE LUMINISCENCIA.

Se monitorizó en continuo, sin parada de flujo, el cambio producido en la intensidad de luminiscencia de los dos complejos aniónicos de Ru(II) soportados en las membranas catiónicas de *Millipore*, cuando las matrices teñidas se ponen en contacto con disoluciones tampón fosfato sódico 10 mM de distintos valores de pH (apartado 6.5.3.b, *Parte experimental*). Como resultado de este estudio previo a las medidas por detección sensible a la fase, se comprobó que la luminiscencia de los indicadores de pH es muy inferior cuando se encuentran soportados en *Immobilon-CD*, sobre todo para el complejo con *piridil-imidazol* en el que la emisión recogida es prácticamente nula. Dado que la longitud de onda de excitación escogida para ambos soportes es la misma y que para recoger la emisión del indicador soportado en *Immobilon-CD* se seleccionó la apertura máxima de rendijas, y teniendo en cuenta que sobre esta matriz se depositó mayor cantidad de complejo (154 nmol/cm<sup>2</sup>, frente a 25 nmol/cm<sup>2</sup> en *nylon-Plus*), es muy probable que este soporte desactive parcialmente la luminiscencia de las sondas

(figura 63). Por otra parte, el complejo  $[\text{Ru}(\text{s2d})_2(\text{pyim})]^{2-}$ , cuyo rendimiento cuántico es inferior al del indicador con un ligando perfluoroamida (0.002 y 0.015, respectivamente, tabla 24), requirió también la máxima apertura de rendijas para evaluar los cambios que experimenta su emisión, cuando se encuentra inmovilizado en estos dos soportes, con la concentración de protones del medio. A pesar de ello la cantidad de luz emitida por este luminóforo es muy inferior a la del  $[\text{Ru}(\text{s2b})_2(\text{F15ap})]^{2-}$  sobre la membrana de *nylon*, no observándose emisión procedente de la sonda en el polivinilideno fluorado, lo que apoya la hipótesis de la desactivación de la emisión de estos complejos metálicos cuando se encuentran inmovilizados en esta membrana comercial.



**Figura 63.** Curvas de respuesta al pH típicas de los complejos  $[\text{Ru}(\text{s2b})_2(\text{F15ap})]^{2-}$  y  $[\text{Ru}(\text{s2d})_2(\text{pyim})]^{2-}$  adsorbidos sobre matrices poliméricas catiónicas (Immobilon-CD y Ny<sup>+</sup> de Millipore). Las medidas se realizaron con un flujo de disolución reguladora (fosfato 10 mM) de 0.9 mL/min, termostatazando la celda de flujo a 25.0 °C. En las cabeceras de las figuras se detallan las condiciones de cada uno de los experimentos.



El estudio realizado con medidas en intensidad de luminiscencia permitió asimismo llevar a cabo la **optimización del flujo de disolución reguladora** que alimenta las membranas de *nylon*. Como se aprecia en la tabla 28, un aumento de flujo no conlleva una reducción significativa en el  $t_{90}$ , por lo que se eligió un flujo intermedio para continuar la evaluación del sensor (**0.9 mL/min**). Este valor coincide además con el empleado con otro tipo de soportes, lo que nos permite comparar tiempos de respuesta del indicador en distintas membranas. Ello se debe a que el paso limitante de la velocidad de respuesta de estos sensores de pH es, probablemente, la difusión del analito en el interior de la membrana soporte y no el paso de la disolución de medida a la superficie de la misma. Aun careciendo de datos concretos del fabricante, la funcionalización del *nylon* y el PVDF se realiza probablemente por ataque superficial, por lo que se produce únicamente en el exterior del material, mientras que el interior resulta muy impermeable. Esta característica no sólo no afecta a la utilización de las membranas en Biología Molecular (fin para el que han sido diseñadas) sino que resulta beneficiosa, ya que confiere a las mismas una rigidez suplementaria que impide que se curven en contacto con la disolución acuosa, hecho éste que provocaría irregularidades en la deposición de las biomoléculas objetivo.

**Tabla 28.** Influencia de la velocidad de flujo de tampón fosfato 10 mM sobre el tiempo de respuesta del indicador de pH  $[\text{Ru}(\text{s}2\text{b})_2(\text{F}15\text{ap})]^{2-}$  inmovilizado en una membrana catiónica de *nylon* (Immobilon-Ny<sup>+</sup>)

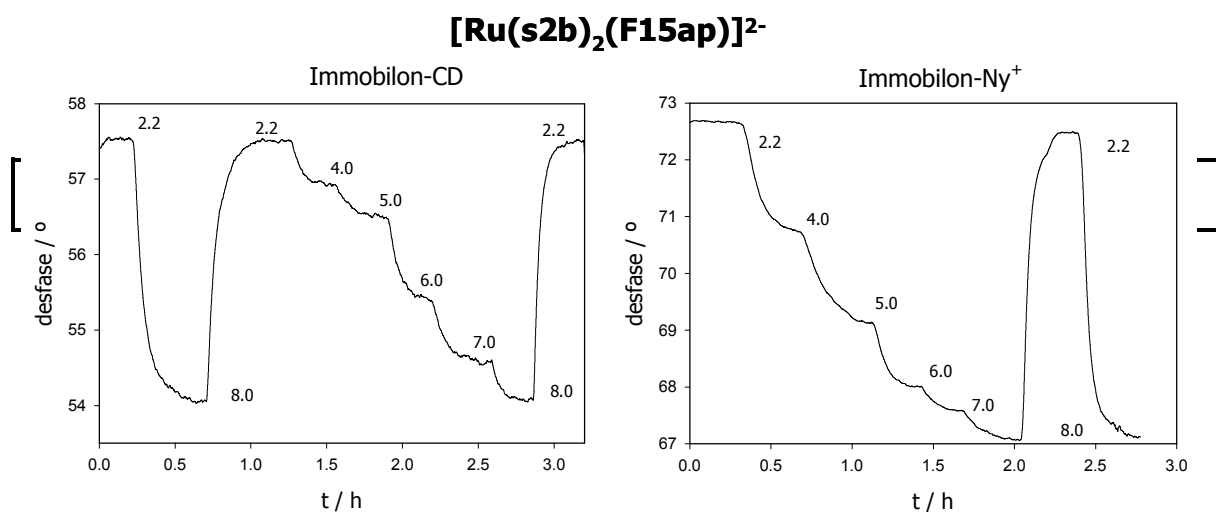
	0.5 mL/min	0.9 mL/min	1.4 mL/min
$t_{90}$ (pH 2.2 → pH 8.0) / min	5.2	5.1	4.8
$t_{90}$ (pH 8.0 → pH 2.2) / min	3.3	2.4	2.5

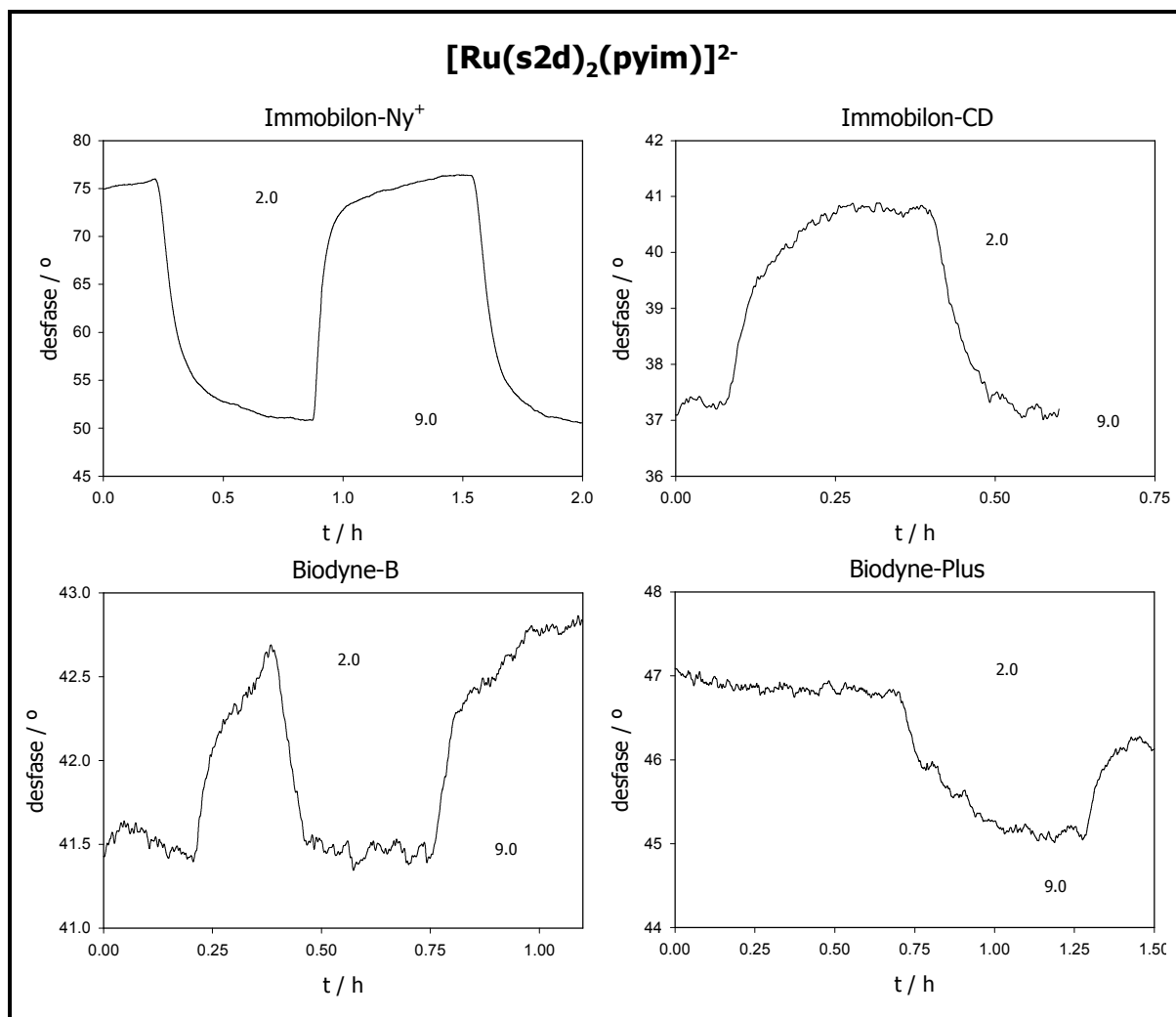
#### • DETECCIÓN SENSIBLE A LA FASE.

Una vez comprobado con las medidas realizadas en estado estacionario que en las membranas catiónicas preparadas no se produce el lavado de la sonda a  $\text{pH} < 9$ , se examinó la respuesta por detección con resolución de fase de los indicadores inmovilizados en estas matrices poliméricas al ser sometidos a cambios de pH, empleando para ello el módulo optoelectrónico fabricado por T.G.I. para tales fines. Dado que, tanto el complejo perfluorado como el que posee un ligando de tipo piridil-imidazol, exhiben tiempos de vida de emisión

relativamente cortos (100-600 ns en disolución acuosa equilibrada al aire), en comparación con los indicadores de oxígeno o temperatura desarrollados con anterioridad para este Proyecto (en los que la frecuencia óptima de modulación es 50 y 70 KHz, respectivamente), se escogió para la evaluación del sensor óptico de pH la máxima frecuencia que admite la versión del equipo con la que se realizó la validación de este optodo (**140 Khz**, recordamos que, para un  $\tau$  constante, aumentos de frecuencia repercuten en un mayor desplazamiento de fase, ver capítulo *Medidas con detección sensible a la fase*).

En la figura 64 se recogen distintas curvas de respuesta realizadas con los dos nuevos indicadores sintetizados inmovilizados en los soportes catiónicos. El desfase observado cuando el indicador se encuentra sobre las membranas Immobilon-CD es inferior para ambos complejos al determinado cuando los mismos se soportan sobre *nylon*, lo que confirma las sospechas de la desactivación de la luminiscencia por parte de la matriz de *polivinilideno fluorado*. Puesto que tanto el recorrido total, en grados de desfase, obtenido para los dos valores de pH extremos de medida (2 y 9), como la reproducibilidad de los ciclos es superior para los terminales preparados con el complejo **[Ru(s2d)<sub>2</sub>(pyim)]<sup>2-</sup>** soportado sobre **Immobilon-Ny<sup>+</sup>**, se escogió finalmente esta fase sensible para continuar la validación del optodo de pH por detección sensible a la fase. Probablemente, incrementando la frecuencia de modulación del *led* de excitación mejoraría significativamente la respuesta del indicador perfluorado, aumentando la sensibilidad de las medidas realizadas con esta sonda (apartado 5.6.6.).





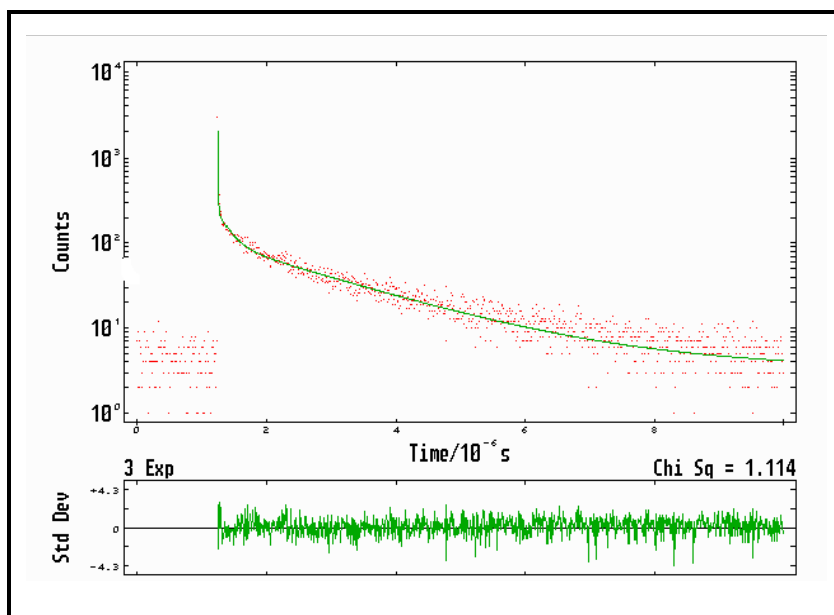
**Figura 64.** Estudio comparativo del comportamiento frente al pH de los dos nuevos complejos de Ru(II) sintetizados, adsorbidos sobre distintas matrices poliméricas catiónicas. La temperatura se controló durante todos los experimentos con una bañera termostática a 25.0 °C, manteniendo un flujo de disolución reguladora (fosfato 10 mM) de 0.9 mL/min.

### 5.5. TIEMPO DE VIDA DE EMISIÓN DE $[\text{Ru}(\text{s2d})_2(\text{pyim})]^{2-} / \text{Nylon}^+$ .

Se registró la cinética de extinción de la luminiscencia de tres membranas Immobilon-Ny<sup>+</sup> con distintas cantidades de indicador adsorbidas (40, 20 y 16 nmol cm<sup>-2</sup>) manteniendo el pH y la temperatura del sistema constantes (pH 2.2, 25.0 °C, figura 65). Con el pH seleccionado para la disolución de medida se pretende que todas las moléculas de indicador (o, al menos, la mayoría de ellas) se encuentren en su forma protonada.

En los tres casos se obtuvieron ajustes **triexponenciales**, en los que el tiempo de vida más corto (7 ns) se debe a luz dispersa procedente de la fuente que llega al detector a pesar de interponer entre ambos dos filtros coloreados de

530 y 570 nm. Los otros dos  $\tau$  (1800 y 200 ns), con una contribución relativa del 45 y 55%, respectivamente e igual en las tres membranas, revelan la existencia de dos entornos diferentes para las moléculas de luminóforo retenidas. La desestabilización del estado excitado  $^3MC$  de promoción térmica, junto con la pérdida de desactivación por relajación vibracional que se produce al inmovilizar la sonda en un soporte rígido y la protección frente al oxígeno molecular (desactivador de la luminiscencia de los complejos de Ru(II)) que proporciona el soporte (ver apartado 5.6.5.), dan lugar a un aumento en el tiempo de vida de emisión exhibido por el indicador (1800 ns), en comparación con los que exhibe la molécula libre en disolución en las mismas condiciones (aprox. 600 ns, apartado 5.3.3.). El  $\tau$  más corto encontrado (200 ns) no puede asociarse a la forma desprotonada del indicador, ya que al valor de pH en el que se realizaron las medidas (2.2) la contribución de esta especie debe ser mínima. Debe tratarse, probablemente, de moléculas de indicador que se encuentran más expuestas al disolvente y que sufren una parcial desactivación por relajación vibracional con transferencia de energía al oscilador O-H del mismo.



**Figura 65.** Cinética de desactivación de la luminiscencia del complejo  $[Ru(s2d)_2(pyim)]^{2-}$  soportado sobre Immobilon-Ny+ ( $40 \text{ nmol cm}^{-2}$ ) cuando la membrana se encuentra sumergida en una disolución de tampón fosfato 10 mM de pH 2.2 equilibrada al aire ( $\lambda_{exc} = 450 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{em} = 600 \text{ nm}$ ; filtros de corte: 530 y 570 nm).

A partir de los  $\tau$  individuales obtenidos con las fases sensibles evaluadas y su contribución relativa en la luminiscencia del terminal, se determinó el tiempo

de vida *aparente* ( $\tau_{\phi}^{ap}$ , ecuación 12) y *promedio con pesada preexponencial* ( $\langle\tau\rangle$ , ecuación 9), correspondientes a esa concentración de iones hidrógeno (pH 2.2). Para poder comparar el  $\tau$  aparente calculado, con el obtenido a partir del desfase proporcionado por el demostrador *DEMODE*, es necesario tener en cuenta la luz procedente de la fuente que llega al fotomultiplicador a pesar de los filtros (luz difusa o *scattering*) ya que, como se recoge más adelante en el epígrafe dedicado a la optimización de la cantidad de indicador soportada, la sensibilidad del optodo (recorrido en grados de fase) depende considerablemente de la cantidad de luz dispersa que recibe el detector. Esta luz parásita es la responsable de que el  $\tau_{\phi}$  que proporcionan los valores de desfase recogidos en el *DEMODE* sean inferiores a los que teóricamente deberían registrarse, teniendo en cuenta la frecuencia de modulación empleada y los dos tiempos de vida que exhibe la sonda inmovilizada en el soporte.

**Tabla 29.** Comparación del tiempo de vida de emisión del indicador  $[\text{Ru}(\text{s2d})_2(\text{pyim})]^{2-}$  a pH 2.2 y 25.0 °C, cuando se encuentra soportado sobre Imobilon-Ny<sup>+</sup> (40 nmol cm<sup>-2</sup>), determinado a partir del valor de desfase proporcionado por el prototipo DEMODE ( $\tau_{\phi}$ ) y calculado (ec. 12) a partir de los dos tiempos de vida de emisión individuales y sus proporciones relativas obtenidos mediante la técnica TC-SPC ( $\tau \pm 5\%$  de error).

$\tau_{\phi} / \text{ns}^a$	$\langle\tau\rangle / \text{ns}^b$	$\tau_{\phi}^{ap} / \text{ns}$	
1101	1603	1176 <sup>c</sup>	1650 <sup>d</sup>

a) 140 KHz,  $\tan\phi = 2\pi f\tau$

b) Tiempo de vida promedio, ecuación 9 (sin considerar la luz dispersa).

c) Tiempo de vida aparente, ecuación 12, 140 KHz (teniendo en cuenta la luz dispersa).

d) Tiempo de vida aparente, ecuación 12, 140 KHz (sin considerar la luz dispersa).

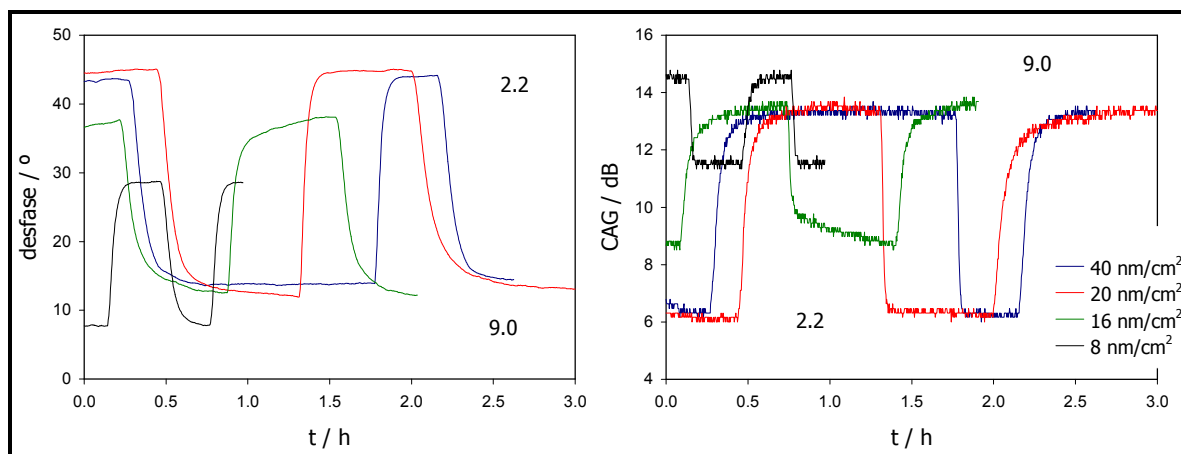
## 5.6. EVALUACIÓN ANALÍTICA DEL SENSOR LUMINISCENTE DE pH $[\text{Ru}(\text{s2d})_2(\text{pyim})]^{2-}/\text{Nylon}^+$ .

Con el protocolo de inmovilización seguido para preparar las fases sensibles al pH de *nylon* (apartado 6.5.3.b.), se obtienen membranas en las que el complejo  $[\text{Ru}(\text{s2d})_2(\text{pyim})]^{2-}$  no se distribuye por igual en las dos caras de la misma. Por el contrario, se adsorbe una mayor cantidad de indicador aniónico en la cara que permanece expuesta a la disolución acuosa durante el proceso de

inmovilización. Esto no ocurre con el complejo que posee un ligando perfluoramida, ya que la larga cadena perfluorada facilita una mayor retención del complejo sobre las matrices poliméricas ensayadas. El hecho de que las membranas no sean uniformes hace necesario la evaluación de los dos lados del soporte teñido, con el fin de establecer su colocación óptima en la célula de flujo. A pesar de que situando la **cara más coloreada** en contacto con la fibra la intensidad de emisión procedente de la membrana que recibe el fotomultiplicador es mayor (como pudo comprobarse por el CAG medido), las curvas de respuesta al pH obtenidas en ambos casos son claramente más favorables, en cuanto a mayor fotoestabilidad y tiempo de respuesta, cuando dicha cara **se expone directamente a la disolución reguladora**, probablemente debido a la dificultad que supone para los iones hidrógeno atravesar la membrana de Immobilon-Ny<sup>+</sup>. Por consiguiente, todos los estudios de evaluación y optimización analítica de las membranas sensibles se llevaron a cabo utilizando dicha disposición en el extremo del haz de fibras ópticas bifurcado.

### 5.6.1. INFLUENCIA DE LA CANTIDAD DE INDICADOR INMOVILIZADA.

Una vez seleccionado el indicador y soporte idóneos para la construcción de la fase sensible del sensor óptico de pH, se procedió a la evaluación y posterior optimización de algunos parámetros significativos, como el efecto de la cantidad de complejo de Ru(II) indicador adsorbido sobre el polímero catiónico de *nylon*. Para ello, siguiendo el mismo procedimiento de inmovilización descrito en la *Parte experimental* de este optodo (apartado 6.5.3.b.), se prepararon membranas con distinta cantidad de indicador soportado mediante inmersión en disoluciones reguladoras de tampón fosfato 10 mM de valores extremos de pH (2.2 y 9.0) y registrando los cambios producidos por los iones hidrógeno e hidroxilo del medio en el desfase de la emisión registrado por el demostrador instrumental *DEMOMODE*. La cantidad de indicador soportada se calculó considerando que la sonda se inmoviliza por igual en ambas caras de la membrana, aunque obviamente y como se ha indicado anteriormente, esto no es cierto.



**Figura 66.** Curvas de respuesta al pH a partir de las cuales se obtuvieron los datos resumidos en la tabla 30. En todos los casos se bombeó un flujo de disolución reguladora de 0.9 mL/min, termostatizando el sistema a 25.0 °C y modulando el led de excitación a 140 KHz.

**Tabla 30.** Influencia en la señal analítica de la cantidad de  $[\text{Ru}(\text{s}2\text{d})_2(\text{pyim})]^{2-}$  soportado en la membrana *Immobilon-Nyt*.  $\Delta\phi$  es el recorrido, en grados de desfase, registrado por el sistema *DEMODE* cuando el sensor es expuesto a pH 2.2 y 9.0. Se muestra también el tiempo requerido por cada una de las membranas evaluadas para alcanzar el 90% de la señal final.

	40 nmol cm <sup>-2</sup> a	20 nmol cm <sup>-2</sup>	16 nmol cm <sup>-2</sup>	8 nmol cm <sup>-2</sup>
$\Delta\phi$ / °	28.8	31.9	25.5	20.7
$t_{90}$ (pH 2.2 → pH 9.0) / min	13	18	16	7
$t_{90}$ (pH 9.0 → pH 2.2) / min	4	5	11	5

a) La disolución a partir de la cual se preparó esta membrana quedó ligeramente coloreada tras la adsorción del indicador, lo que nos hace suponer que se alcanzó la cantidad máxima de luminóforo que admite este soporte.

En la figura 66 y tabla 30 se observa que, a medida que aumenta la cantidad de indicador inmovilizado en el soporte, se incrementa la excursión del desfase determinado por el sistema de medida, hasta llegar a un valor (20 nmol cm<sup>-2</sup>) a partir del cual la respuesta al pH disminuye ligeramente. La membrana en la que se adsorbió mayor cantidad de complejo metálico se preparó a partir de una disolución madre que quedó levemente coloreada tras la

exposición al soporte, lo que nos indica que éste no admite más moléculas de indicador. La elevada cantidad de luminóforo adsorbido puede dar lugar al denominado *efecto de filtro interno*, es decir, la absorción de luz en el terminal es tal que no todas las moléculas de indicador adsorbidas se excitan, con la consiguiente pérdida de luminiscencia. En efecto, el control automático de ganancia de luz recibida por el fotomultiplicador del sistema *DEMOMODE* (figura 66, derecha) demuestra que la emisión es idéntica en los dos valores de pH evaluados para los terminales cargados con 40 y 20 nmolcm<sup>-2</sup> de indicador, a pesar de que en los primeros se duplica la cantidad de moléculas emisoras, lo que confirma la pérdida de emisión en las membranas saturadas del complejo de Ru(II) sensible al pH.

La figura 66 muestra, asimismo, que los valores de desfase recogidos por el equipo no coinciden en los terminales ensayados a pesar de tratarse del mismo complejo de Ru(II). Esto se debe a que, como hemos visto en el apartado anterior, al contrario que en disolución en medio heterogéneo no todas las moléculas de indicador poseen idéntico entorno, lo que da lugar a una distribución de  $\tau$  en la membrana. Además, la eventual reflexión de luz (difusa) en el soporte, procedente del led de excitación (que emite algo de luz roja a pesar de ser azul) y que llega al PMT a pesar de los filtros ópticos empleados, contribuye al desfase global inducido por el terminal (ver apartado 5.5). Así, cuando la concentración de indicador es pequeña, el "*peso*" de la emisión del *fondo* introducido por el soporte sobre el tiempo de vida aparente es mayor (ver ecuación 12), lo que se manifiesta en menores valores de desfase. Por el contrario, cuando la sonda satura la membrana, la reflexión de luz afecta en menor medida al retardo observado, el cual se debe únicamente a la luminiscencia del complejo de Ru(II). Este efecto es mucho más acusado cuando la fase sensible se encuentra en medio alcalino, debido a que al ser menor la cantidad de luz emitida por la sonda desprotonada el *peso* de la emisión del *fondo* es mayor.

A pesar de que la membrana saturada con la sonda presenta un recorrido en desfase ligeramente menor, el tiempo de respuesta que exhibe es significativamente más corto, por lo que se seleccionó este terminal para continuar la evaluación del optodo de pH desarrollado.



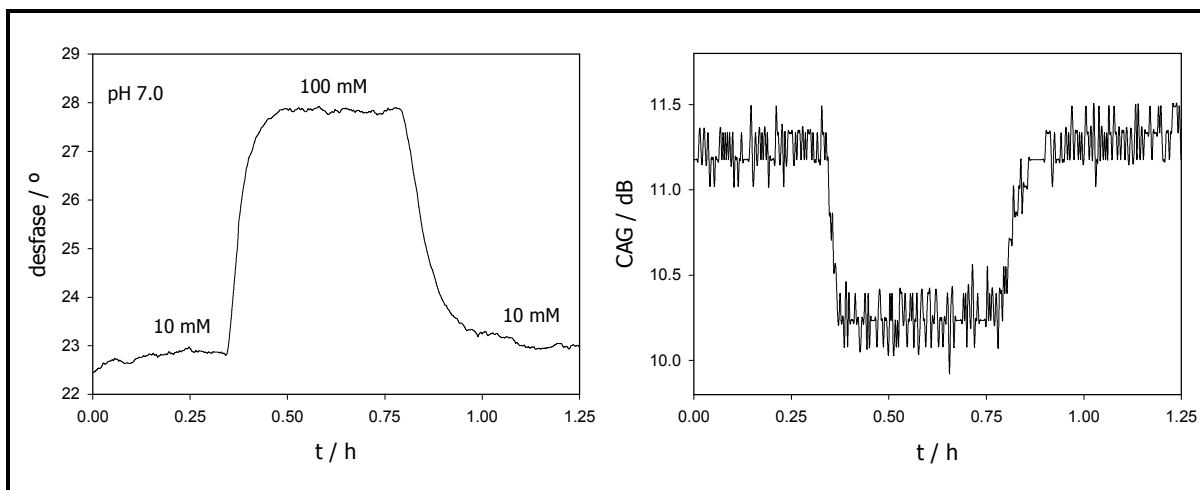
### 5.6.2. INFLUENCIA DE LA FUERZA IÓNICA.

Los sensores ópticos de pH, a diferencia de los potenciométricos que miden *actividad*, se basan en los cambios que experimenta alguna de sus propiedades ópticas con la **concentración** de la especie ácida o básica presentes en el medio (ver *Antecedentes* de este optodo). En disoluciones muy diluidas, en las que la fuerza iónica es débil, el valor del pH puede correlacionarse directamente con la concentración de dichas especies, despreciándose el error cometido por el efecto de la fuerza iónica. Por el contrario, cuando la concentración de iones en la disolución aumenta, es necesario aplicar un factor de corrección al valor del pH obtenido por métodos ópticos, función de la fuerza iónica, la temperatura y el disolvente (ecuación 25, apartado 2, *Antecedentes* de pH).

Los estudios realizados hasta el momento con los nuevos complejos de Ru(II) con propiedades ácido-base sintetizados, se llevaron a cabo utilizando tampón fosfato en concentración 10 mM. La elección del regulador de pH está basada en la existencia de tres átomos de hidrógeno ionizables en su molécula ( $pK_a$  2.2, 7.2 y 12.3, respectivamente), lo que permite preparar disoluciones en un amplio intervalo de pH. Asimismo, la concentración escogida (10 mM) pretende minimizar el efecto de la fuerza iónica, sin perder la capacidad reguladora del tampón. Algunos autores que utilizan diferentes tampones en función de la región de pH examinada, añaden un electrolito soporte a la disolución para fijar la influencia de la fuerza iónica (NaCl o KCl 0.1 M).<sup>113</sup> Sin embargo, hay que tener en cuenta que una concentración tan elevada de iones en el medio puede provocar un cambio importante en la constante de acidez del indicador (efecto salino).<sup>3</sup>

En la figura 67 se aprecia el cambio que introduce un aumento en la concentración del tampón fosfato en el desfase y en el control automático de ganancia (CAG) registrado por el demostrador optoelectrónico, manteniendo constante el pH de la disolución. La luz recibida por el fotomultiplicador es mayor cuando se incrementa la fuerza iónica, lo que se correlaciona con un mayor retardo ( $\sim 5^\circ$  de desfase) para una misma concentración de iones hidrógeno (pH 7.0). El aumento de la emisión del complejo (y, por tanto, su  $\tau$ ), que se observa al incrementar la fuerza iónica, indica una disminución de la constante de acidez del indicador (es decir, mayor  $pK_a$ ). La ecuación 25 predice este comportamiento con la fuerza iónica para un equilibrio del tipo concreto que estamos estudiando

( $M^{2-} + H_2O \rightleftharpoons M^{3-} + H_3O^+$ ) ya que  $\gamma$  disminuye con el aumento de la fuerza iónica y esta disminución es muy superior para los iones de mayor carga (ecuación de Debye Huckel, 27).<sup>80b</sup>



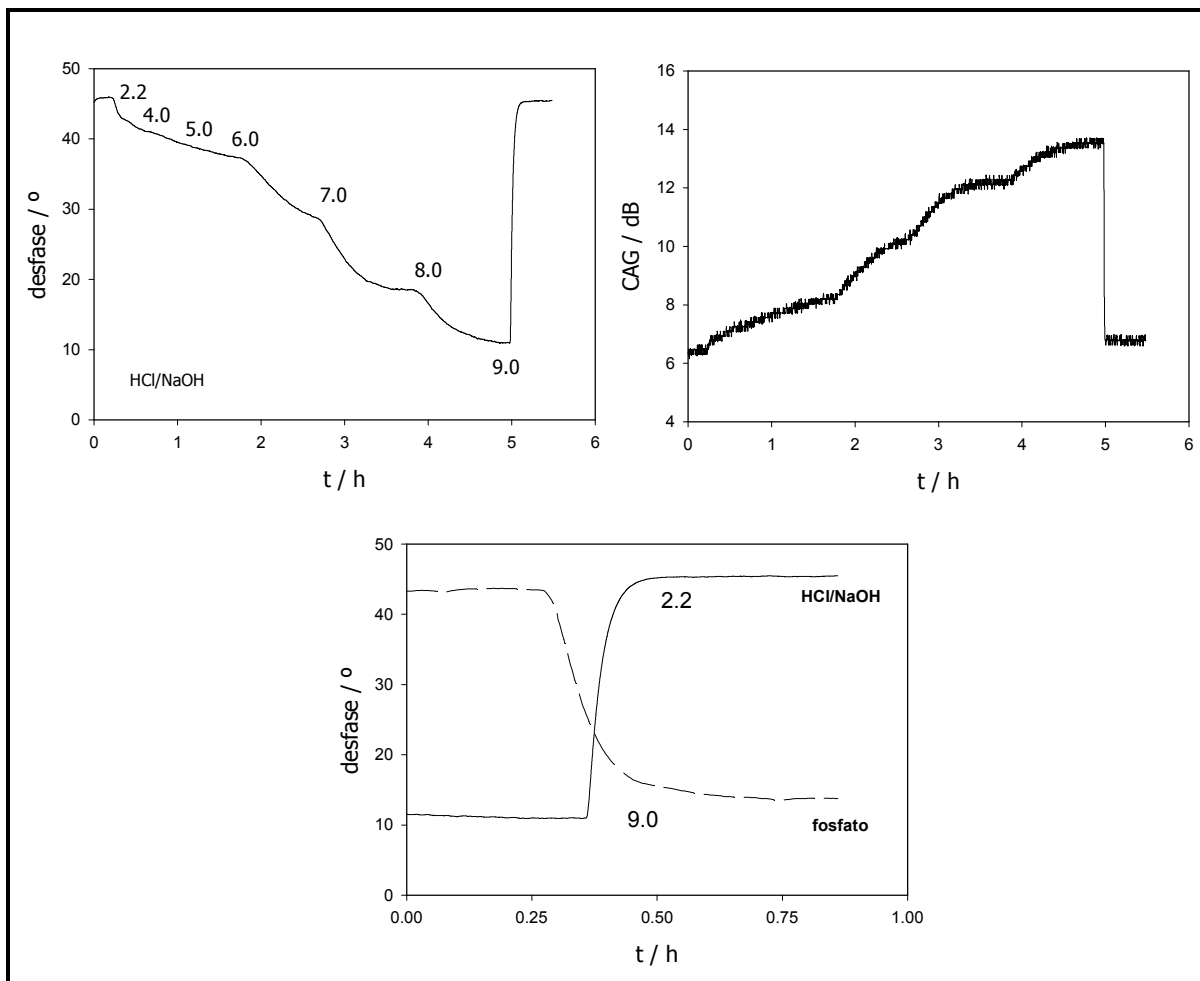
**Figura 67.** Influencia de la concentración de disolución reguladora sobre la luminiscencia del indicador  $[Ru(s2d)_2(pyim)]^{2-}$  inmovilizado en una membrana Immobilon-Ny<sup>+</sup> ( $40 \text{ nmol cm}^{-2}$ ). El flujo de tampón empleado, la temperatura y el pH (0.9 mL/min,  $25.0 \text{ }^\circ\text{C}$  y pH 7.0, respectivamente) se mantuvieron constantes para evitar la interferencia que estos parámetros pueden introducir en la medida. El led de excitación del sistema DEMODE se modula 140 KHz.

Es imprescindible, por tanto, **calibrar el sensor óptico en función de la fuerza iónica** del medio para poder corregir los valores de pH obtenidos. Por otro lado, a pesar de que la membrana utilizada para llevar a cabo este estudio está saturada de indicador, la elevada concentración salina **no provoca el lavado de la sonda**, como demuestran los ciclos reproducibles registrados por el CAG del equipo, lo que confirma la robustez de los terminales sensibles fabricados.

### 5.6.3. INFLUENCIA DE LA DISOLUCIÓN REGULADORA.

El complejo  $[Ru(pzth)_3]^{2+}$  posee en su estructura, al igual que el indicador  $[Ru(s2d)_2(pyim)]^{2-}$ , seleccionado para construir el optodo de pH, nitrógenos heterocíclicos protonables/desprotonables cuando la sonda se encuentra en su estado excitado. Diversos estudios realizados con el primero revelan que se

produce una transferencia protónica irreversible desde la molécula de tampón (ácido de Brønsted) hasta el complejo de Ru(II) excitado y, por tanto, los cambios observados en las propiedades ópticas del compuesto en función del pH dependen de la disolución reguladora presente en el medio.<sup>84</sup> Con objeto de confirmar que en el sensor óptico de pH desarrollado en esta Memoria la protonación/ desprotonación del indicador se produce a través del tampón (fosfato) empleado, o bien se trata de un auténtico equilibrio ácido-base en el estado excitado, se expuso una de las membranas Immobilon-Ny<sup>+</sup> con el complejo  $[\text{Ru}(\text{s}2\text{d})_2(\text{pyim})]^{2-}$  a distintas concentraciones de iones hidrógeno procedentes de mezclas HCl/NaOH 10 mM. Los cambios observados en el desfase recogido por el dispositivo instrumental *DEMODOE* demuestran que la desprotonación del *imidazol* no sólo se produce en presencia de los aniones  $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$  (figura 68), por lo que la utilización del optodo no está condicionada por la presencia del tampón fosfato. La respuesta al pH (2.2/9.0) obtenida en este estudio, sin embargo, no es idéntica a la observada con la misma membrana empleando la disolución reguladora, lo cual indicaría nuevamente la naturaleza irreversible de la desprotonación del  $[\text{Ru}(\text{s}2\text{d})_2(\text{pyim})]^{2-}$  en su estado excitado <sup>3</sup>MLCT (apartado 5.3.3.) ya que las constantes de transferencia protónica desde el mismo a las bases  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ,  $\text{HPO}_4^{2-}$  y  $\text{OH}^-$  no serían iguales. Afortunadamente, la cercanía del  $\text{p}K_a^*$  del indicador al valor de 7 hace que la mayor constante de velocidad esperable para el  $\text{OH}^-$  frente a los aniones  $\text{H}_n\text{PO}_4^{m-}$  quede compensada por la muy inferior concentración del mismo en la región de electroneutralidad ( $10^{-7}$  M), haciendo que el sensor sea útil tanto en presencia como en ausencia del regulador de pH (figura 68 inferior).

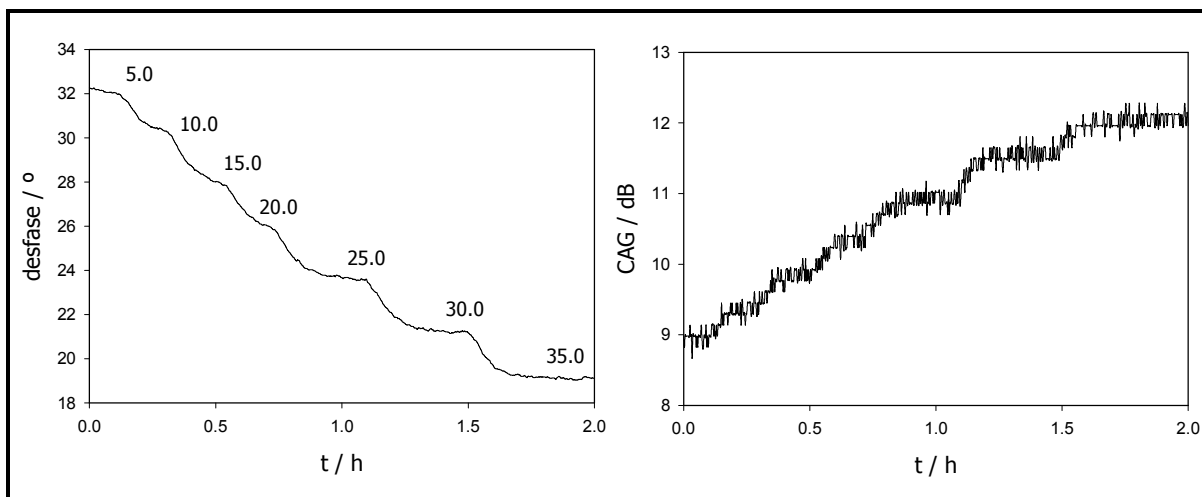


**Figura 68.** Curva de respuesta del optodo cuando los cambios de pH están provocados por mezclas HCl / NaOH 10 mM. Las medidas se realizaron modulando el sistema *DEMODOE* a 140 KHz y manteniendo el sistema termostatzado a 25.0 °C. Al no tratarse de un medio tamponado los valores de pH intermedios resultan muy inestables. En el estudio se empleó una membrana Immobilon-Ny<sup>+</sup> con 40 nmol cm<sup>-2</sup> de [Ru(s2d)<sub>2</sub>(pyim)]<sup>2-</sup> adsorbidos. La figura inferior compara la respuesta de esta membrana ante el mismo cambio de pH en medio HCl/NaOH y tampón fosfato (ambos 10 mM).

#### 5.6.4. INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA.

La desactivación de la luminiscencia de los complejos de Ru(II) con este parámetro físico ha permitido el desarrollo del sensor óptico de temperatura descrito con anterioridad en esta Memoria. Por este motivo se hace necesaria una calibración con la temperatura de aquellos optodos cuya fase sensible esté constituida por estos luminóforos. Como era de esperar, el indicador [Ru(s2d)<sub>2</sub>(pyim)]<sup>2-</sup> muestra un descenso en su emisión a medida que aumenta la temperatura de la disolución de medida, en la que el pH se mantuvo constante.

Sin embargo, la variación observada ( $0.44\text{ }^{\circ}/^{\circ}\text{C}$ , inferior a la establecida para el optodo de temperatura desarrollado:  $\text{pHCl/PCA}$ ,  $0.56\text{ }^{\circ}/^{\circ}\text{C}$ , tabla 14) presenta un comportamiento lineal en el intervalo de temperaturas estudiado ( $5\text{-}35\text{ }^{\circ}\text{C}$  a  $\text{pH}$  7.0:  $y = a + bx$ ,  $a = 35.5 \pm 0.2$ ,  $b = -0.44 \pm 0.01$ ,  $r = 0.998$ ), lo que facilita en gran medida la corrección del sensor óptico de pH.

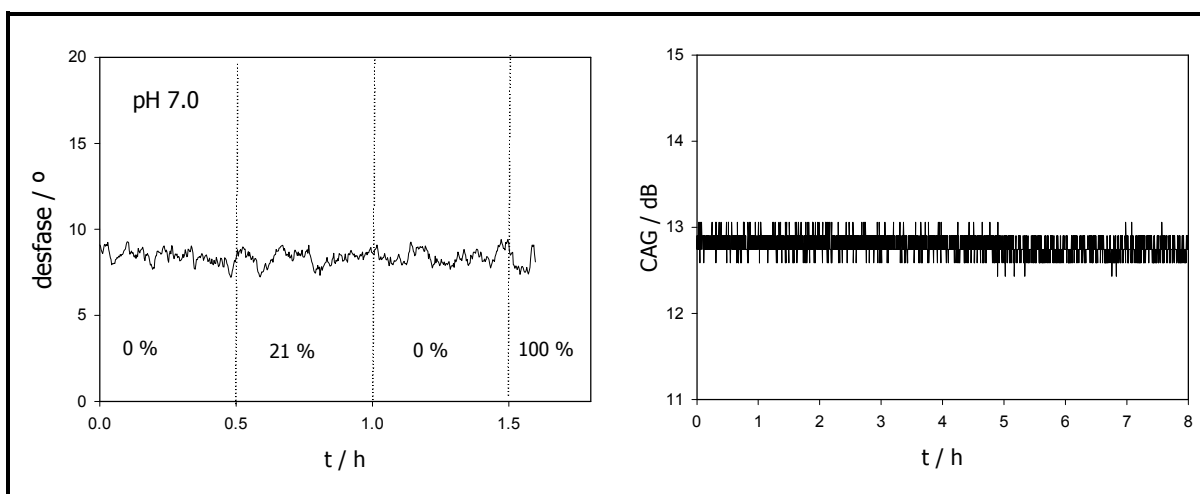


**Figura 69.** Interferencia de la temperatura en el sensor óptico de pH desarrollado ( $[\text{Ru}(\text{s}2\text{d})_2(\text{pyim})]^{2-}$  adsorbido sobre  $\text{Immobilon-Ny}^+$ ,  $40\text{ nmol cm}^{-2}$ ). Las medidas se realizaron por detección sensible a la fase en el prototipo *DEMODE*, manteniendo constante la concentración de protones ( $\text{pH} = 7.0$ ) y aumentando la temperatura de la disolución reguladora con un baño termostático. De nuevo la frecuencia de modulación elegida fue la máxima permitida por el equipo ( $140\text{ KHz}$ ) y el flujo de tampón fosfato  $10\text{ mM}$  bombeado  $0.9\text{ mL min}^{-1}$ .

### 5.6.5. INFLUENCIA DEL OXÍGENO DISUELTO.

En numerosas ocasiones a lo largo de esta Memoria se ha destacado la influencia del oxígeno disuelto sobre los complejos de  $\text{Ru(II)}$ . Este gas actúa desactivando eficazmente la luminiscencia de los mismos por transferencia de energía, permitiendo la fabricación del sensor óptico de oxígeno que forma parte de este Proyecto.<sup>35</sup> Hasta este momento todos los estudios llevados a cabo con los indicadores de pH sintetizados, tanto en disolución como en fase sólida, se han

realizado con disoluciones reguladoras *equilibradas al aire*, en las que la concentración de oxígeno se mantuvo por tanto constante. Sin embargo, el objetivo de este sensor es la medida del pH en aguas en las que cabe esperar importantes cambios en la concentración de oxígeno en función del grado de contaminación que presenten. Por todo ello, al igual que la temperatura, el oxígeno puede constituir un interferente para los optodos fabricados con complejos de Ru(II), por lo que requieren en su caso un calibrado paralelo.



**Figura 70.** Influencia del oxígeno disuelto (en %, respecto a la solubilidad máxima del oxígeno en agua a 1 atm) sobre la luminiscencia del sensor óptico de pH desarrollado. Para llevar a cabo este estudio se empleó como fase sensible una membrana catiónica de *nylon* con  $[\text{Ru}(\text{s}2\text{d})_2(\text{pyim})]^{2-}$  ( $20 \text{ nmol cm}^{-2}$ ) sumergida en una disolución de tampón fosfato 10 mM a pH 7.0, termostatzada a  $25.0 \text{ }^\circ\text{C}$ . El led de excitación del sistema *DEMODE* se moduló a 140 KHz.

Para comprobar cómo influye la cantidad de oxígeno presente en la disolución reguladora sobre la luminiscencia exhibida por el indicador inmovilizado, se monitorizó la respuesta del sensor, por detección sensible a la fase, cuando se bombea hasta el terminal sensible tampón fosfato 10 mM a pH 7.0, previamente saturado de oxígeno, nitrógeno o con una mezcla de ambos. El aumento del ruido en los valores de desfase registrados se debe a la baja precisión del baño termostático empleado para controlar la temperatura del sistema ( $\pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ ) así como a las burbujas del gas bombeado hasta la disolución reguladora, que se acumulan en las inmediaciones de la membrana impidiendo el correcto acceso hasta la misma del tampón.

Como puede observarse en la figura anterior, el desfase recogido por el sistema *DEMODE* **no muestra ningún cambio** en presencia del gas potencialmente interferente, debido probablemente a que el soporte escogido dificulta la colisión del oxígeno molecular con el indicador fotoexcitado en el tiempo de vida del mismo (aprox. 500 ns a pH 7.0), impidiendo que ambas moléculas entren en contacto y se produzca la transferencia de energía por intercambio electrónico que da lugar a la disminución de la luminiscencia del complejo de Ru(II). En la bibliografía se ha descrito cómo la unión electrostática de complejos de Ru(II) a polímeros provoca una disminución de hasta 10 veces en la constante de desactivación por O<sub>2</sub> ( $\kappa_q$ ).<sup>59</sup> La unión electrostática a Immobilon-Ny<sup>+</sup> es de esperar que provoque una disminución aún mayor.

El experimento descrito ha permitido asimismo establecer la **fotoestabilidad** del indicador. El control automático de ganancia (figura 70, dcha.) no muestra cambios significativos en la cantidad de luz que recibe el fotomultiplicador procedente del indicador, tras ser éste irradiado ininterrumpidamente durante 8 h seguidas por el *led* azul de alta intensidad que incorpora el prototipo *DEMODE*. Experimentos más recientes realizados en nuestro grupo de investigación han demostrado la fotoestabilidad de la membrana sensible al pH durante más de una semana de irradiación por la fuente *led* (datos no mostrados).

#### 5.6.6. CARACTERIZACIÓN ANALÍTICA.

Finalmente, a fin de comparar los tiempos de vida de emisión aparentes que exhibe la sonda inmovilizada ( $\tau_{\phi}^{ap}$ ), obtenidos a partir de los valores de desfase proporcionados por el sistema *DEMODE*, con los que presenta el complejo

en disolución, se llevó a cabo la calibración de una de las membranas Immobilon-Ny<sup>+</sup> preparadas con el complejo [Ru(s2d)<sub>2</sub>(pyim)]<sup>2-</sup>. Como resultado de este estudio, se pudo concluir que los calibrados directo e inverso son coincidentes tanto en desfase como en intensidad de luz detectada (ausencia de histéresis), lo cual confirma que no se produce lavado del indicador (figura 71). Por otro lado, la representación frente al pH del desfase obtenido conduce a una curva sigmoideal cuya máxima pendiente (mayor sensibilidad a los cambios de pH) corresponde al intervalo de pH óptimo de medida (6.0-8.0, figura 71). Se observa asimismo que el intervalo de respuesta del indicador inmovilizado **aumenta** con respecto al observado para el mismo complejo en disolución (figura 59) consecuencia, sin duda, de la heterogeneidad de sitios de unión al *nylon* de la sonda luminiscente, lo que da lugar probablemente a la existencia de una distribución de valores de pK<sub>a</sub>. El indicador en medio homogéneo, por el contrario, presenta un único valor de la constante de acidez y, por tanto, su sensibilidad estará limitada al valor de su pK<sub>ap</sub>\* ± 1 unidad de pH (6.4 ± 1, tabla 27).

La tabla 31 resume algunos parámetros analíticos que caracterizan el sensor óptico de pH fabricado. La **resolución** del optodo se calculó para el intervalo de máxima sensibilidad a partir de la *desviación típica* ( $\sigma_{n-1}$ ) de los valores de desfase correspondientes a la concentración de iones hidrógeno donde la relación señal/ruido es menor (pH 8.0), dentro de la zona *lineal* del calibrado (6.0-8.0). El valor determinado es comparable con la precisión del pH-metro empleado para llevar a cabo este estudio ( $\pm 0.01$  unidades de pH), lo que da una idea de las prestaciones del optodo fabricado. Los **tiempos de respuesta** obtenidos para un cambio de una unidad de pH en dicha región son elevados en comparación con la rápida respuesta derivada de un método potenciométrico (prácticamente instantáneo), pero adecuados para las medidas en aguas objeto de este Proyecto.

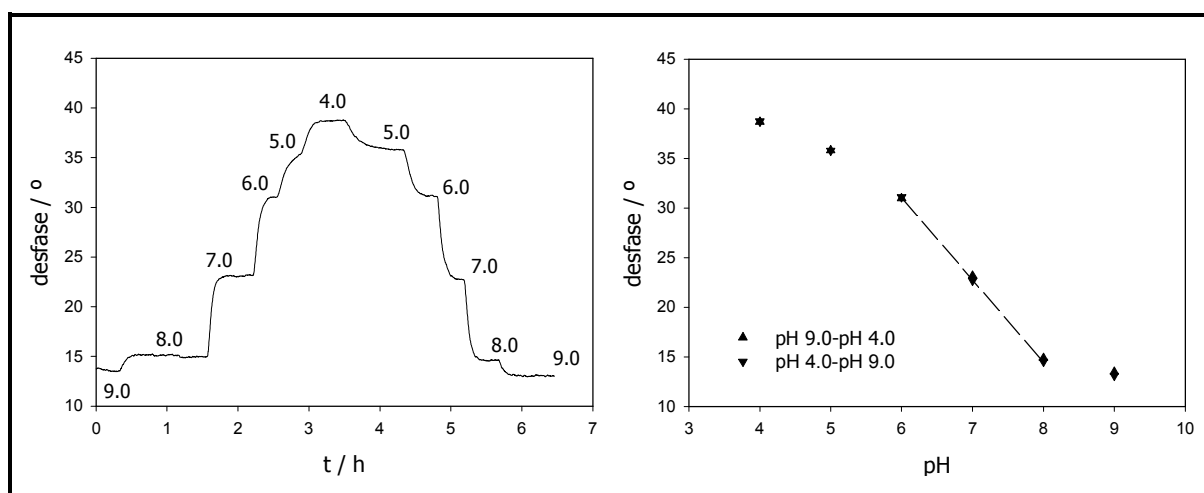
**Tabla 31.** Parámetros analíticos característicos del optodo de pH desarrollado, empleando como fase sensible una membrana *Immobilon-Ny<sup>+</sup>* con 40 nmol cm<sup>-2</sup> de [Ru(s2d)<sub>2</sub>(pyim)]<sup>2-</sup>.

f KHz <sup>a</sup>	$\Delta\phi$ (pH 6.0-8.0) o <sup>b</sup>	$\sigma_{n-1}$ (pH 8.0) o <sup>c</sup>	R unid. de pH <sup>d</sup>	t <sub>90</sub> (pH 6→7) min <sup>e</sup>	t <sub>90</sub> (pH 7→6) min <sup>e</sup>	t <sub>90</sub> (pH 7→8) min <sup>e</sup>	t <sub>90</sub> (pH 8→7) min <sup>e</sup>
-----------------------	--	--	----------------------------------	---	---	---	---



140	16.6	0.04	0.02	9	8	8	6
-----	------	------	------	---	---	---	---

- Frecuencia de modulación del led de excitación empleada en este estudio.
- Recorrido (en grados de desfase) del intervalo de máxima sensibilidad (6.0-8.0).
- Desviación típica de los valores de desfase correspondientes a pH = 8.0 (n = 100).
- Resolución.  $R = 3\sigma / m$  (99% de confianza, m: pendiente de la recta de la región lineal del calibrado).
- Tiempo de respuesta cuando se ha alcanzado el 90% de la señal. Corresponde a un cambio en una unidad de pH.

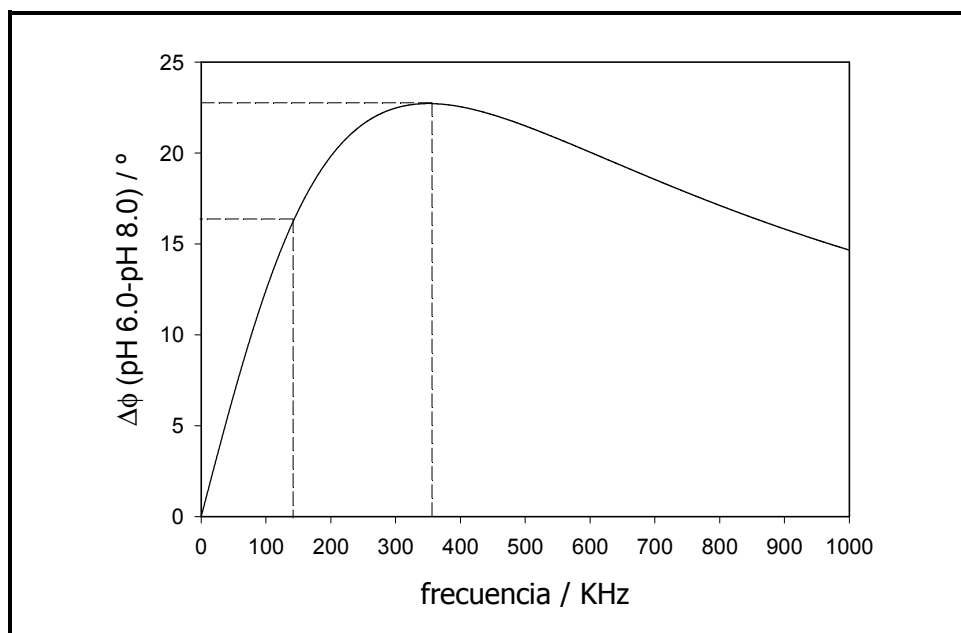


**Figura 71.** Izq.: Función de respuesta típica del complejo  $[\text{Ru}(\text{s2d})_2(\text{pyim})]^{2-}$  adsorbido en  $\text{immobilon-Ny}^+$  ( $40 \text{ nmolcm}^{-2}$ ). En la gráfica de la derecha se ha representado la curva de calibrado resultante de la medida del desfase recogido por el sistema *DEMODE*, modulado a 140 KHz, para distintos valores de pH (tampón fosfato 10 mM a 25.0 °C). Se observa que la sigmoide presenta un hábito prácticamente lineal en el intervalo óptimo de medida (6.0-8.0).

### 5.6.7. FRECUENCIA ÓPTIMA DE MODULACIÓN DEL LED DE EXCITACIÓN PARA EL OPTODO DE pH.

A partir de los valores de los tiempos de vida de emisión que presenta el indicador en la membrana finalmente seleccionada para construir el sensor óptico de pH, calculados a partir del desfase registrado en el demostrador *DEMODE* (682 ns a pH 6.0 y 302 ns a pH 8.0), se puede deducir la frecuencia óptima de modulación del diodo emisor de luz con la que se obtendría un recorrido máximo, en grados de desfase, entre los valores de pH en los que la sonda muestra una máxima sensibilidad (6.0-8.0,  $\phi = \arctan[2\pi f\tau]$ ), lo que se traduciría en una mayor precisión en la medida. El resultado de los cálculos teóricos realizados se recoge en la figura 72, donde se observa que la frecuencia óptima corresponde a un valor

de **350 KHz**, el cual daría lugar a una excursión de fase de  $22.7^\circ$ , frente a los  $16.6^\circ$  obtenidos a 140 KHz.<sup>#</sup>



**Figura 72.** Excursión, en grados de desfase, que se obtendría a distintas frecuencia de modulación del diodo azul de excitación, entre los dos valores de pH examinados (6.0-8.0). La curva teórica se deduce a partir de los tiempos de vida de emisión aparentes (682 y 302 ns, respectivamente) que presenta el indicador  $[\text{Ru}(\text{s}2\text{d})_2(\text{pyim})]^{2-}$  en la membrana Immobilon-Ny<sup>+</sup> a dichos valores de pH [ $\phi = \arctan(2\pi f\tau)$ ].

<sup>#</sup> El sistema optoelectrónico recientemente desarrollado para su comercialización permite alcanzar una frecuencia de modulación de 500 KHz.

## 6. PARTE EXPERIMENTAL.

A continuación se describen los distintos reactivos y disolventes utilizados en la preparación de los complejos de Ru(II) que se han investigado como potenciales indicadores ópticos de pH, así como los correspondientes métodos de síntesis y resultados de su caracterización estructural por resonancia magnética nuclear de protón, espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier y/o espectrometría de masas. Seguidamente, se detallan los equipos y técnicas utilizadas para la determinación de sus propiedades espectroscópicas en disolución e inmovilizados en matrices poliméricas adecuadas, describiendo previamente los procesos de incorporación de las sondas a las mismas. Finalmente, en este epígrafe se enumeran también los estudios llevados a cabo por luminiscencia con *detección sensible a la fase* en el demostrador optoelectrónico desarrollado por T.G.I. empleando las fases sensibles elaboradas, con el fin de estimar su validez como sensores ópticos de pH.

### 6.1. REACTIVOS Y MATERIALES EMPLEADOS.

- **Indicadores.**

- [Bis(2,2'-bipiridina)(dibenzo[h,j]dipirido[3,2-a:2',3'-c]fenazina)]rutenio(II), **[Ru(bpy)<sub>2</sub>(ddz)]<sup>2+</sup>**.<sup>73</sup>
- [Bis(1,10-fenantrolina)(4-(1',5',9'-triazanonil-1,10-fenantrolina)]rutenio(II), **[Ru(phen)<sub>2</sub>(tanphen)]<sup>4+</sup>**.<sup>73</sup>
- [Tris(2-(2-pirazinil)tiazol)]rutenio(II), **[Ru(pzth)<sub>3</sub>]<sup>2+</sup>**.<sup>76</sup>
- [Tris(5-perfluorooctanamida-1,10-fenantrolina)]rutenio(II), **[Ru(F15ap)<sub>3</sub>]<sup>2+</sup>**.
- [Bis(1,10-fenantrolina)(5-perfluorooctanamida-1,10-fenantrolina)]rutenio(II), **[Ru(phen)<sub>2</sub>(F15ap)]<sup>2+</sup>**.
- [Bis(4,4'-disulfo-2,2'-bipiridina)(5-perfluorooctanamida-1,10-fenantrolina)]rutenio(II), **[Ru(s2b)<sub>2</sub>(F15ap)]<sup>2-</sup>**.
- [Bis(1,10-fenantrolina)(5-amino-1,10-fenantrolina)]rutenio(II), **[Ru(phen)<sub>2</sub>(5-NH<sub>2</sub>p)]<sup>2-</sup>**.
- [Bis(4,7-di(sulfofenil)-1,10-fenantrolina)(2-(2'-piridil)imidazol)]rutenio(II), **[Ru(s2d)<sub>2</sub>(pyim)]<sup>2-</sup>**.

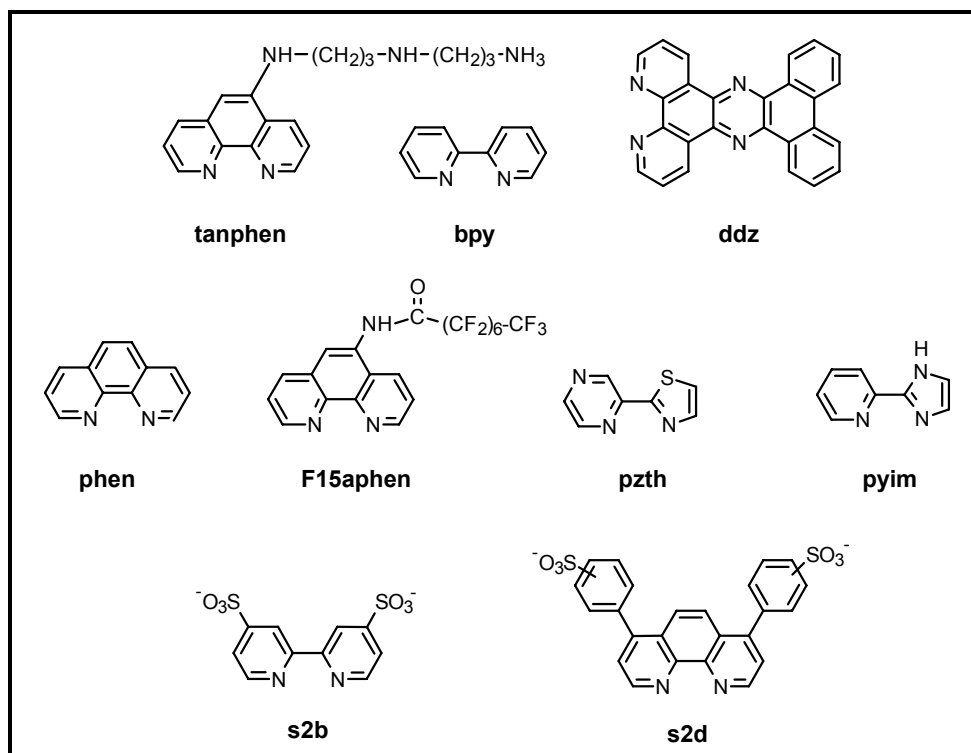


Figura 73. Estructura de los ligandos quelatantes que forman parte de los complejos de Ru(II) evaluados como potenciales sondas de pH.

#### • Disolventes.

- Acetona (*Merck, Lichrosolv*).
- Acetonitrilo (*SDS, HPLC*).
- Acetonitrilo- $d_3$  (*Merck o Scharlau, > 99.8% D*).
- Ácido acético glacial (*Panreac, químicamente puro*).
- Agua purificada, obtenida de un sistema MilliQ (*Millipore*).
- Dietil éter (*Panreac, HPLC, > 98% y SDS, para análisis*).
- Dimetilsulfóxido- $d_6$  (*Merck, Uvasol<sup>®</sup>, > 99.8% D*).
- *N,N*-Dimetilformamida (*Panreac, 99.8%, UV-IR o HPLC*).
- Etanol absoluto (*Panreac, UV/IR, 99.8%*).
- Etilenglicol (*Aldrich, > 99%*).
- Metanol (*Merck, Lichrosolv gradiente o SDS, HPLC*).
- Metanol- $d_4$  (*Scharlau o SDS, > 99.8%*).
- *n*-Propanol (*Scharlau, purísimo*).

- **Reactivos empleados en la síntesis de los indicadores.**
  - Tricloruro de rutenio trihidrato (*Aldrich*).
  - 1,10-Fenantrolina monohidrato (*Merck*, para análisis).
  - 5-Nitro-1,10-fenantrolina (*Sigma*, anhídrido).
  - Paladio sobre carbono al 10% (*Fluka*, purísimo).
  - Monohidrato de hidrazina (*Fluka*, > 99%).
  - 4,7-di(sulfofenil)-1,10-fenantrolina disódica ("*Batofenantrolina*" disulfonada, s2d), (*Fluka*, 99%).
  - Cloruro de litio (*Panreac*).
  
- **Reactivos y materiales empleados en la purificación de los indicadores.**
  - Placas de gel de sílice, para CCF (*Merck 60 F<sub>254</sub>*, 0.2 mm de espesor de capa).
  - Arena de mar (*Panreac*).
  - Cloruro sódico (*Fluka*, para análisis).
  - Hexafluorofosfato amónico (*Fluka*, > 98%).
  - Hidróxido sódico (*Quimipur*).
  - DEAE-Sephadex<sup>®</sup> A-50 (*Sigma*).
  - CM-Sephadex<sup>®</sup> C25 (*Pharmacia*).
  - Sephadex<sup>®</sup> LH-20 (*Pharmacia*).
  
- **Reactivos empleados en las voltamperometrías cíclicas.**
  - Hexafluorofosfato de tetrabutilamonio (*Fluka*), purificado por disolución en agua caliente, reprecipitación con acetona y posterior secado en una estufa de vacío durante 48 h (40 °C, 0.1 mbar).
  - Nitrato de plata (*Probus*, 99.8%), secado durante 48 h en una estufa de vacío (40 °C, 0.1 mbar).
  
- **Gases.**
  - Ar (P-48, *Praxair*).
  - O<sub>2</sub> (N-40, *Air Liquide*).
  - N<sub>2</sub> (C-55, *Carbueros Metálicos*)
  
- **Disoluciones reguladoras. Reactivos empleados.**
  - Ácido fosfórico (*Fluka*).
  - Fosfato trisódico (*Panreac*).

- **Membranas, soportes poliméricos y reactivos empleados en la inmovilización de las sondas.**

- Membranas de poli(tetrafluoroetileno) hidrofiliado FHLC (*Millipore*, 0.5  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro, 8 mm de diámetro).
- Vidrio aminado (*Sigma*, Aminopropyl PG-glass 5019, 700 Å de tamaño de poro, 77  $\mu\text{mol NH}_2/\text{g}$  de vidrio).
- Pentabromuro de fósforo (*Aldrich*, 98%).
- Trifluorometanosulfonato de plata (*Fluka*, > 98%).
- Piridina anhidra (*Panreac*, destilada sobre  $\text{CaH}_2$  y conservada después sobre tamices moleculares de 3 Å).
- Nafion® (*Aldrich*, suspensión al 5% en alcoholes alifáticos).
- Membrana catiónica de polivinilideno fluorado (*Immobilon-CD*, *Millipore*).
- Membranas de nylon catiónicas: *Immobilon-Ny<sup>+</sup>* (*Millipore*), *Biodyne-B* y *Biodyne-Plus* (*Pall*).

- **Otros materiales y aparatos utilizados.**

- Placas filtrantes de vidrio sinterizado (*Afora*, poro 4).
- Filtros de PTFE (*Millipore*, Millex-FGS, 0.2  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro, 29 mm de diámetro).
- Tamices moleculares (*Scharlau*, 3 Å y *SDS*, 4 Å).
- Filtros de fibra de vidrio (*Macherey-Nagel*, MN 85/90,  $\varnothing$  5.5 cm).
- Estufa de vacío modelo 3608-1 (*Lab-line Instruments*), conectada a una bomba de vacío (*Edwards M-8*, -0.1 mbar).
- pHmetro (*WPA*, con electrodo WTW SENTIX 62,  $\pm 0.01$  unidades de pH).
- Bomba peristáltica Minipuls 3 (*Gilson*).
- Tubos FIA de silicona ( $\varnothing_{\text{int}} = 1.29$  mm, *Elkay*).
- Liofilizador CRIODOS-50 (*Telstar*, vacío máximo  $2.5 \times 10^{-4}$  mbar, -45 °C).
- Fibra óptica bifurcada de vidrio (8 mm de diámetro en el extremo común, 4.5 mm de diámetro en cada una de las ramas y 1.15 m de longitud total), con distribución interna de fibras al azar (*Dolan-Jenner E-472*).
- Filtros coloreados de corte (530 y 590 nm, 90% de transmitancia a partir de  $\lambda_{\text{corte}} + 60$  nm) (*Oriel*).
- Filtro interferencial con máximo de transmitancia a 420 nm (10 nm de anchura a mitad de la banda, 40% de transmitancia máxima, *Corion*).
- Cubetas de cuarzo de absorbancia y fluorescencia de 1 cm de paso óptico (*Hellma*).

- Cubeta de cuarzo de fluorescencia de 1 cm de paso óptico provista de un tubo de vidrio con llave Rotaflo® de PTFE para desoxigenar muestras.
- Balanza analítica (*Mettler AT261*,  $\pm 0.01$  mg).
- Baños termostáticos circulares (estabilidad térmica en el portamuestras que termostatizan):
  - e) *Polyscience*  $9105 \pm 0.5$  °C (precisión); resolución 0.1 °C.
  - f) *Polyscience*  $9001 \pm 0.25$  °C (precisión); resolución 0.01 °C.
  - g) *Haake* D8-GH  $\pm 1$  °C (precisión); resolución 0.1 °C.

- **Equipos espectroscópicos de medida.**

- Espectrofotómetro UV-VIS Cary-3 Bio (*Varian*).
- Espectrofluorímetros LS5 y LS50-B (*Perkin-Elmer*).
- Espectrómetro para medidas de emisión con resolución temporal FL-900 (*Edinburgh Instruments*).
- Dispositivo optoelectrónico para medidas de luminiscencia por detección sensible a la fase (demostrador *DEMODE*, T.G.I.).

## 6.2. PROCEDIMIENTOS DE SÍNTESIS.

Los complejos luminiscentes de Ru(II) evaluados como sondas de pH se sintetizaron siguiendo los procedimientos descritos en la bibliografía, introduciendo las modificaciones necesarias de tiempo de reacción y disolvente empleados en función de las características de solubilidad y reactividad de los ligandos que quelatan el metal. El principal inconveniente que presenta la preparación de estos indicadores estriba en la *purificación* de los mismos, extremadamente importante debido a la alta sensibilidad de los métodos analíticos con los que van a ser evaluados posteriormente.

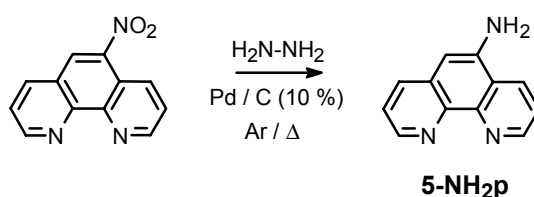
La síntesis de los ligandos responsables del comportamiento ácido-base de estas sondas se llevó a cabo siguiendo métodos convencionales de Química Orgánica. El calentamiento de los mismos con tricloruro de rutenio da lugar a complejos homolépticos (tres ligandos idénticos). Por el contrario, la preparación de los complejos heterolépticos requiere un paso previo de síntesis en el que se quelata el metal con los dos ligandos auxiliares en presencia de cloruro de litio en exceso, dando lugar a un dicloro bisquelatocomplejo. En todos los casos, el medio

de reacción se aisló bajo argón para facilitar la reducción in situ del Ru(III) a Ru(II), especie termodinámicamente más estable.

### 6.2.1. SÍNTESIS DE LIGANDOS.

#### • PREPARACIÓN DE 5-AMINO-9,10-FENANTROLINA.

Para obtener este precursor, se redujo químicamente el correspondiente nitroderivado siguiendo el método descrito por Nasielski-Hinkens et al.:<sup>146</sup>



Sobre una suspensión de 0.13 g de paladio sobre carbono (al 10%) en etanol absoluto se añadieron 4.29 mmol de 5-nitro-1,10-fenantrolina. A continuación, se incorporó gota a gota 1 mL (21 mmol) de hidrato de hidrazina y se calentó la mezcla con agitación magnética durante 3 h a 70 °C. La evolución de la reacción se siguió por CCF utilizando como eluyente una mezcla de etanol-amoníaco 40:1 (v/v). Finalizada ésta, se filtró en caliente el crudo a través de un embudo Büchner provisto de filtro de fibra de vidrio para eliminar el catalizador, separándose de la disolución alcohólica fría la 5-amino-1,10-fenantrolina en forma de cristales amarillos que se secaron durante 24 h a vacío (0.1 mbar).

RENDIMIENTO: 76%

#### □ Caracterización espectroscópica.

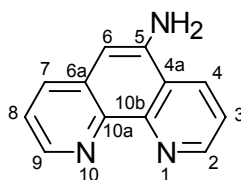
**IR** (KBr),  $\nu/\text{cm}^{-1}$ : 3416, 3323, 3227 ( $\nu_{\text{NH}_2}$  arom.), 3050 ( $\nu_{\text{C-H}}$  arom.), 1638, 1612, 1595, 1489, 1429 ( $\nu_{\text{C=C}}$ ,  $\nu_{\text{C=N}}$  arom.), 843, 741 ( $\delta_{\text{C-H}}$  arom.).

<sup>146</sup> Nasielski-Hinkens, R., Benedek-Vamos, M., y Maetens, D., *J. Heterocycl. Chem.*, **1980**, 17, 873.



**$^1\text{H-RMN}$**  (DMSO- $d_6$ ),  $\delta$ /ppm: 8.99 (dd, 1H<sub>2</sub>), 8.63 (dd, 1H<sub>4</sub>), 8.63 (dd, 1H<sub>9</sub>), 7.98 (dd, 1H<sub>7</sub>), 7.70 (dd, 1H<sub>8</sub>), 7.44 (dd, 1H<sub>3</sub>), 6.81 (s, 1H<sub>6</sub>), 6.10 (s, NH).

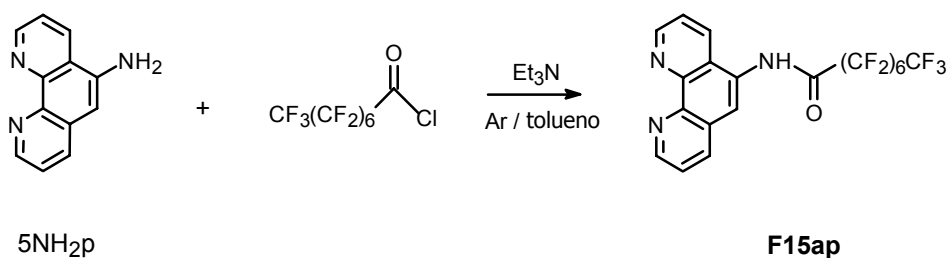
$J_{2,3} = J_{8,9} = 4.2$  Hz,  $J_{2,4} = J_{7,9} = 1.7$  Hz,  $J_{3,4} = J_{7,8} = 8.3$  Hz.



**$^{13}\text{C-RMN}$**  (DMSO- $d_6$ ),  $\delta$ /ppm: 149.3 (C<sub>2</sub>), 146.2 (C<sub>10b</sub>), 144.8 (C<sub>9</sub>), 142.6 (C<sub>5</sub>), 140.5 (C<sub>10a</sub>), 132.7 (C<sub>4</sub>), 130.8 (C<sub>7</sub>), 130.5 (C<sub>6a</sub>), 123.1 (C<sub>8</sub>), 122.0 (C<sub>3</sub>), 121.8 (C<sub>4a</sub>), 101.7 (C<sub>6</sub>).

#### • PREPARACIÓN DE 5-PERFLUOROCTANAMIDA-1,10-FENANTROLINA.

Este ligando perfluorado se sintetizó con anterioridad en el laboratorio del Prof. G. Orellana, por calentamiento a reflujo en atmósfera de argón y en presencia de trietilamina del correspondiente cloruro de ácido comercial con 5-amino-1,10-fenantrolina, disueltos en tolueno.<sup>147</sup>

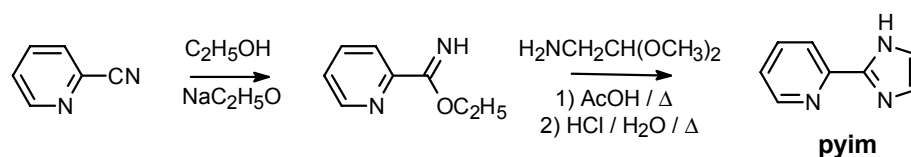


#### • PREPARACIÓN DE 2-(2'-PIRIDIL)IMIDAZOL.

El 2-(2'-piridil)imidazol, sintetizado también con anterioridad en el laboratorio,<sup>76</sup> se obtuvo a partir de 2-piridinacarboximidato de etilo por reacción con el dimetilacetal de 2-aminoacetaldehído (comercial). A su vez, el imidato de

<sup>147</sup> Castro, A. M., Tesis Doctoral, Universidad Complutense de Madrid, 2001.

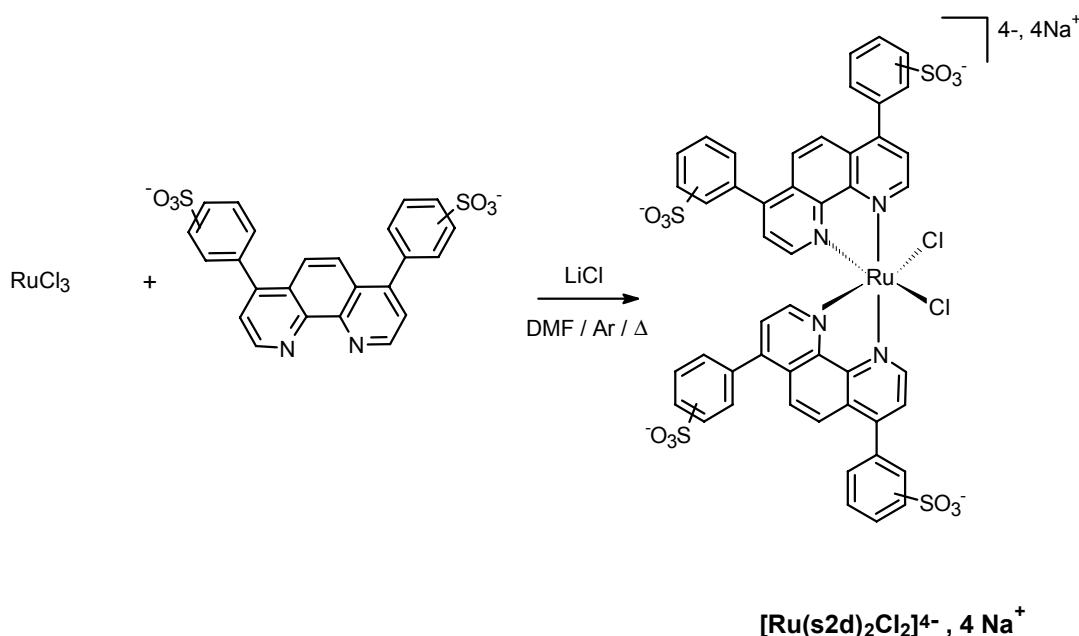
partida se preparó por tratamiento de 2-piridinacarbonitrilo con etóxido sódico en etanol.<sup>74</sup>



### 6.2.2. SÍNTESIS DE DICLORO-BISQUELATOCOMPLEJOS DE Ru(II).

Los complejos de Ru(II) con dos ligandos azaheterocíclicos bidentados se obtuvieron en forma de *cis*-diclorobisquelatocomplejos siguiendo el procedimiento descrito por Sullivan *et al.*<sup>148</sup>

- SÍNTESIS DE *CIS*-[DICLORO-BIS(1,10-FENANTROLINA-4,7-DI(FENILSULFONATO)]RUTENIO(II) TETRASÓDICO.



<sup>148</sup> Sullivan, B. P., Salmon, D. J. y Meyer, T. J., *Inorg. Chem.*, **1978**, *17*, 3334.

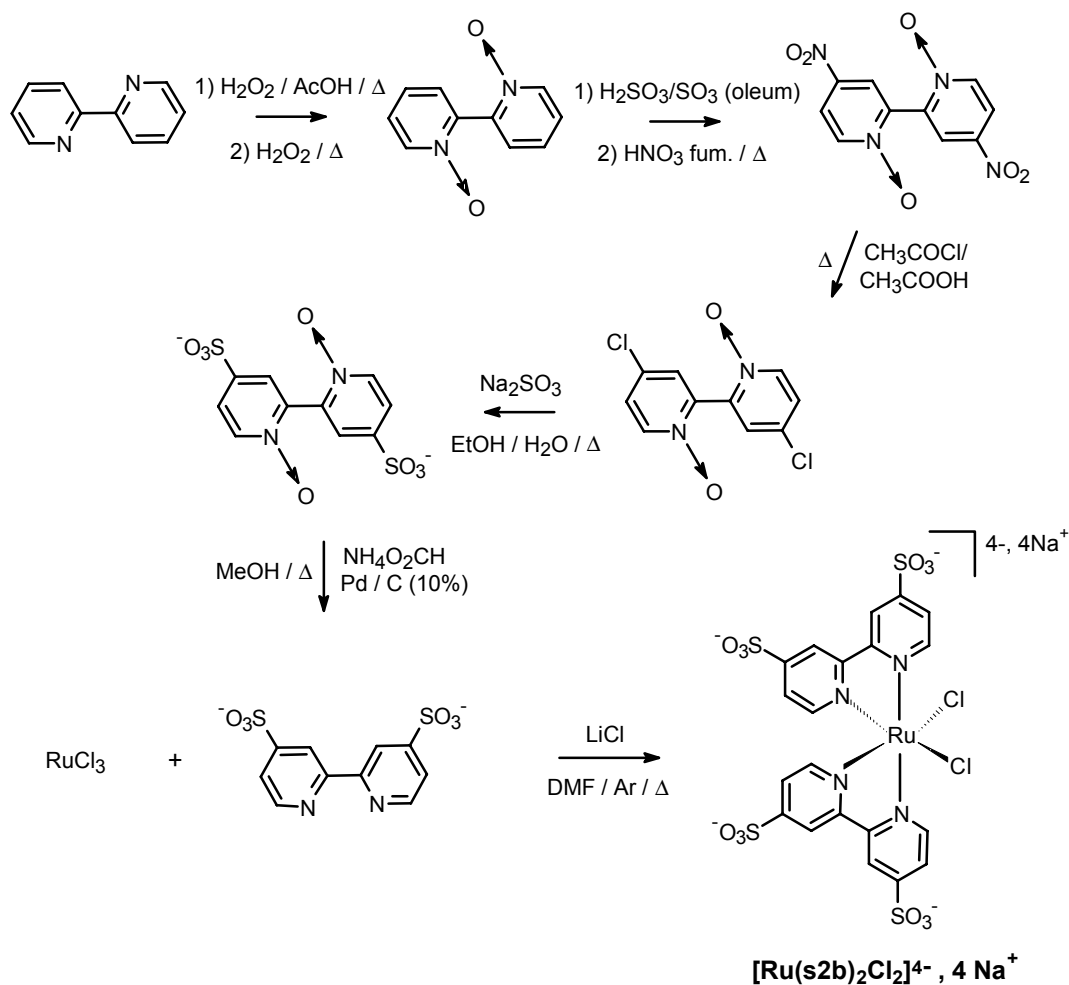
Se disolvieron 0.85 mmol de *batofenantrolina* disulfonada comercial, junto con 0.42 mmol de tricloruro de rutenio trihidratado y 2.54 mmol de cloruro de litio en 5 mL de *N,N*-dimetilformamida, previamente secada durante un mínimo de 72 h sobre tamices moleculares de 4 Å. El sistema, aislado bajo atmósfera de argón, se calentó a reflujo durante 6 h, siguiendo el transcurso de la reacción mediante el registro de espectros UV-VIS del crudo de reacción. Una vez alcanzada la temperatura ambiente, se vertió la misma en un vaso de precipitados, el cual se introdujo durante 7 días sobre un baño de acetona en el interior de un desecador herméticamente cerrado. Como resultado de esta lenta precipitación, se obtuvieron cristales de color violeta oscuro que se filtraron con succión, se lavaron con acetona fría y se secaron durante 48 h a vacío (0.1 mbar). La pureza del sólido se comprobó por CCF (*n*-propanol-ac. acético-agua, 7:3:4, v/v).

RENDIMIENTO: 57%

□ **Caracterización espectroscópica.**

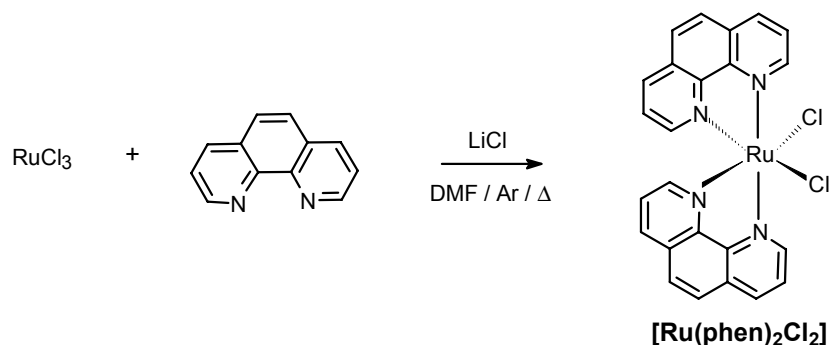
**UV-VIS**,  $\lambda/\text{nm}$  ( $\epsilon/\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ), (DMF): 564 (7700), 388 (9600), 303 (47100), 250 (24100).  
(H<sub>2</sub>O): 516 (2740), 366 (8750) y 301 (14600).

• **SÍNTESIS DE CIS-[(BIS(2,2'-BIPIRIDINA-4,4'-DISULFONATO)DICLORO)RUTENIO(II) TETRASÓDICO.**



Este bisquelatocomplejo se había preparado con anterioridad en nuestro grupo de trabajo,<sup>72</sup> siguiendo el mismo procedimiento de síntesis descrito para el  $[\text{Ru}(\text{s}2\text{d})_2\text{Cl}_2]^{4-}$ , pero manteniendo el calentamiento en DMF del ligando s2b a reflujo durante 24 h. A su vez, dicho ligando se obtuvo partiendo de la 2,2'-bipiridina comercial con un rendimiento global del 45%, a través de cinco pasos de reacción (ver esquema de síntesis, figura superior).<sup>72</sup>

• **SÍNTESIS DE CIS-[DICLORO-BIS(1,10-FENANTROLINA)] RUTENIO(II).**



Para sintetizar este bisquelatocomplejo se siguió igualmente el método descrito para la *batofenantrolina* disulfonada: en un matraz esférico se pesaron 5 mmol de 1,10-fenantrolina monohidrato junto con 2.8 mmol de RuCl<sub>3</sub> y 16.6 mmol de LiCl. Tras la adición de 30 mL de DMF anhidra, se mantuvo el sistema a reflujo y bajo atmósfera de argón durante 3 h, transcurridas las cuales se vertió el crudo de reacción en un vaso de precipitados, donde se dejó precipitar lentamente el producto en atmósfera de acetona. Diez días después se filtró el producto obtenido y se lavó con abundante acetona fría, secándolo posteriormente a vacío durante 24 h (0.1 mbar). La pureza del producto se comprobó por CCF (n-propanol-ac. acético-agua, 7:3:4, v/v).

RENDIMIENTO: 50%.

**UV-VIS**,  $\lambda/\text{nm}$  ( $\epsilon/\text{M}^{-1}\text{cm}^1$ ), (DMF): 547 (5400), 355 (4000), 269 (43000).

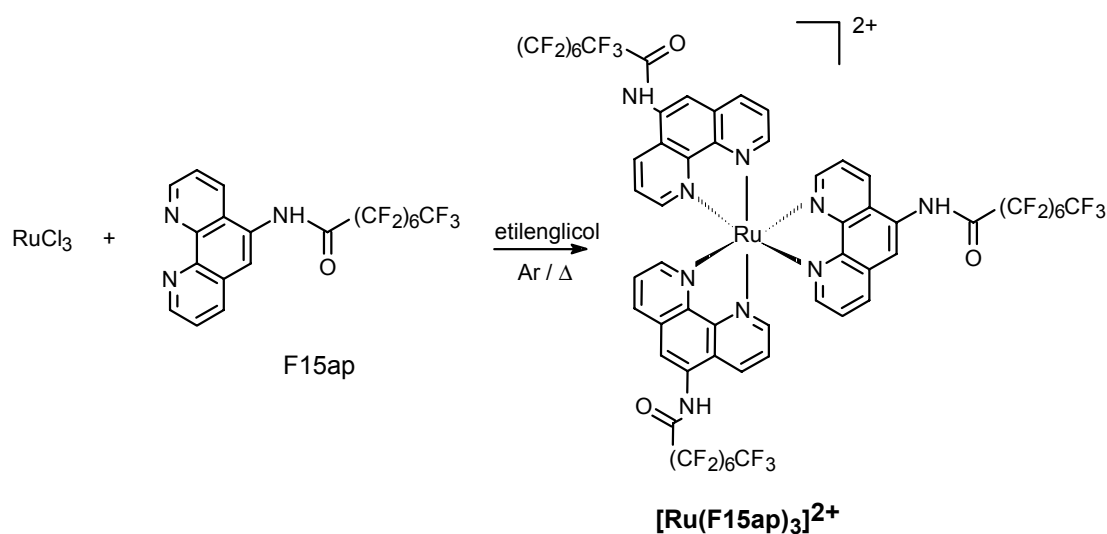
(H<sub>2</sub>O): 467 (8200), 264 (54800), 222 (278300).

### 6.2.3. SÍNTESIS DE QUELATOCOMPLEJOS DE Ru(II).

Para preparar estos indicadores luminiscentes se siguieron los procedimientos descritos por Orellana,<sup>74</sup> García-Fresnadillo<sup>70</sup> y Gutiérrez-Alonso,<sup>71</sup> en los cuales se hace reaccionar el ligando, en exceso, con el bisquelatocomplejo anteriormente preparado (complejos heterolépticos) o bien con tricloruro de rutenio (complejos homolépticos).

La purificación de estos compuestos se realizó sobre Sephadex® CM o LH en función de la carga global que presenta el complejo. Así, los catiónicos se adsorben sobre el dextrano carboximetilado, eluyendo después con disoluciones de fuerza iónica creciente, mientras que los aniónicos se retienen en el dextrano lipofílico neutro (LH). Únicamente en la preparación del indicador homoléptico  $[\text{Ru}(\text{F15ap})_3]^{2+}$ , no fue necesaria la utilización de cromatografía rápida en columna, al comprobarse la pureza del mismo por CCF.

#### A) PREPARACIÓN DE [TRIS(5-PERFLUOROCTANAMIDA-1,10-FENANTROLINA)] RUTENIO(II), $[\text{Ru}(\text{F15ap})_3]^{2+}$ .



En un matraz provisto de refrigerante de reflujo se calentaron, con agitación magnética y bajo atmósfera de argón, 0.44 mmol de 5-perfluorooctanamida-1,10-fenantrolina y 0.14 mmol de cloruro de rutenio trihidrato disueltos en 20 mL de etilenglicol. Transcurridas 3 h desde el inicio de la reacción, se dejó enfriar el crudo a temperatura ambiente, obteniendo un precipitado de color rojizo (A) que se filtró a vacío en placa de vidrio poroso y se

lavó con abundante agua. Por otro lado, sobre las aguas de filtrado se vertieron, gota a gota, 20 mL de una disolución saturada de hexafluorofosfato amónico, dando lugar a la aparición de un nuevo precipitado anaranjado (B) que se filtró también en placa de vidrio sinterizado. Ambos sólidos se secaron en una estufa de vacío durante 24 h (40 °C, 0.1 mbar).

RENDIMIENTO: 33% de  $[\text{Ru}(\text{F15ap})_3]\text{Cl}_2$  (sólido A)

31% de  $[\text{Ru}(\text{F15ap})_3](\text{PF}_6)_2$  (sólido B)

#### □ Caracterización espectroscópica.

**IR** (KBr),  $\nu/\text{cm}^{-1}$ : 3414 ( $\nu_{\text{N-H}}$ , ancha), 1718 ( $\nu_{\text{C=O}}$ , amida I, varias bandas juntas), 1238, 1205 y 1147 ( $\nu_{\text{C-F}}$ ).

En **B**: 843 ( $\nu_{\text{P-F}}$ , muy intensa).

**$^1\text{H-RMN}$  (A)** ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ),  $\delta/\text{ppm}$ : 8.54 (d,  $3\text{H}\gamma'$ ), 8.51 (d,  $3\text{H}\gamma$ ), 8.19 (s,  $3\text{H}\delta$ ), 8.07 (d,  $3\text{H}\alpha'$ ), 7.99 (d,  $3\text{H}\alpha$ ), 7.67 (dd,  $3\text{H}\beta'$ ), 7.61 (dd,  $3\text{H}\beta$ ).

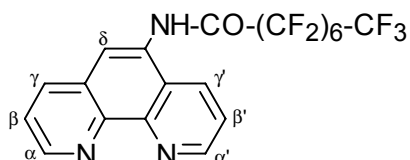
$J_{\alpha,\beta} = J_{\alpha',\beta'} = 4.9$  Hz,  $J_{\beta,\gamma} = J_{\beta',\gamma'} = 8.5$  Hz.

**$^1\text{H-RMN}$  (A)** ( $\text{CD}_3\text{CN}$ ),  $\delta/\text{ppm}$ : 8.76 (d,  $3\text{H}\gamma'$ ), 8.49 (s,  $3\text{H}\delta$ ), 8.47 (d,  $3\text{H}\gamma$ ), 8.06 (3d,  $3\text{H}\alpha'$ ), 7.94 (3d,  $3\text{H}\alpha$ ), 7.62 (dd,  $3\text{H}\beta'$ ), 7.55 (dd,  $3\text{H}\beta$ ).

$J_{\alpha,\beta} = J_{\alpha',\beta'} = 4.9$  Hz,  $J_{\beta,\gamma} = J_{\beta',\gamma'} = 7.8$  Hz.

**$^1\text{H-RMN}$  (B)** ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ),  $\delta/\text{ppm}$ : 8.70 (d,  $3\text{H}\gamma'$ ), 8.57 (d,  $3\text{H}\gamma$ ), 8.42 (s,  $3\text{H}\delta$ ), 8.21 (d,  $3\text{H}\alpha'$ ), 8.15 (d,  $3\text{H}\alpha$ ), 7.83-7.71 (m, 8 señales,  $6\text{H}\beta,\beta'$ ).

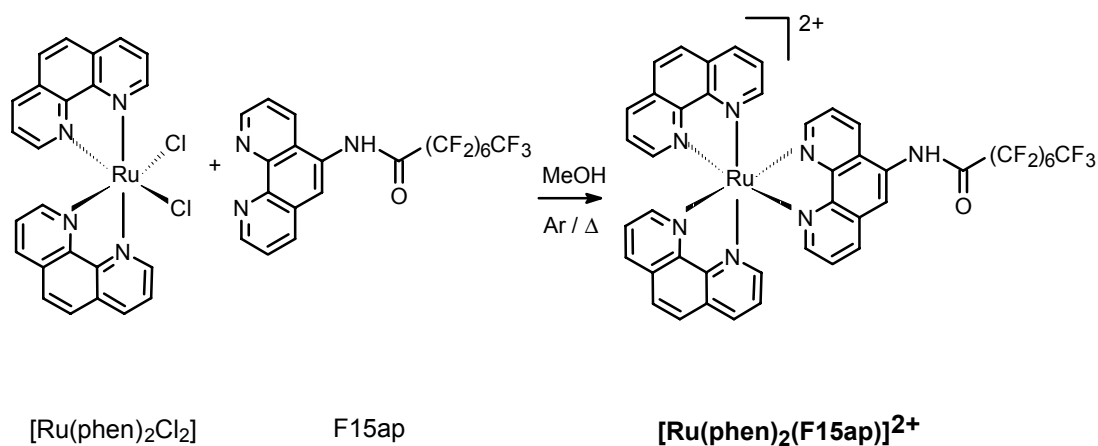
$J_{\alpha,\beta} = J_{\alpha',\beta'} = 5.3$  Hz,  $J_{\beta,\gamma} = J_{\beta',\gamma'} = 8.5$  Hz.



<b>Microanálisis (A):</b>	C	H	N
- % experimental	37.66	2.12	6.13
- % calculado para $[\text{Ru}(\text{F}_{15}\text{ap})_3]\text{Cl}_2 \cdot 3\text{HOCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ :	37.18	1.99	5.91

**EM-ESI** ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ),  $m/z$ : 938 ( $[\text{Ru}(\text{F}_{15}\text{ap})_3]^{2+}$ ), 1874 ( $[\text{Ru}(\text{F}_{15}\text{ap})_3]^{2+} - \text{H}^+$ )

## B) PREPARACIÓN DE [BIS(1,10-FENANTROLINA)(5-PERFLUOROCTANAMIDA-1,10-FENANTROLINA)]RUTENIO(II), $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{F}_{15}\text{ap})]^{2+}$ .



Se calentaron durante 3.5 h, a reflujo y bajo atmósfera de argón, 0.19 mmol de *cis*-[dicloro-bis(1,10-fenantrolina)]rutenio(II) junto con 0.25 mmol de F15ap disueltos en 25 mL de metanol. El seguimiento de la reacción se realizó por CCF (*n*-propano-ac. acético-agua, 7:3:4, v/v), deteniendo el reflujo al observar la desaparición del bisqueatocomplejo de partida. Una vez alcanzada la temperatura ambiente, se añadió sobre el crudo de reacción 1 mL de una disolución acuosa saturada de hexafluorofosfato amónico y se filtró el sólido precipitado, de color anaranjado, a vacío con placa porosa.

### □ Purificación del producto.

#### - Columna de intercambio iónico DEAE-Sephadex® ( $\text{PF}_6^-$ por $\text{Cl}^-$ ):

Se cargó el complejo, disuelto en una mínima cantidad de acetonitrilo, sobre una columna de DEAE-Sephadex (20 × 2 cm). El indicador se eluyó con agua a través de la columna, intercalando alícuotas de acetonitrilo para evitar la



precipitación del compuesto, obteniéndose así una disolución acuosa de  $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{F15ap})]\text{Cl}_2$ .

– **Cromatografía rápida en columna de CM-Sephadex®:**

Sobre esta resina aniónica (20 × 5 cm) se adsorbió el dicloruro del indicador disuelto en agua para, a continuación, eluir las impurezas con disoluciones de cloruro sódico de fuerza iónica creciente (0.1 M, 0.2 M y 0.5 M). El complejo puro, retenido en la columna, se separó del Sephadex por agitación en 100 mL de una mezcla metanol-cloruro sódico 2 M (1:1, v/v).

Una vez eliminado el Sephadex® por filtración, se liofilizó la disolución resultante y se lavó repetidamente el complejo (contaminado con abundante NaCl) con metanol frío, filtrando y eliminado a presión reducida el disolvente después de cada lavado. Finalmente, se disolvió el indicador en una mezcla agua-metanol (100:1, v/v) y se reprecipitó añadiendo unas gotas de *hexafluorofosfato amónico*. El sólido, filtrado en placa porosa, se secó durante 24 h en una estufa de vacío (40 °C, 0.1 mbar).

RENDIMIENTO: 57%  $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{F15ap})](\text{PF}_6)_2$

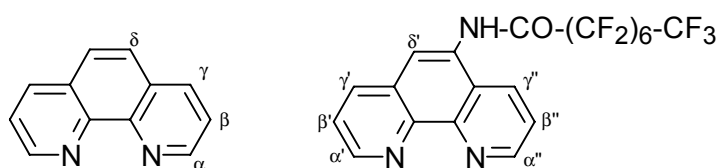
□ **Caracterización espectroscópica.**

**IR** (KBr),  $\nu/\text{cm}^{-1}$ : 3387 ( $\nu_{\text{N-H}}$ , ancha), 1728 ( $\nu_{\text{C=O}}$ , amida I, varias bandas juntas), 1630 ( $\nu_{\text{N-C=O}}$ , amida II), 1240, 1209 y 1150 ( $\nu_{\text{C-F}}$ ), 843 ( $\nu_{\text{P-F}}$ , muy intensa).

**$^1\text{H-RMN}$**  ( $\text{CD}_3\text{CN}$ ),  $\delta/\text{ppm}$ : 8.61 (dd,  $1\text{H}\gamma''$ ), 8.60 (dd,  $4\text{H}\gamma$ ), 8.51 (dd,  $1\text{H}\gamma'$ ), 8.42 (s,  $1\text{H}\delta'$ ), 8.26 ( $4\text{H}\delta$ ), 8.1 (dd,  $1\text{H}\alpha''$ ), 8.06 (dd,  $4\text{H}\alpha$ ), 8.01 (dd,  $1\text{H}\alpha'$ ), 7.68 (dd,  $1\text{H}\beta''$ ), 7.63 (dd,  $4\text{H}\beta$ ), 7.61 (dd,  $1\text{H}\beta'$ ).

$J_{\alpha\beta} = 5.3 \text{ Hz}$ ,  $J_{\alpha\gamma} = 8.3 \text{ Hz}$ ,  $J_{\beta\gamma} = 1.22 \text{ Hz}$ .

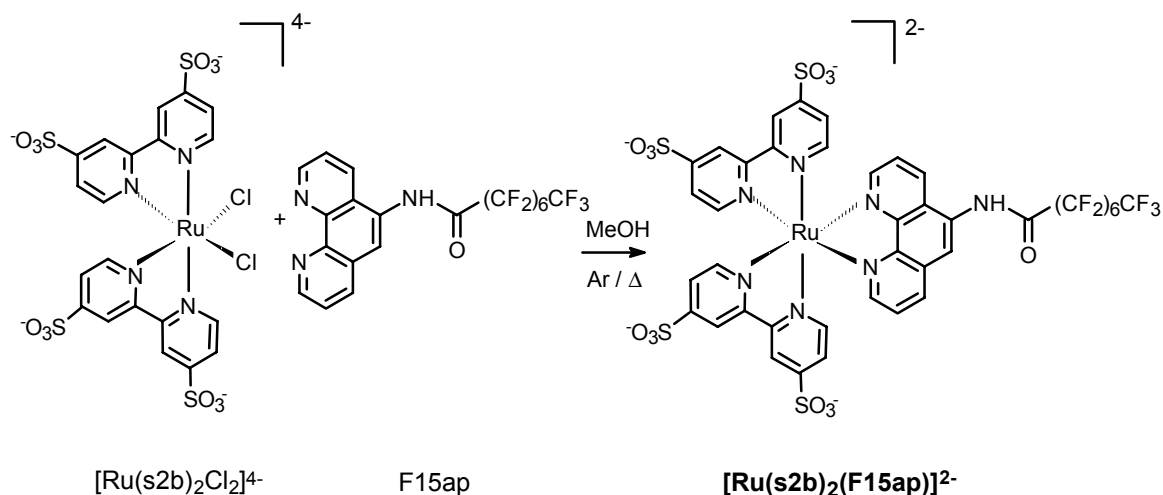
$J_{\alpha'\beta'} = J_{\alpha''\beta''} = 5.1 \text{ Hz}$ ,  $J_{\alpha'\gamma'} = J_{\alpha''\gamma''} = 8.3 \text{ Hz}$ ,  $J_{\beta'\gamma'} = J_{\beta''\gamma''} = 1.22 \text{ Hz}$ .

**Microanálisis:**

	C	H	N
- % experimental	37.75	2.26	6.48
- % calculado para $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{F}_{15\text{ap}})](\text{PF}_6)_2 \cdot 3\text{CH}_3\text{OH} \cdot 1\text{NaCl}$ :	37.70	2.42	6.55

**EM-ESI** ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ),  $m/z$ : 1052 ( $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{F}_{15\text{ap}})]^{2+} - \text{H}^+$ ), 1198 ( $([\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{F}_{15\text{ap}})]^{2+} - \text{H}^+) + 4 \text{MeOH} + 1 \text{H}_2\text{O}$ )

**C) PREPARACIÓN DE [BIS(4,4'-DISULFO-2,2'-BIPYRIDINA) (5-PERFLUOROCTANAMIDA-1,10-FENANTROLINA)]RUTENIO(II),  $[\text{Ru}(\text{s}2\text{b})_2(\text{F}15\text{ap})]^{2-}$ .**



Se disolvieron 0.11 mmol del bisquelatocomplejo de Ru(II) de partida junto con 0.25 mmol de F15ap en 25 mL de metanol. El sistema se aisló bajo atmósfera de argón, calentando entonces a reflujo durante 2 h, durante las cuales se siguió la evolución del proceso por CCF (*n*-propanol-ac. acético-agua, 7:3:4, v/v). Sobre el crudo de reacción, enfriado a temperatura ambiente, se vertió a continuación

100 mL de una mezcla acetona-éter (9:1), recogiendo el sólido precipitado por filtración con succión en placa de vidrio de poroso.

#### □ Purificación del producto.

El sólido obtenido se purificó por cromatografía rápida en columna, utilizando como fase estacionaria LH-Sephadex<sup>®149</sup> (50 × 2 cm) y como eluyente agua. El seguimiento de la columna se realizó por espectroscopía UV-VIS y CCF, liofilizando las fracciones en las que se confirmó la pureza del complejo.

RENDIMIENTO: 50% Na<sub>2</sub>[Ru(s2b)<sub>2</sub>(F15ap)]

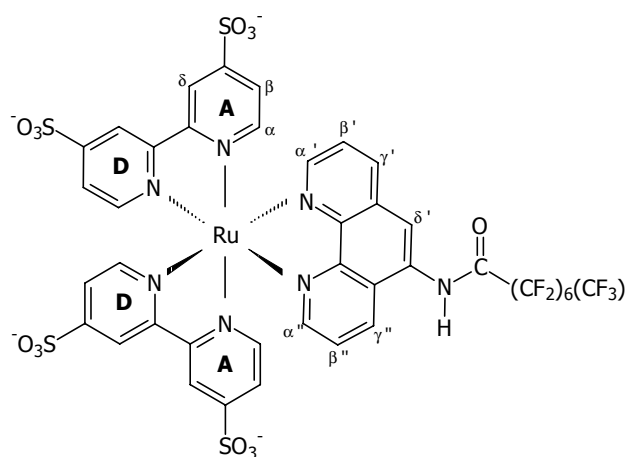
#### □ Caracterización espectroscópica.

**IR** (KBr),  $\nu/\text{cm}^{-1}$ : 3447 ( $\nu_{\text{N-H}}$ , ancha), 1718 ( $\nu_{\text{C=O}}$ , amida I), 1209 ( $\nu_{\text{C-F}}$ , ancha, muy intensa), 1149 ( $\nu_{\text{C-F}}$ ), 1220 ( $\nu_{\text{as SO}_3^-}$ ) y 1060 ( $\nu_{\text{si SO}_3^-}$ ).

**<sup>1</sup>H-RMN** (CD<sub>3</sub>OD),  $\delta/\text{ppm}$ : 8.99 (sa, 2H $\delta^{\text{D}}$ ), 8.94 (sa, 2H $\delta^{\text{A}}$ ), 8.73 (dd, 1H $\gamma^{\text{I}}$ ), 8.60 (dd, 1H $\gamma^{\text{I}}$ ), 8.26 (dd, 1H $\alpha^{\text{II}}$ ), 8.21 (dd, 1H $\alpha^{\text{I}}$ ), 8.11 (d, 2H $\alpha^{\text{D}}$ ), 8.01 (s, 1H $\delta^{\text{I}}$ ) 7.90 (dd, 1H $\beta^{\text{II}}$ ), 7.85 (dd, 1H $\beta^{\text{I}}$ ), 7.83 (dd, 2H $\beta^{\text{D}}$ ), 7.74 (d, 2H $\alpha^{\text{A}}$ ), 7.59 (dd, H $\beta^{\text{A}}$ ).

$J_{\alpha\beta} = 5.86$ ,  $J_{\beta\delta} = 1.47$ ,  $J_{\alpha^{\text{II}}\beta^{\text{II}}} = 5.1$ ,  $J_{\alpha^{\text{I}}\beta^{\text{I}}} = 5.3$ ,  $J_{\beta^{\text{II}}\gamma^{\text{I}}} = 8.3$ ,  
 $J_{\beta^{\text{I}}\gamma^{\text{I}}} = 8.5$ ,  $J_{\alpha^{\text{II}}\gamma^{\text{I}}} = 0.98$ ,  $J_{\alpha^{\text{I}}\gamma^{\text{I}}} = 1.22$

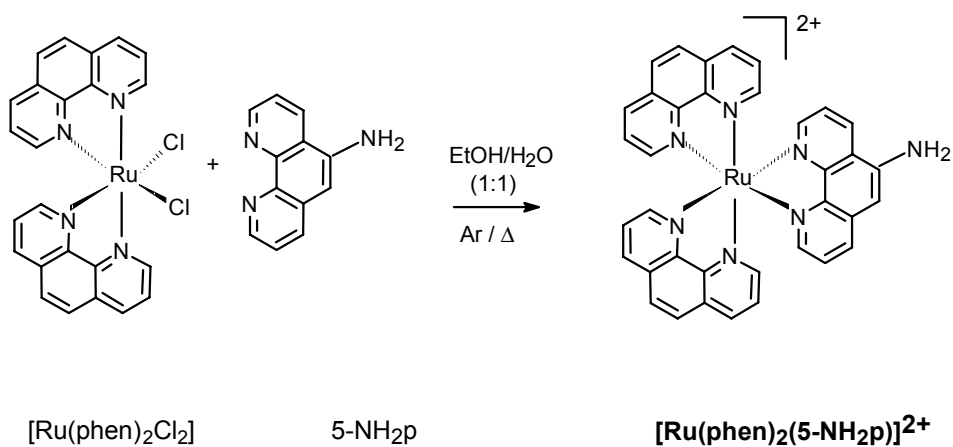
<sup>149</sup> Anderson, S., Constable, E. C., Seddon, K. R. y Turp, J. E., *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, **1985**, 2247.

**Microanálisis:**

	C	H	N	S
- % experimental	32.30	3.08	6.14	7.31
- % calculado para $[\text{Ru}(\text{s}2\text{b})_2(\text{F}_{15}\text{ap})]\text{Na}_2 \cdot 5\text{CH}_3\text{OH} \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ :	32.34	3.38	5.87	7.67
- % calculado para $[\text{Ru}(\text{s}2\text{b})_2(\text{F}_{15}\text{ap})]\text{Na}_4\text{Cl}_2 \cdot 7\text{CH}_3\text{OH} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ :	32.36	3.01	5.62	7.35

**EM-ESI** ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ),  $m/z$ : 1390 ( $[\text{Ru}(\text{s}2\text{b})_2(\text{F}_{15}\text{ap})]^{2-} + 3 \text{Na}^+$ ).

**D) PREPARACIÓN DE [BIS(1,10-FENANTROLINA)(5-AMINO-1,10-FENANTROLINA)]RUTENIO(II),  $[\text{Ru}(\text{phen})_2(5\text{-NH}_2\text{p})]^{2+}$ .**



Se pesaron en un matraz esférico 0.045 mmol del biscomplejo de partida, junto con 0.072 mmol de la 5-amino-1,10-fenantrolina previamente sintetizada. A continuación, se añadieron 10 mL de una mezcla etanol/agua (1:1) y se conectó el matraz a un refrigerante de reflujo. El sistema, aislado bajo argón, se calentó a reflujo durante 70 h, adoptando la disolución (inicialmente de color violeta oscuro) un color rojo intenso. Seguidamente, se filtró el crudo de reacción a temperatura ambiente y se añadieron, sobre las aguas de filtrado, unas gotas de disolución saturada de hexafluorofosfato amónico, recogiendo el precipitado obtenido por filtración con succión en placa porosa.

#### □ Purificación del producto.

- **Columna de intercambio iónico DEAE-Sephadex® (PF<sub>6</sub><sup>-</sup> por Cl<sup>-</sup>):**

(ver purificación del complejo [Ru(phen)<sub>2</sub>(F15ap)]<sup>2+</sup>)

- **Cromatografía rápida en columna CM-Sephadex®:**

El dicloruro del indicador, adsorbido previamente en CM-Sephadex®, se depositó sobre una columna cargada con esta resina aniónica y se eluyó con disoluciones de cloruro sódico de fuerza iónica creciente (0.01 - 2 M), observando la elución del producto mayoritario con NaCl 0.2 M. Tras comprobar por espectroscopía UV-VIS la pureza de las fracciones eluidas, se aisló el complejo deseado por liofilización de las disoluciones correspondientes y posterior lavado con metanol frío del sólido obtenido (ver purificación [Ru(phen)<sub>2</sub>(F15ap)]<sup>2+</sup>).

RENDIMIENTO: 45% [Ru(phen)<sub>2</sub>(F15ap)](PF<sub>6</sub>)<sub>2</sub>.

Siguiendo un procedimiento similar el contraión PF<sub>6</sub><sup>-</sup> se intercambiaba finalmente por Cl<sup>-</sup> para aumentar la solubilidad de la sonda en agua.

#### □ Caracterización espectroscópica.

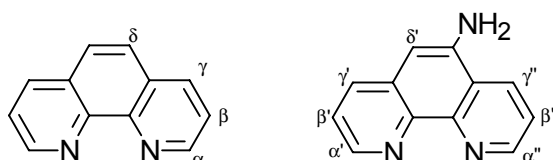
**IR** (KBr),  $\nu/\text{cm}^{-1}$ : 3400 ( $\nu_{\text{N-H}}$ ), 1650-1400 ( $\nu_{\text{Car-H}}$ )

**<sup>1</sup>H-RMN** (CD<sub>3</sub>CN),  $\delta/\text{ppm}$ : 9.02 (dd, 1H $\gamma'$ ), 8.61 (dd, 4H $\gamma$ ), 8.26 (s, 4H $\delta$ ), 8.18 (dd, 1H $\gamma$ ), 8.07 (dd, 1H $\alpha''$ ), 8.03 (dd, 4H $\alpha$ ), 7.98 (dd, 1H $\alpha'$ ),

7.63 (dd, 4H $\beta$ ), 7.56 (dd, 1H $\beta'$ ), 7.36 (dd, 1H $\beta''$ ), 7.19 (s, 1H $\delta'$ ), 6.15 (s, NH $_2$ ).

$J_{\alpha\beta} = 5.3$  Hz,  $J_{\beta\gamma} = 8.3$  Hz,  $J_{\alpha\gamma} = 1.22$  Hz,

$J_{\alpha''\beta''} = J_{\alpha'\beta'} = 5.1$  Hz,  $J_{\beta''\gamma''} = J_{\beta'\gamma'} = 8.3$  Hz,  $J_{\alpha''\gamma''} = J_{\alpha'\gamma'} = 1.22$  Hz

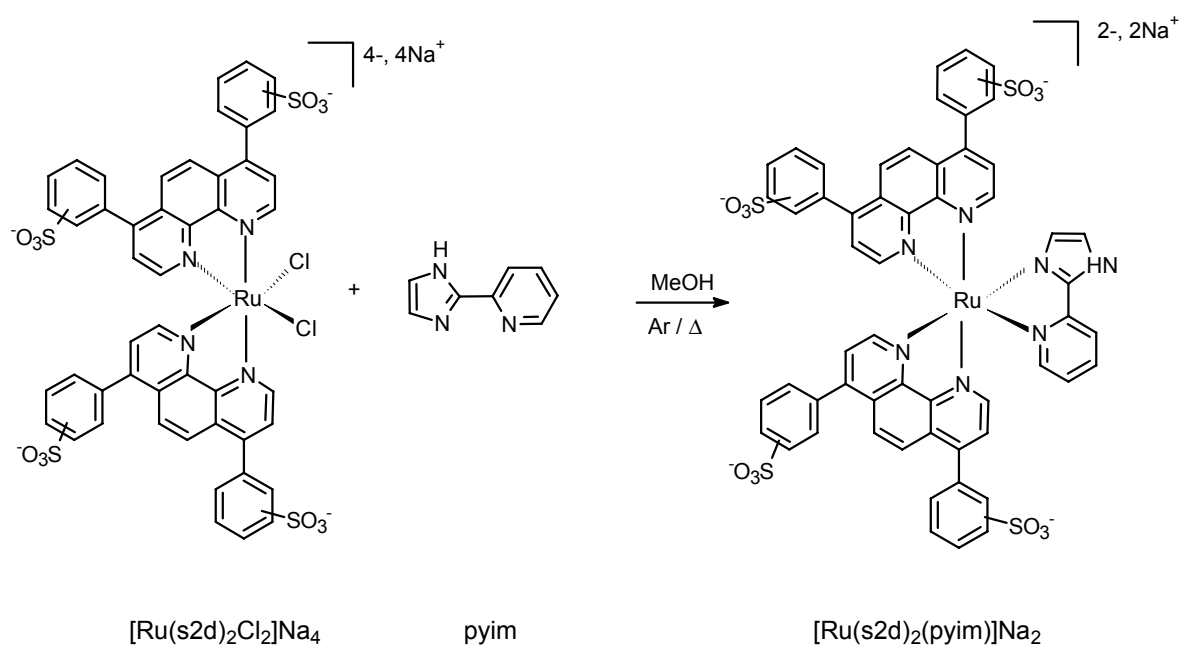


### Microanálisis:

	C	H	N
- % experimental	50.01	4.51	10.27
- % calculado [Ru(phen) $_2$ (5NH $_2$ p)]Cl $_2$ · 4CH $_3$ OH · 1NaCl · 2H $_2$ O:	50.56	4.77	10.32

**EM-ESI** (CH $_3$ OH), m/z: 656 ([Ru(phen) $_2$ (5-NH $_2$ p)] $^{2+}$  - H $^+$ )

### E) PREPARACIÓN DE [BIS(4,7-DI(SULFOFENIL-1,10-FENANTROLINA)(2-(2'-PIRIDIL)IMIDAZOL)]RUTENIO(II), [Ru(s2d) $_2$ (pyim)] $^{2-}$ .



Se calentó a reflujo y bajo atmósfera de argón, una mezcla de 0.08 mmol de [dicloro-bis(1,10-fenantrolina-4,7-di(fenilsulfonato)]rutenio(II) tetrasódico y 0.16 mmol de (2-(2'-piridil)imidazol) en 10 mL de metanol. Transcurridas 24 h en las que la evolución de la reacción se siguió por CCF (*n*-propanol-ac. acético-agua, 7:3:4, v/v) hasta la total desaparición del bisquelatocomplejo inicial, se dejó enfriar el matraz de reacción a temperatura ambiente y sobre su contenido, previamente vertido en un vaso de precipitados, se añadió 100 mL de una mezcla acetona-éter (9:1, v/v). El sólido anaranjado resultante se filtró en placa porosa y se lavó repetidamente con acetona y éter dietílico, hasta observar incoloras las aguas de filtrado.

#### □ Purificación del producto.

El complejo obtenido se purificó por cromatografía rápida en columna de Sephadex® LH-20 (50 × 2 cm), utilizando como eluyente una disolución de NaOH 1 mM. El seguimiento de la columna se realizó por determinación del tiempo de vida de emisión de las disoluciones eluidas, en sus distintas fracciones a la salida de la columna, comprobándose que en medio básico el producto deseado (que adquiere un color rosado) se retiene en mayor medida sobre el Sephadex®, por lo que las impurezas aparecen en las primeras fracciones recogidas. Una vez eliminadas éstas, se sustituyó la disolución de hidróxido sódico por agua, eluyéndose entonces el complejo del Sephadex®. Finalmente, se liofilizaron conjuntamente las fracciones acuosas en las que previamente se había comprobado la pureza del indicador.

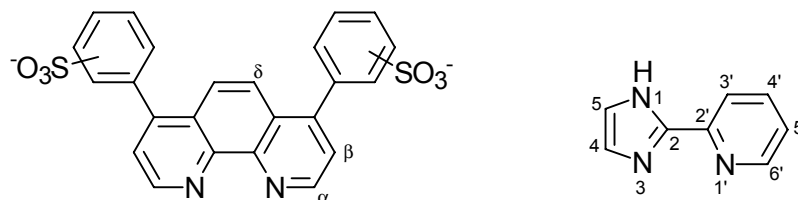
RENDIMIENTO: 22%  $\text{Na}_2[\text{Ru}(\text{s}2\text{d})_2(\text{pyim})]$ .

#### □ Caracterización espectroscópica.

**IR** (KBr),  $\nu/\text{cm}^{-1}$ : 3500-3200 ( $\nu_{\text{N-H}}$ , ancha), 1610-1420 ( $\nu_{\text{C=C}}$ ,  $\nu_{\text{C=N}}$  aromático, varias bandas), 1190 ( $\nu_{\text{as}} \text{SO}_3^-$ ) y 1050 ( $\nu_{\text{si}} \text{SO}_3^-$ ).

**$^1\text{H-RMN}$**  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ),  $\delta/\text{ppm}$ : 8.50, 8.32, 8.25, 8.20 (d,  $\text{H}\alpha$ ), 8.25 (d,  $\text{H}3'$ ), 8.16 (sa,  $4\text{H}\delta$ ), 8.10-7.85 (m,  $\text{H}\omega$ - respecto a  $\text{SO}_3^-$ ), 7.94 (t,  $\text{H}4'$ ), 7.85-7.72 (varios d,  $\text{H}\beta$ ), 7.69 (d,  $\text{H}6'$ ), 7.65-7.50 (m,

Hm-, Hp- respecto a SO<sub>3</sub><sup>-</sup>), 7.12 (sa, H5), 6.95 (t, H5'), 6.32 (sa, H4).  $J_{\alpha,\beta} = 5.37$  Hz.

**Microanálisis:**

	C	H	N
- % experimental	34.36	3.60	4.45
- % calculado para [Ru(s2d) <sub>2</sub> (pyim)]Na <sub>2</sub> ·12H <sub>2</sub> O·12NaOH:	34.15	3.63	4.98
- % calculado para [Ru(s2d) <sub>2</sub> (pyim)]Na <sub>4</sub> Cl <sub>2</sub> ·13H <sub>2</sub> O·8NaOH:	34.59	3.57	5.04

**EM-ESI** (CH<sub>3</sub>OH), m/z: 1248 ([Ru(s2d)<sub>2</sub>(pyim)]<sup>2-</sup> + Na<sup>+</sup>).

1294 ([Ru(s2d)<sub>2</sub>(pyim)]<sup>2-</sup> + 3 Na<sup>+</sup>).

### 6.3. CARACTERIZACIÓN EN DISOLUCIÓN DE LOS INDICADORES SINTETIZADOS.

Una vez preparados los indicadores ópticos y tras la correspondiente purificación y confirmación estructural, se procedió a la determinación de los parámetros fotofísicos característicos de cada sonda en disolución.

- Los **espectros de absorción UV-VIS** se registraron en un espectrofotómetro Cary-3 Bio de *Varian*, con una velocidad de barrido de 120 nm·min<sup>-1</sup> y tomando lecturas cada 1 nm.
- Los **coeficientes de absorción molar ( $\epsilon / 1 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ )** característicos de cada indicador en un disolvente dado, se determinaron experimentalmente a partir de la absorbancia correspondiente a los máximos de absorción UV-VIS de cuatro disoluciones de concentración perfectamente conocida (5-20  $\mu\text{M}$ , ecuación 1), preparadas en una balanza analítica Mettler AT261 ( $\pm 0.01$  mg).



- Los **máximos de emisión** ( $\lambda_{\text{máx}}^{\text{em}}$ ) se obtuvieron a partir de los correspondientes espectros recogidos en un espectrofluorímetro LS50-B de *Perkin-Elmer*, termostalizando el portacubetas a 25.0 °C y utilizando una velocidad de barrido de 120 nm min<sup>-1</sup>. Para ello, las sondas se excitaron en el máximo de absorción que exhiben en el visible, utilizando un filtro coloreado de 530 nm para suprimir la emisión de la luz procedente de la lámpara. Las rendijas empleadas para el registro de los espectros se adaptaron en cada caso a la concentración de indicador, con objeto de evitar la saturación del detector.
- Los **rendimientos cuánticos de emisión** ( $\Phi_{\text{em}}$ ) se determinaron a partir de disoluciones termostalizadas (25.0 °C) de absorbancia conocida (< 0.1 en la longitud de onda de excitación) y desoxigenadas con Ar durante un mínimo de 30 minutos. Se registraron cinco espectros de emisión de cada disolución en el espectrofluorímetro LS50-B, determinando el área bajo la curva de todos ellos y utilizando como referencia Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup> ( $\Phi_{\text{em}} = 0.042 \pm 0.002$ )<sup>29</sup> (método de Parker y Rees)<sup>150</sup>. El cálculo de  $\Phi_{\text{em}}$  se realizó aplicando la ecuación 30, que tiene en cuenta la corrección debida a la distinta absorbancia de las disoluciones y sus índices de refracción, cuando los disolventes del patrón y la muestra son distintos.<sup>151</sup>

$$(\Phi_{\text{em}})_m = (\Phi_{\text{em}})_p \times \frac{A_p}{A_m} \times \frac{S_m}{S_p} \times \left( \frac{n_m}{n_p} \right)^2 \quad (30)$$

siendo  $(\Phi_{\text{em}})_m$  y  $(\Phi_{\text{em}})_p$  los rendimientos cuánticos de la muestra y el patrón, respectivamente,  $A_m$  y  $A_p$  las absorbancias de las disoluciones a la longitud de onda de excitación,  $S_m$  y  $S_p$  el área bajo la curva de los espectros de emisión (promedio de cinco medidas) y  $n_m$  y  $n_p$  los índices de refracción de cada disolvente.

- Los **tiempos de vida de emisión** se obtuvieron mediante la técnica de conteo de fotones individuales correlacionados temporalmente (TC-SPC) recogiendo para ello las cinéticas de desactivación de la luminiscencia de los complejos metálicos en disoluciones desoxigenadas con Ar y termostalizando el portacubetas del espectrómetro FL-900 (*Edinburgh Instruments*) a 25.0 °C. Se seleccionó 358 nm

<sup>150</sup> Mielenz, K. D., *Measurements of Photoluminescence*, en *Optical Radiation Measurements*, vol. 3, Grum, F. y Bartleson, C. J. (eds.), Academic Press, Nueva York (EE.UU.), **1982**.

<sup>151</sup> Eaton, D. F., *Pure & Appl. Chem.*, **1988**, 60, 1107.

como longitud de onda de excitación, pulsando la lámpara de descarga a 40 KHz y utilizando un filtro de corte de 570 o 590 nm en el camino de emisión.

• Las **voltamperometrías cíclicas** se registraron en un equipo *BAS100* (*Bioanalytical Systems*), controlado por el software *bas100w 2.0*. Para ello, se prepararon disoluciones 0.1 M del electrolito soporte (hexafluorofosfato de tetrabutilamonio) en acetonitrilo, previamente secado durante dos semanas sobre tamices moleculares de 3 Å y en ellas se disolvieron los indicadores evaluados en concentración 0.5 mM, secados con anterioridad en una estufa de vacío durante 48 h (40 °C, 0.1 mbar). Antes de registrar los voltamperogramas, se desoxigenaron las disoluciones con argón durante, al menos, 15 minutos y la corriente de gas inerte se mantuvo sobre la disolución a lo largo de toda la medida.

Para obtener los **potenciales de semionda** ( $E_{1/2}$ ) de los complejos de Ru(II) se empleó un sistema de tres electrodos: un electrodo de trabajo de carbono vitrificado, un electrodo de referencia (Ag/AgNO<sub>3</sub> 0.01 M en acetonitrilo que contiene 0.1 M *n*-Bu<sub>4</sub>NPF<sub>6</sub>) y un contraelectrodo de hilo de platino. El electrodo de referencia y las disoluciones de medida se interconectaron con un disco de vidrio *vykor*<sup>®</sup> poroso. La velocidad de barrido seleccionada para los distintos experimentos fue 200 mV s<sup>-1</sup>. Todos los potenciales de semionda se calcularon en relación al pico de oxidación del complejo de Ru(II) de referencia ([Ru(bpy)<sub>3</sub>](PF<sub>6</sub>)<sub>2</sub>,  $E(3+/2+) = 1.260$  V vs ENH)<sup>152</sup> a partir de las curvas suavizadas y aplicando la ecuación 32, en la que  $E_p^{Red}$  es el potencial del pico catódico (en el sentido de la reducción),  $E_p^{ox}$  el potencial del pico anódico (en el sentido de la oxidación):<sup>153</sup>

$$E_{1/2} = \frac{E_p^{Red} + E_p^{Ox}}{2} \quad (31)$$

<sup>152</sup> Belser, P. y von Zelewsky, A., *Helv. Chim. Acta*, **1980**, 63, 1675.

<sup>153</sup> Brown y Sandifer, J. R., *Cyclic Voltametry*, en *Physical Methods of Chemistry*, vol. 2, *Electrochemical Methods*, Rositer, W., Hamilton, J. F. (eds.), John Wiley & Sons, Nueva York (EE.UU.), **1986**; p. 292.

#### 6.4. SELECCIÓN DEL INDICADOR. DETERMINACIÓN DEL $pK_a$ , $pK_{ap}$ y $pK_a^*$ EN DISOLUCIÓN.

Con objeto de establecer el intervalo de pH en el que varían las propiedades ópticas de cada luminóforo, se prepararon disoluciones de los mismos en tampón fosfato 10 mM a distintos valores de pH, en las que la concentración de indicador se mantuvo constante (10-15  $\mu$ M). El complejo metálico  $[\text{Ru}(\text{F15ap})_3]^{2+}$  se evaluó en disoluciones metanol-agua (17% v/v) dada la baja solubilidad de esta sonda en medio acuoso. En este medio hidroalcohólico la lectura del pHmetro calibrado con tampones acuosos difiere de la real en 0.01 unidades de pH.<sup>154</sup>

Un registro preliminar de los **espectros de absorción** de los complejos en medio ácido y alcalino extremos (pH 2.2 y 11.8) permitió obtener la longitud de onda analítica (máxima diferencia de absorción entre la especie molecular y la aniónica). Una vez obtenida esta  $\lambda$ , la constante de acidez del estado fundamental,  $K_a$ , puede determinarse por valoración espectrofotométrica a partir de la ecuación 32 (ecuación de Henderson-Hasselbalch,  $A_{A^-} > A_{AH}$ ):<sup>155</sup>

$$pK_a = \text{pH} + \log \left[ \frac{(A_{A^-} - A^{\text{pH}})}{(A^{\text{pH}} - A_{HA})} \right] \quad (32)$$

donde  $A^{\text{pH}}$  es la absorbancia de la disolución a un pH dado y medida en la longitud de onda analítica previamente seleccionada y  $A_{HA}$  y  $A^-$  son las absorbancias de la especie molecular y la desprotonada a esa longitud de onda, respectivamente.

Los espectros de absorción registrados de estas disoluciones (CARY 3 Bio, 120 nm  $\text{min}^{-1}$ ) se cruzan en el denominado *punto isobéptico*, longitud de onda en la que tanto la especie ácida como la básica poseen el mismo coeficiente de absorción molar ( $\epsilon$ ), proporcionando así la  $\lambda$  de excitación de cada complejo para poder interpretar posteriormente los **espectros de emisión** en un espectrofluorímetro LS5 o LS50-B (Perkin-Elmer), donde las disoluciones se

<sup>154</sup> Perrin, D. D. y Dempsey, B., *Buffers for pH and metal ion control*, Chapman and Hall, Londres (Reino Unido), 1974; pp. 77-93.

<sup>155</sup> Albert, A. y Sergeant, E. P., *The Determination of Ionization Constants* (3ª ed), Chapman y Hall (Eds.), Nueva York (EE.UU.), 1984; cap. 4.

termostataron a 25.0 °C. Al igual que la constante de acidez del estado fundamental, se puede determinar la constante de acidez aparente,  $K_{ap}^*$ , a partir de los valores de la intensidad de emisión correspondiente a la longitud de onda donde la diferencia de emisión de la especie HA y A<sup>-</sup> sea máxima ( $I_{HA} > I_{A^-}$ ):

$$pK_{ap}^* = pH + \log \left[ \frac{(I^{pH} - I_{A^-})}{(I_{HA} - I^{pH})} \right] \quad (33)$$

siendo en este caso  $I_{HA}$ ,  $I_{A^-}$  e  $I^{pH}$  las intensidades de luminiscencia, recogidas a la longitud de onda analítica, correspondientes a la forma ácida, básica y para cada una de las disoluciones preparadas a un valor de pH concreto, respectivamente.

La variación de los **tiempos de vida de emisión** que experimentan los indicadores con los cambios del pH del medio se determinaron, asimismo, registrando la cinética de desactivación de la luminiscencia de las disoluciones anteriormente preparadas mediante la técnica TC-SPC. La temperatura del portacubetas se mantuvo a 25.0 °C, utilizando para ello un baño termostático. A partir de los valores de  $\tau$  obtenidos se puede determinar en este caso la constante de acidez que muestra la sonda en el estado excitado,  $K_a^*$ , a partir de la ecuación 34 y el  $pK_{ap}^*$  obtenido previamente: <sup>140</sup>

$$pK_a^* = pK_{ap}^* + \log \left[ \frac{\tau_{HA}}{\tau_{A^-}} \right] \quad (34)$$

siendo  $\tau_{HA}$  y  $\tau_{A^-}$  el tiempo de vida de desexcitación del luminóforo en su forma ácida y desprotonado, respectivamente.

## 6.5. MÉTODOS DE INMOVILIZACIÓN.

A continuación, se describen los protocolos de inmovilización en soportes poliméricos orgánicos o inorgánicos de los complejos de Ru(II) seleccionados, que constituyen la fase sensible del optodo de pH.

### 6.5.1. INMOVILIZACIÓN COVALENTE: AMINO-PG.

La unión covalente de complejos de rutenio provistos de grupos sulfonato a microesferas de vidrio aminado, vía sulfonamida, se realizó siguiendo el procedimiento descrito anteriormente.<sup>72,123,156</sup>

En un matraz de reacción se pesaron 8  $\mu\text{mol}$  del complejo de rutenio sulfonado, junto con 53  $\mu\text{mol}$  de  $\text{PBr}_5$ . Se aisló el sistema bajo argón y se añadieron, gota a gota, 15 mL de DMF anhidra, calentando la disolución a reflujo durante 1 h. Paralelamente, se disolvieron 0.14 mmol de triflato de plata en 3 mL de DMF anhidra, los cuales se añadieron lentamente sobre el crudo de reacción, sumergiendo previamente el matraz en un baño de hielo y agitando la mezcla durante 2 h. A continuación, se filtró el crudo de reacción (para eliminar las sales formadas; filtro de PTFE) y el filtrado se transvasó a otro matraz, también aislado bajo argón, que contenía 100 mg de vidrio aminado, 3 mL de DMF anhidra y 10  $\mu\text{L}$  de piridina, donde se mantuvo con agitación magnética a 0 °C durante 1 h y a temperatura ambiente durante 72 h. El vidrio teñido con indicador se filtró finalmente con succión en placa de poro 4 y se lavó abundantemente con DMF, agua, metanol y acetona.

### 6.5.2. ADSORCIÓN: PTFE HIDROFÍLICO.

Se disolvió la cantidad adecuada de indicador luminiscente en 1.5 mL de acetonitrilo y se llenó con esta disolución un vial de 2.5 mL de vidrio en cuyo fondo se colocó previamente un disco ( $\varnothing = 8$  mm) de poli(tetrafluoroetileno) hidrofílico. Se dejó evaporar el disolvente a temperatura ambiente para, finalmente, lavar la membrana teñida con abundante tampón fosfato 10 mM (pH 7.0), donde se conservaron hasta el momento de su utilización.

---

<sup>156</sup> Xavier, M. P., García-Fresnadillo, D., Moreno-Bondi, M. C. y Orellana, G., *Anal. Chem.*, **1998**, 70, 5184.

### 6.5.3. INMOVILIZACIÓN ELECTROSTÁTICA.

#### a) MEMBRANAS DE NAFIÓ<sup>®</sup>.

Se disolvió el indicador  $[\text{Ru}(\text{F15ap})_3]^{2+}$  (0.4  $\mu\text{mol}$ ) en 1 mL de una suspensión comercial de micropartículas de Nafion<sup>®</sup> al 5% en alcoholes alifáticos (0.91 mmol  $\text{SO}_3^-/\text{g}$ ) para, posteriormente, depositar 100  $\mu\text{L}$  de esta mezcla sobre el centro de un disco de vidrio de 2 cm de diámetro, previamente tratado con una imprimación de silicona para aumentar la adherencia del Nafion<sup>®</sup> al vidrio, donde se deja evaporar el disolvente.

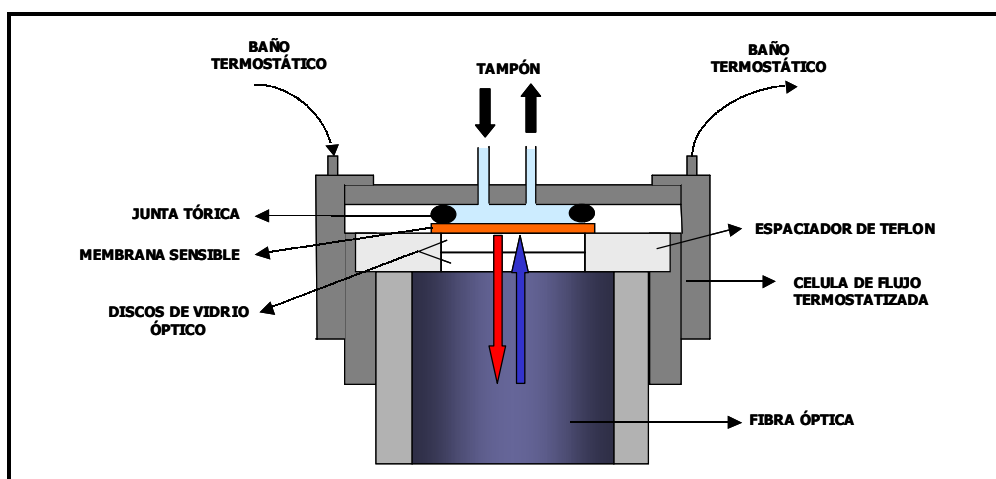
#### b) MEMBRANAS CATIONICAS COMERCIALES.

Se ensayaron también distintos soportes catiónicos comerciales, para inmovilizar los complejos de Ru(II) sulfonados. Estos soportes, en forma de hojas de pequeño espesor, se comercializan habitualmente para secuenciación de proteínas, inmovilización de anticuerpos y transferencia de ácidos nucleicos, con los nombres de Immobilon-CD, Immobilon-Ny<sup>+</sup>, Biodyne-B y Biodyne-Plus. El método de inmovilización empleado con estas membranas está basado en el propuesto por *Millipore*. Se prepararon disoluciones acuosas con distinta concentración de indicador y en ellas se sumergieron, durante 24 h, discos de 2 cm de diámetro de las matrices poliméricas elegidas, dando como resultado la incorporación cuantitativa del indicador. Seguidamente, las membrana teñidas se secaron en una estufa de vacío (80 °C, 0.1 mbar) durante 1 h y, finalmente, se lavaron con abundante tampón fosfato 10 mM (pH 7) donde se conservaron hasta el momento de su evaluación.

## 6.6. RESPUESTA DE LOS SENSORES AL pH.

### 6.6.1. DISPOSITIVO DE MEDIDA.

Las membranas preparadas con los complejos de Ru(II) sensibles al pH inmovilizados se colocaron sobre el extremo común de una fibra óptica bifurcada, en una célula de flujo de acero inoxidable termostatzada a 25.0 °C.<sup>16</sup> Impulsadas por una bomba peristáltica, se hicieron llegar a través de tubos de silicona hasta los soportes teñidos de indicador, disoluciones reguladoras de fosfato 10 mM ajustadas a distintos valores de pH. La célula de flujo se fabricó en los Talleres Mecánicos de Asistencia a la Investigación de la U.C.M..



**Figura 74.** Corte transversal de la célula de flujo utilizada en la evaluación del optodo de pH. La luz de excitación se conduce a través de la fibra óptica hasta la fase sensible. Una junta tórica, colocada encima de ésta, crea la cavidad estanca necesaria para que las disoluciones bombeadas entren en contacto con la sonda.

### 6.6.2. MEDIDAS POR INTENSIDAD DE EMISIÓN.

Antes de evaluar por *detección sensible a la fase* en el módulo optoelectrónico de T.G.I. los terminales sensibles desarrollados, se llevaron a cabo medidas preliminares de intensidad de luminiscencia. Para ello se conectaron las ramas de la fibra óptica bifurcada a un espectrofluorímetro **LS 5** de Perkin-Elmer, monitorizando en continuo (0.9 mL min<sup>-1</sup>), los cambios que experimenta la luminiscencia de los indicadores cuando las membranas que los soportan se

ponen en contacto con las disoluciones de tampón fosfato 10 mM de distintos valores de pH preparadas. El sistema se mantuvo termostatizado a 25.0 °C durante todo el estudio, eligiendo como longitud de onda de excitación el máximo de absorción que presentan estos compuestos en el visible y recogiendo el espectro de emisión con la máxima apertura de rendijas que permite el equipo (15/20, en los canales de excitación y emisión, respectivamente), excepto para el indicador  $[\text{Ru}(\text{s}2\text{d})_2(\text{pyim})]^{2-}$  inmovilizado en Immobilon-Ny<sup>+</sup>, con el que las rendijas empleadas fueron 10/10.

### 6.6.3. MEDIDAS CON RESOLUCIÓN TEMPORAL

Las membranas Immobilon-Ny<sup>+</sup> con distinta cantidad de indicador adsorbida se colocaron en la diagonal de una cubeta, inmersas en tampón fosfato 10 mM (pH 2.2). Las cinéticas de extinción de la luminiscencia de estos terminales sensibles se registraron mediante la técnica TC-SPC, empleando como fuente de luz en estas medidas un *led* de 450 nm (Nanoled-05 blue, IBH, Glasgow, Reino Unido). Para aislar la emisión del optodo de la luz de dispersión procedente de la fuente se colocaron dos filtros de corte de 530 y 570 nm. La temperatura del sistema se controló a 25.0 °C con un baño termostático.

Con objeto de confirmar el número de especies emisoras en disolución y la longitud de onda en la que se recoge su emisión máxima, se llevó a cabo un experimento TRS (*time-resolved spectroscopy*) con tres disoluciones del complejo  $[\text{Ru}(\text{s}2\text{d})_2(\text{pyim})]^{2-}$  (11 μM) en tampón fosfato 10 mM de pH 3.2, 7.0 y 10.0, respectivamente. Esta técnica permite registrar la cinética de desactivación de la luminiscencia de una muestra en un intervalo de longitudes de onda de emisión, previamente seleccionado (en nuestro caso, 560-800 nm, cada 10 nm) Para ello se empleó como fuente de luz un láser de Nd-YAG a 355 nm (espectrómetro LP-900, Edinburg Instruments), con una potencia de pulso de 32 mJ pulso<sup>-1</sup>, acumulando 100 disparos para cada medida y colocando tres filtros de corte, centrados a 420, 455 y 515 nm, delante del detector para evitar la luz procedente del pulso láser. Las disoluciones se equilibraron al aire y se mantuvieron a temperatura



constante durante el experimento (25.0 °C), recirculando para ello agua procedente de un baño termostático hasta el portacubetas. El análisis de las cinéticas se llevó a cabo empleando el *software* que proporciona *Edinburgh Instruments* para tales fines.

#### 6.6.4. MEDIDAS POR DETECCIÓN SENSIBLE A LA FASE

La validación final de los optodos desarrollados se realizó por detección sensible a la fase en el demostrador *DEMODE*. Dado que los indicadores evaluados no presentan tiempos de vida de emisión elevados, en comparación con las sondas de oxígeno o temperatura, se escogió la frecuencia máxima permitida por la versión del equipo utilizada en este estudio (140 KHz) para modular el *led* azul de excitación. En el canal de excitación se colocó un filtro interferencial de 420 nm, aislando la emisión del complejo de la luz procedente de la fuente con un filtro de corte de 590 nm.

Excepto cuando se estudió la influencia de estos parámetros en la respuesta del sensor, el dispositivo de medida se mantuvo en todo momento a 25.0 °C, llegando hasta las membranas el tampón fosfato (10 mM) con un flujo de 0.9 mL min<sup>-1</sup>. Esta disolución reguladora fue sustituida excepcionalmente por mezclas HCl-NaOH 10mM para determinar si la transferencia protónica en el estado excitado ocurre directamente desde la molécula de tampón. Asimismo, se modificó la concentración del regulador (100 mM) para comprobar la influencia de la fuerza iónica en el sensor.

Con objeto de establecer el efecto de la concentración de oxígeno disuelto presente en las aguas de medida se sumergió uno de los terminales (20 nmol cm<sup>-2</sup> de [Ru(s2d)<sub>2</sub>(pyim)]<sup>2-</sup> sobre *Immobilon-Ny+*) en tampón fosfato 10 mM de pH 7.0, burbujeando en la disolución oxígeno, nitrógeno o mezclas de ambos con un flujo de 200 mL min<sup>-1</sup>.



## 7. CONCLUSIONES (optodo de pH).

En este epígrafe de la Memoria se resumen los resultados obtenidos en lo que se refiere al sensor luminiscente de pH desarrollado.

- Se ha llevado a cabo la **sí ntesis** de cinco nuevos complejos luminiscentes de Ru(II) con, al menos, un ligando dotado de propiedades ácido-base: **[Ru(F15ap)<sub>3</sub>]<sup>2+</sup>**, **[Ru(phen)<sub>2</sub>(F15ap)]<sup>2+</sup>**, **[Ru(phen)<sub>2</sub>(5-NH<sub>2</sub>phen)]<sup>2+</sup>**, **[Ru(s2b)<sub>2</sub>(F15ap)]<sup>2-</sup>** y **[Ru(s2d)<sub>2</sub>(pyim)]<sup>2-</sup>**. Todos ellos han sido caracterizados estructuralmente y comprobado su grado de pureza gracias a la combinación de diferentes técnicas, como la resonancia magnética nuclear de protón y carbono-13, el infrarrojo por transformada de Fourier, la espectrometría de masas con electropulverización y el microanálisis.
- Se han determinado los principales **parámetros espectroscópicos y fotofísicos** ( $\lambda_{\text{máx}}^{\text{abs}}$ ,  $\epsilon$ ,  $\lambda_{\text{máx}}^{\text{em}}$ ,  $\tau$ ,  $\Phi_{\text{em}}$ ) de las sondas sintetizadas, en disolución acuosa, metanol o acetonitrilo, en función de la solubilidad de cada uno de los indicadores en estos disolventes.
- La **voltamperometría cíclica** realizada con los complejos [Ru(phen)<sub>2</sub>(F15ap)]<sup>2+</sup> y [Ru(F15ap)<sub>3</sub>]<sup>2+</sup> que poseen un ligando amida perfluorada ha permitido establecer la diferente situación energética de los ligandos que quelatan al metal. Así, mientras que en el indicador homoléptico el orbital libre de menor energía (LUMO) corresponde a la amida perfluorada (ligando denominado *principal* por sus propiedades ácido-base), en el compuesto heteroléptico este orbital pertenece a uno de los ligandos
- <sup>auxiliares</sup> A partir del **estudio fotoquímico** de las nuevas sondas preparadas **en función del pH** llevado a cabo en disolución tamponada, junto con otros complejos de Ru(II) con propiedades ácido-base sintetizados con anterioridad en nuestro laboratorio, se han seleccionado los indicadores **[Ru(s2b)<sub>2</sub>(F15ap)]<sup>2-</sup>** y **[Ru(s2d)<sub>2</sub>(pyim)]<sup>2-</sup>** para constituir la fase sensible del optodo luminiscente de pH objetivo de esta Tesis. La determinación espectroscópica de las **constantes de acidez** que exhiben estos compuestos, tanto en su estado fundamental como excitado, resultó ser idónea para la determinación del pH en aguas ( $pK_a = 6.5$  y  $6.9$ ,  $pK_{\text{ap}}^* = 6.6$  y  $6.4$ , respectivamente).

- Se ha determinado la **cinética de desactivación** de la luminiscencia de ambos complejos en disoluciones tampón con diferente concentración de iones hidrógeno. Para el complejo  $[\text{Ru}(\text{s2b})_2(\text{F15ap})]^{2-}$ , dichas cinéticas se ajustan a **dos** tiempos de vida constantes, cuyas contribuciones relativas varían en función del pH, lo que ha permitido deducir que se establece un auténtico **equilibrio ácido-base** en el estado excitado de este complejo. El indicador  $[\text{Ru}(\text{s2d})_2(\text{pyim})]^{2-}$ , por el contrario, muestra un **único** tiempo de vida constante con los cambios de pH (correspondiente al complejo con el ligando piridil-imidazol desprotonado) y un tiempo de vida variable, asignado a la especie protonada, cuyo valor disminuye a medida que aumenta la alcalinidad del medio. A partir de este estudio se ha podido concluir que se produce la **desprotonación irreversible** de la sonda excitada, no existiendo, por tanto, un auténtico equilibrio ácido-base en dicho estado.
- Se han evaluado distintos **soportes poliméricos** para construir la fase sensible del optodo de pH, junto con diversos métodos de inmovilización: unión covalente a vidrio aminado, adsorción sobre PTFE hidrofílico, atrapamiento en Nafion y unión electrostática a diferentes membranas catiónicas comerciales. De todos ellos, las matrices catiónicas de *nylon* resultaron ser las más robustas frente al lavado de la sonda y proporcionar los mejores resultados en lo que se refiere a tiempo de respuesta y sensibilidad al pH en las medidas de luminiscencia realizadas.
- Se han realizado determinaciones analíticas por **detección sensible a la fase**, utilizando un nuevo equipo optoelectrónico desarrollado por la empresa T.G.I. denominado sistema *DEMODE*, modulando a **140 KHz** el diodo emisor azul de excitación que incluye este demostrador, frecuencia máxima admitida por la versión del equipo empleada. A partir del recorrido, en grados de desfase, obtenido entre dos valores de pH extremos (2 y 9) para las dos sondas seleccionadas inmovilizadas en las matrices catiónicas de *nylon*, se ha elegido el complejo  $[\text{Ru}(\text{s2d})_2(\text{pyim})]^{2-}$  como indicador de pH para fabricar el terminal sensible del sensor óptico finalmente desarrollado.
- Se ha llevado a cabo la caracterización analítica de este optodo, estableciendo la influencia sobre la respuesta del sensor de la temperatura, fuerza iónica, oxígeno disuelto, disolución reguladora y cantidad de complejo inmovilizado. Como resultado de este estudio puede concluirse que el sensor fabricado

requiere una calibración adicional con respecto a la **fuerza iónica** y la **temperatura** del medio, siendo insensible la luminiscencia del complejo inmovilizado a la cantidad de **oxígeno disuelto** presente en la disolución de medida.

- La **precisión** del optodo luminiscente (0.02 unidades de pH), medida en el intervalo de máxima sensibilidad (pH 6-8) es competitiva con los sensores potenciométricos que se emplean en la actualidad para la medida del pH en el medio ambiente. A pesar de que en éstos la respuesta es muy rápida, el **tiempo** requerido por el sensor óptico para determinar el pH que hay en una disolución es adecuado para el tipo de medidas objeto de este Proyecto (6-8 min). La **fotoestabilidad** de las membranas sensibles ha demostrado ser adecuada para la utilización de las mismas en monitorización *in situ* de aguas residuales.



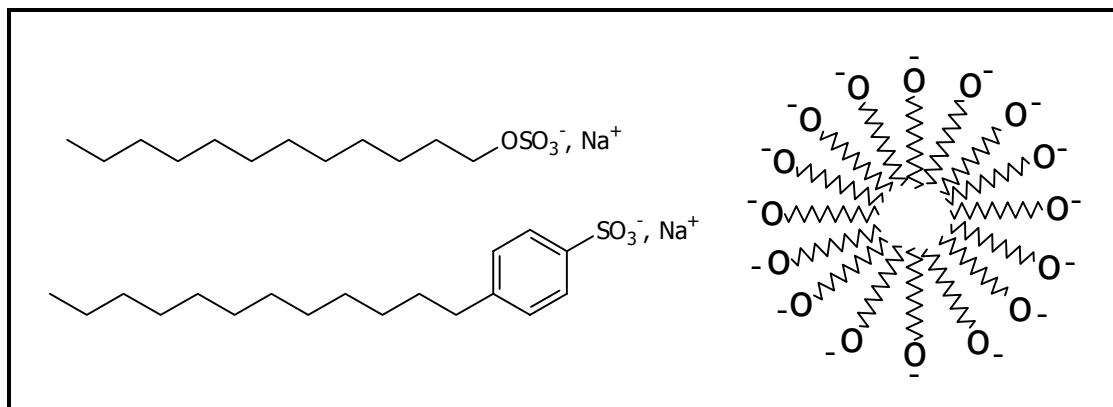
## 1. INTRODUCCIÓN.<sup>157,158</sup>

En la actualidad existe una gran preocupación medioambiental por el vertido incontrolado de detergentes, tanto a escala doméstica como industrial, generalmente descubierto por la formación de grandes cantidades de espuma en los ríos. La determinación *in situ* de los niveles de tensioagentes aniónicos o neutros (los más comunes en los detergentes comerciales) en aguas es fundamental para poder detectar situaciones de alarma derivadas de estos vertidos. La importancia de la detección de estas sustancias no sólo interesa para el control medioambiental, sino que se extiende a áreas tan diversas como la industria farmacéutica, la cosmética o la mecánica, entre otras.

Los detergentes domésticos utilizan surfactantes (o “*compuestos tensioactivos*”) como ingredientes activos. Estas moléculas se caracterizan por poseer una estructura anfifílica formada por una larga cadena hidrocarbonada hidrofóbica y un grupo polar aniónico, catiónico o neutro. En disolución acuosa, los detergentes forman especies coloidales conocidas como *micelas* en las que la cabeza hidrofílica se sitúa hacia el disolvente (polar) dejando la larga cola hidrofóbica hacia el interior (figura 75). La formación de *micelas* se produce cuando el detergente alcanza una concentración determinada, denominada **concentración micelar crítica** (cmc), cuyo valor y tamaño de la micela formada dependen del tipo de surfactante, de la temperatura y de la presencia de otras especies en el medio, como electrolitos o alcoholes. En disolventes orgánicos de baja polaridad, estos compuestos se agrupan de manera contraria a la descrita anteriormente, formando lo que se conoce como *micelas inversas*. En ambos casos, la viscosidad y polaridad del interior de la micela difiere claramente con respecto al exterior, permitiendo que moléculas insolubles en agua se solubilizan en presencia de surfactantes, al alojarse en el interior de sus micelas. Además de la formación de estos agregados, los iones tensioactivos pueden distribuirse en la superficie del medio acuoso orientando la molécula de forma que los grupos hidrofílicos se encuentran en el agua debidamente solvatados, mientras que los hidrofóbicos quedan expuestos al aire. Esto provoca una disminución en la tensión superficial del agua, dando lugar a la formación de espumas.

---

<sup>157</sup> Wandruska, R., *Crit. Rev. Anal. Chem.*, **1992**, 23, 187.



**Figura 75.** Estructura de dos surfactantes aniónicos ampliamente utilizados en los productos de higiene domésticos: el *dodecilsulfato sódico* (SDS) y el *p-dodecylbencenosulfonato sódico*. A la derecha se muestra una representación esquemática de una micela en un medio polar, como el agua.

Los surfactantes con cadenas ramificadas son muy resistentes a la biodegradación, persistiendo en las aguas con formación de grandes cantidades de espuma. Por esta razón, en los años sesenta se sustituyeron por nuevas fórmulas más biodegradables como los *alquilbencenosulfonatos* y, posteriormente, por *alquilsulfatos*, como el *dodecilsulfato sódico* (SDS) presente hoy en día en la mayor parte de los productos de limpieza, donde se mezclan con aditivos adecuados para mejorar su función. Los compuestos tensioactivos, sin embargo, no sólo son importantes como agentes limpiadores, sino que también son vitales en la industria cosmética y de alimentos.<sup>158</sup>

- TENSIOAGENTES CATIONICOS.

Estos compuestos son de poca utilidad en limpieza porque la mayoría de las superficies están cargadas negativamente y se adsorben fácilmente sobre ellas. Son, sin embargo, de gran utilidad en la industria farmacéutica, al poseer un gran poder antiséptico y bactericida. Los surfactantes cationicos se emplean también como inhibidores de la corrosión, agentes suavizantes, en limpieza de metales y en la recuperación del petróleo.

- TENSIOAGENTES ANIÓNICOS.

La inmensa mayoría de los productos de limpieza se basan en la acción limpiadora de detergentes aniónicos. No sólo constituyen la base de detergentes

<sup>158</sup> Wittcoff, H. A. y Reuben, B. G., *Agentes tensioactivos*, en *Productos químicos orgánicos industriales*, cap. 7., Limusa, México, 1987.



para lavandería y limpieza del hogar, sino que forman parte de la formulación de cosméticos, pastas dentífricas y artículos de higiene personal.

- TENSIOAGENTES NEUTROS.

Los agentes tensioactivos no iónicos son excelentes agentes humectantes. Suelen ser ceras de bajo punto de fusión o líquidos por lo que son ideales para formulaciones líquidas. Se emplean en productos de lavandería que requieren baja formación de espuma y en emulsificantes de alimentos, entre otras aplicaciones.

## 2. MÉTODOS PARA LA DETERMINACIÓN DE DETERGENTES.

Los métodos empleados tradicionalmente para la determinación de la concentración de surfactantes en el medio se basan en determinaciones colorimétricas, electroquímicas (potenciométricas) o cromatográficas (gases y HPLC). Estas últimas son las más aceptadas para la determinación de *alquilbencenosulfonatos*, debido a su gran especificidad.<sup>159</sup>

Actualmente existen en el mercado varios electrodos comerciales para la cuantificación de sustancias tensioactivas. Uno de ellos, fabricado por la empresa suiza *Metrohm*, utiliza una membrana de *poli(cloruro de vinilo)* provista de una molécula transportadora. La medida con este electrodo se lleva a cabo mediante valoración con *cloruro de 1,3-didecil-2-metilimidazolio*, siendo útil tanto para detergentes aniónicos como catiónicos.<sup>160</sup> Otro ejemplo lo constituye el DN-100 de *Mettler*, utilizado para la detección de compuestos tensioactivos en lubricantes. Este sensor detecta cambios tanto en la turbidez como en el índice de refracción de la muestra.

Un método electroquímico indirecto descrito en la bibliografía para la determinación de *alquilbencenosulfonatos* lineales se basa en la monitorización, con un electrodo de Clark, del oxígeno consumido por la respiración de una bacteria degradadora de este tipo de detergentes. Para ello, se hace pasar la

---

<sup>159</sup> Reemtsma, T., *J. Chromatogr. A*, **1996**, 733, 473.

muestra a través de una columna rellena de tamices de *alginato sódico* donde previamente se ha inmovilizado la bacteria.<sup>161</sup>

## 2.1. MÉTODOS ÓPTICOS.

### 2.1.1. COLORIMÉTRICOS.

El método estándar empleado en la medida de **detergentes aniónicos** en vertidos industriales es el método óptico que establece la norma española UNE-77-054-83, basado en la formación de un par iónico entre el **azul de metileno** (MB) y el surfactante, su posterior extracción del medio acuoso con cloroformo y, finalmente, la medida de la absorbancia de esta fase orgánica a 652 nm, proporcional a la concentración del tensioagente.<sup>162</sup> A pesar de no ser tan específica como la cromatografía HPLC, esta técnica permite establecer la concentración de analito presente en una muestra en menor tiempo. Los inconvenientes que presenta el método, además de no ser fácilmente automatizable, son las interferencias que introducen algunas sustancias presentes en el medio, así como la necesidad de utilizar un disolvente clorado. Además, el MB tiene que ser purificado antes de cada determinación para eliminar los productos de degradación y, en general, el proceso requiere múltiples extracciones debido al pobre poder extractante del sistema MB-cloroformo.

En la bibliografía se describen numerosos intentos de mejora del método MB. Agudo et al.<sup>163</sup> hacen pasar la fase acuosa con el surfactante aniónico en continuo a través de la fase orgánica (cloroformo) que contiene el indicador, la cual se enriquece poco a poco con el analito. Otros autores, por su parte, aplican también el método MB de forma automática y con inyección de flujo, utilizando para ello una *membrana de poli(tetrafluoroetileno)*, PTFE, de doble poro para la preconcentración y extracción de los pares iónicos formados.<sup>164</sup> En métodos alternativos se sustituye el *azul de metileno* por otro indicador, como el

---

<sup>160</sup> Buschman, N. y Schulz, R., *Tenside Surf. Det.*, **1993**, 30, 18.

<sup>161</sup> Nomura, Y., Ikebukoro, K., Yokoyama, K., Takeuchi, T., Arikawa, Y., Ohno, S. y Karube, I., *Anal. Lett.*, **1994**, 27, 3095.

<sup>162</sup> Abbott, D. C., *Analyst*, **1962**, 87, 287.

<sup>163</sup> Agudo, M., Ríos, A. y Varcácel, M., *Analyst*, **1994**, 119, 2097.

<sup>164</sup> Moskvín, L. N., Simon, J., Löffler, P., Michailova, N. V. y Nicolaevna, D. N., *Talanta*, **1996**, 43, 819.

**bis[2-(5-trifluorometil-2-piridilazo)-5-dietilaminofenóxido]cobalto(III)**, cuya absorbancia a 560 nm permite cuantificar la concentración de detergente.<sup>165</sup>

Algunos indicadores en disolución muestran cambios en su espectro de absorción dependientes del entorno que les rodea. Este fenómeno, conocido como *solvatocromismo*, constituye la base de un sensor para la cuantificación de detergentes aniónicos en el que el cromóforo utilizado es el **p-difenilaminoazobencenosulfonato**.<sup>166</sup> Este indicador sufre un desplazamiento hipsocrómico en presencia de detergentes catiónicos y neutros o disolventes menos polares, como el etanol. Únicamente los agentes tensioactivos aniónicos provocan un aumento en su absorbancia, lo que permite su cuantificación. En la bibliografía se describe también un método espectrofotométrico para la determinación de detergentes basado en la medida de la c.m.c. de micelas mixtas, función de la concentración del agente surfactante objetivo (catiónico, aniónico o neutro) que forma parte de la micela. En este caso, los autores emplean el **azul brillante Coomassie** como indicador colorimétrico, cuyo espectro de absorción varía dependiendo de la cantidad de detergente presente en la disolución.<sup>167</sup>

A pesar de que la investigación se centra mayoritariamente en la búsqueda de métodos cada vez más eficaces para detectar surfactantes aniónicos, por ser éstos mayoritarios, también es necesaria la determinación de **detergentes catiónicos**, ya que forman parte de los componentes de multitud de suavizantes, tintes de pelo, inhibidores de la corrosión o agentes antimicrobianos. Para ello, por lo general, se utilizan métodos de valoración en dos fases, como el **método Epton** que utiliza también como indicador el *azul de metileno*.<sup>168</sup> Motomizu et al. realizan la valoración fotométrica de detergentes catiónicos con un *éster etílico* de la **tetrabromofenolftaleína (TBPE)**, en presencia de un surfactante neutro como el *Triton X-100*.<sup>169</sup> El método se basa en la formación de un par iónico entre el detergente catiónico (analito), que inicialmente posee como contraión al TBPE y el aniónico (añadido a la muestra). La presencia del Triton X-100 evita la

---

<sup>165</sup> Kasahara, I., Hashimoto, K., Kawabe, T., Kunita, A., Magawa, K., Hata, N., Taguchi, S. y Goto, K., *Analyst*, **1995**, *120*, 1803.

<sup>166</sup> Liu, J., *Anal. Chim. Acta*, **1997**, *343*, 33.

<sup>167</sup> Casero, I., Sicilia, D., Rubio, S. y Pérez-Bendito, D., *Anal. Chim. Acta*, **1997**, *345*, 75. b) Sicilia, D., Rubio, S. y Pérez-Bendito, D., *Anal. Chem.*, **1995**, 1872.

<sup>168</sup> Epton, S. R., *Trans. Faraday Soc.*, **1948**, *44*, 226.

precipitación de estos pares iónicos de surfactantes por formación de micelas mixtas. En la valoración directa, el propio detergente aniónico actúa como valorante (*dodecibencenosulfonato sódico*), mientras que en las indirectas es el *cloruro de bencildimetiltetradecilamonio* el que establece el punto de equivalencia.

### 2.1.2. LUMINISCENTES.

La espectroscopía de luminiscencia aporta un conjunto único de herramientas para el estudio de sistemas micelares. Los tiempos de vida de emisión o las medidas de desactivación de la fluorescencia permiten determinar parámetros característicos de las micelas, como su c.m.c., número de agregación, forma, tamaño, estructura o microviscosidad.<sup>170</sup> En general, los fluoróforos ven incrementada considerablemente su emisión al incorporarse al interior de la micela, debido a que ésta le aísla de los desactivadores presentes en la disolución, además de proporcionarle un entorno de mayor viscosidad. El aumento experimentado en la emisión es más pronunciado en aquellos fluoróforos cuya estructura es similar a la del detergente, ya que la interacción con éste es más fuerte.<sup>157</sup>

El biosensor desarrollado por Lundgren et al.<sup>171</sup> utiliza como sonda de detergentes la *albúmina de suero bovino* (BSA) marcada con **acrilodan**, ambos inmovilizados en el extremo de una fibra óptica. La presencia de surfactantes iónicos provoca un aumento de la fluorescencia de este compuesto, acompañada de un desplazamiento hipsocrómico de su máximo de emisión. Otra manera de cuantificar surfactantes catiónicos es la formación de pares iónicos con fluoróforos. La disminución de la polaridad del medio debida a la región hidrófoba del detergente provoca los mismos efectos en la fluorescencia del compuesto descritos anteriormente. Un ejemplo de este tipo de técnica es el sensor de fibra óptica desarrollado a partir de **5-[(2-aminoetil)amino]naftaleno-1-sulfonato** inmovilizado covalentemente en G-CPG (vidrio de poro controlado), celulosa o alcohol polivinílico.<sup>172</sup> Asimismo, el detergente Tween-60 puede determinarse con un sensor óptico gracias a los complejos que forma con una *tetrafenilporfirina*

---

<sup>169</sup> Motomizu, S., Gao, Y., Uemura, K. y Ishihara, S., *Analyst*, **1994**, 119, 473.

<sup>170</sup> Turro, N. J., Grätzel, M y Braun, A. M., *Angew. Chem., Int. Ed. Eng.*, **1980**, 19, 675.

<sup>171</sup> Lundgren, J. S. y Bright, F. V., *Anal. Chem.*, **1996**, 68, 3377.

<sup>172</sup> Shakhsher, Z. M. y Seitz, W. R., *Anal. Chem.*, **1990**, 62, 1758.

soportada sobre una matriz de PVC, la cual ve incrementada fuertemente su luminiscencia como producto de su unión al surfactante.<sup>173</sup>

La interacción con micelas de **complejos luminiscentes de Ru(II)** con ligandos azaheterocíclicos que contienen una estructura de tipo  $\alpha$ -diimina ha sido objeto de un amplio estudio, generalmente dirigido a emplear estos luminóforos como sondas moleculares de los medios microheterogéneos o para el diseño de sistemas fotocatalíticos eficaces convertidores de energía solar en energía química a través de la fotólisis del agua.<sup>174</sup> Un adecuado diseño molecular de estos complejos, permite incorporar en su estructura ligandos con suficiente hidrofobicidad como para poder introducirse en las micelas generadas por surfactantes presentes en el medio a determinadas concentraciones. Además, la naturaleza iónica de estos compuestos posibilita el establecimiento de uniones electrostáticas tensioactivo-indicador, responsables también de los cambios que se producen en las propiedades ópticas de los complejos en medio micelar. Demas et al. han descrito la interacción de estos compuestos con detergentes, así como su accesibilidad al interior de las micelas y el efecto que éstas producen en su luminiscencia.<sup>175</sup> Por otro lado, Orellana et al. han patentado un sensor óptico para detergentes basado en el complejo **[Bis(4,7-di(sulfofenil)-1,10-fenantrolina)(5-tetradecanamida-1,10-fenantrolina)]rutenio(II)**, abreviadamente  $[\text{Ru}(\text{s}2\text{d})_2(\text{tdap})]^{2-}$  (figura 76), el cual interacciona fuertemente con agentes surfactantes aniónicos, catiónicos y neutros debido a su marcada naturaleza anfifílica.<sup>176</sup>

El complejo heteroléptico **[bis(2,2'-bipiridina)(dipirido(3,2-a:2',3'-c)fenazina)]rutenio(II)**, abreviadamente  $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{dppz})]^{2+}$  (figura 76), se ha propuesto como sonda para la detección de surfactantes aniónicos.<sup>177</sup> Este indicador, cuya luminiscencia se encuentra totalmente desactivada en agua, emite en presencia de *dodecilsulfato sódico* (SDS) debido a que al ocluirse en el

<sup>173</sup> Yang, R. H., Wang, K. M., Xiao, D., Yang, X. H. y Li, H. M., *Anal. Chim. Acta*, **2000**, 404, 205.

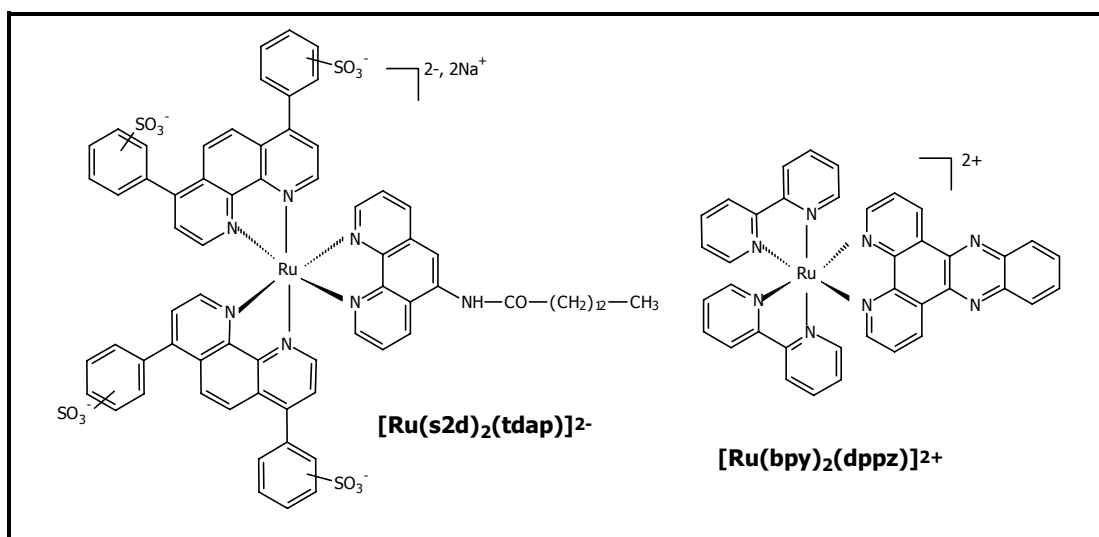
<sup>174</sup> Dür, H., Dör, G., Zengerle, K., Mayer, E., Curchod, J. M. y Braun, A. M., *Nouveau J. Chim.*, **1985**, 9, 717.

<sup>175</sup> a) Snyder, S. W., Buell, S. L., Demas, J. N. y DeGraff, B. A., *J. Phys. Chem.*, **1989**, 93, 5265. b) Snyder, S. W., S. L., Demas, J. N. y DeGraff, B. A., *Chem. Phys. Lett.*, **1988**, 145, 434. c) Mandal, K., Hauenstein, B. L., Demas, J. N. y DeGraff, B. A., *J. Phys. Lett.*, **1983**, 87, 328. d) Hauenstein, B. L., Dressick, W. J., Buell, S. L., Demas, J. N. y DeGraff, B. A., *J. Am. Chem. Soc.*, **1983**, 105, 4251. e) Dressick, W. K., Hauenstein, B. L., Gilbert, T. B., Demas, J. N. y DeGraff, B. A., *J. Phys. Chem.*, **1984**, 88, 3337.

<sup>176</sup> Orellana, G., García-Fresnadillo, D., Moreno-Bondi, M. C., Marazuela, M. D., Knapp, C. y Castro, A. M., *Sensor óptico para detergentes*, Patente Española ES (nº sol. P9602182, **1996**).

<sup>177</sup> Chambron, J. C. y Sauvage, J. P., *Chem. Phys. Lett.*, **1991**, 182, 603.

interior de sus micelas se protege al anillo de *fenazina* de la desactivación por las moléculas de agua del medio.



**Figura 76.** Estructura de los dos complejos de Ru(II) utilizados como sondas para detergentes.

El sistema heterocíclico  $\pi$  del ligando *dppz* combina la capacidad quelatante de las  $\alpha$ -diiminas con la transferencia electrónica/protónica propia de 1,4-diazinas.<sup>178</sup> Numerosos experimentos llevados a cabo con indicadores del tipo  $[\text{RuL}_2\text{dppz}]^{2+}$  han mostrado que las propiedades ópticas de los complejos que poseen este ligando dependen de la presencia de especies suficientemente ácidas en el medio disolvente y su accesibilidad a los átomos de nitrógeno heterocíclicos no quelatados del *dppz*. Esto se traduce en la desactivación no radiativa del estado excitado emisor MLCT en presencia de moléculas de agua y emisión de luz en disolventes no acuosos,<sup>177,179,180</sup> en medio micelar<sup>177</sup> o en presencia de *ácido desoxirribonucleico*,<sup>181</sup> debido a que la extensa estructura aromática que posee este ligando le confiere un gran poder intercalante, facilitando su inclusión en la cavidad hidrófoba del interior de las micelas o los surcos de la doble hélice de DNA e impidiendo el acceso de las moléculas de agua hasta los átomos de nitrógeno de la *fenazina*.

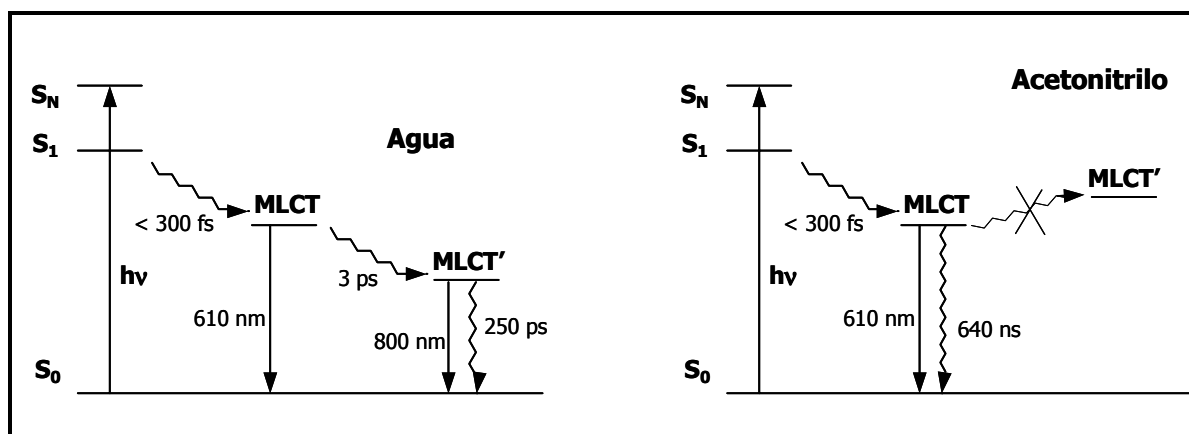
<sup>178</sup> Kaim, W., a) *Angew. Chem.*, **1983**, 95, 201. b) *Angew. Chem. Int. Ed. Eng.*, **1983**, 22, 171. c) *Rev. Chem. Intern.*, **1987**, 8, 247.

<sup>179</sup> a) Chambron, J. C., Sauvage, J. P., Amouyal, E. y Koffi, P., *New J. Chem.*, **1985**, 9, 527. b) Amouyal, E., Homsy, A., Chambron, J. C. y Sauvage, J. P., *J. Chem. Soc. Dalton Trans*, **1990**, 1990, 1841.

<sup>180</sup> Nair, R. B., Cullum, B. y Murphy, C. J., *Inorg. Chem.*, **1997**, 36, 962.

<sup>181</sup> a) Friedman, A. E., Chambron, J. C., Sauvage, J. P., Turro, N. J., Barton, J. K., *J. Am. Chem. Soc.*, **1990**, 112, 4960. b) Lincoln, P., Broo, A., Norden, B., *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**, 118, 2644.

En la actualidad existen dos teorías que tratan de explicar el comportamiento en medio acuoso de este tipo de complejos. La primera de ellas establece que se produce una transferencia protónica desde la molécula de agua (u otros ácidos de Brönsted) hasta los átomos de nitrógeno heterocíclicos no quelatados *cuando el indicador se encuentra en su estado excitado*.<sup>182</sup> Se trata, por tanto, de un mecanismo bimolecular controlado por la velocidad de difusión (o de pseudo primer orden, en el caso de disolventes puros) y dependiente de la facilidad del disolvente para ceder el átomo de hidrógeno. Una segunda teoría afirma que, en realidad, el mecanismo de desactivación en medio acuoso involucra un proceso de transferencia de carga intramolecular con conversión del estado excitado MLCT emisor en un nuevo estado excitado MLCT', que emite en el infrarrojo próximo (800 nm) y desde el que el complejo se desactiva muy rápidamente ( $\tau = 250$  ps).<sup>183</sup> La pérdida de luminiscencia se produce así por interconversión entre los dos estados, proceso inducido por la polaridad del disolvente o por la facilidad del mismo para ceder protones. El nuevo estado MLCT' posee una densidad de carga mayor sobre el anillo de fenazina, por lo que se estabiliza en presencia de disolventes polares, especialmente los dadores de protones (figura 76).



**Figura 76.** Modelo de Barbara et al. que describe la dependencia de las propiedades fotofísicas del complejo  $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{dppz})]^{2+}$  con el entorno que rodea a la molécula, estudiados por espectrofotometría cinética con láser de fs.<sup>183</sup>

<sup>182</sup> a) Jenkins, Y., Friedman, A. E., Turro, N. J. y Barton, J. K., *Biochemistry*, **1992**, 31, 10809. b) Turro, C., Bossmann, S. H., Jenkins, Y., Barton, J. K. y Turro, N. J., *J. Am. Chem. Soc.*, **1995**, 117, 9026.

<sup>183</sup> Olson, E. J. C., Hu, D., Hömann, A., Jonkman, A. M., Arkin, M. R., Stemp, E. D. A., Barton, J. K. y Barbara, P. F., *J. Am. Chem. Soc.*, **1997**, 119, 11458.





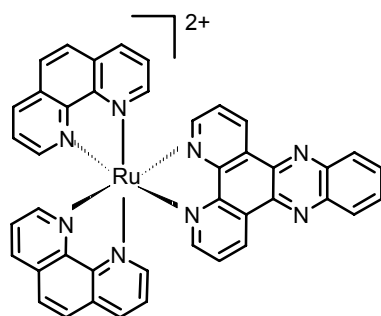
### 3. PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS.

Uno de los objetivos del Proyecto de investigación en el que se incluye esta Memoria es el desarrollo de un sensor óptico para la detección y cuantificación de detergentes ya que, como se ha descrito en los *antecedentes* de este optodo, este analito constituye uno de los principales contaminantes en las aguas, generalmente procedente de vertidos industriales.

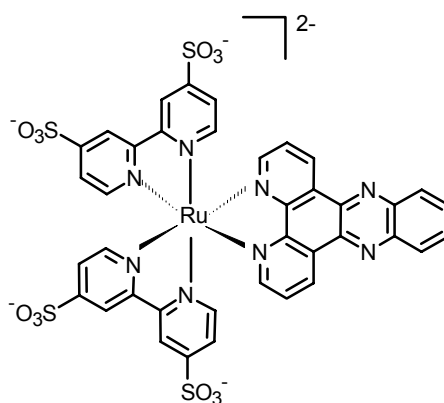
En la bibliografía, como hemos descrito, se refleja el resultado de numerosos estudios llevados a cabo con complejos de Ru(II) en medio micelar. De éstos se desprende que las interacciones iónicas surfactante-indicador, apoyadas por la hidrofobicidad de algunos ligandos, son las responsables de los cambios que experimentan las propiedades ópticas de estas sondas moleculares en presencia de surfactantes.<sup>175</sup>

Aunque se han estudiado una amplia variedad de complejos de Ru(II), homo y heterolépticos, con *dppz* y ligandos relacionados, hasta el momento sólo se ha descrito brevemente la variación de la luminiscencia del complejo con *dipiridofenazina*,  $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{dppz})]^{2+}$ , en presencia de un surfactante (*dodecilsulfato sódico*, SDS).<sup>177</sup> La emisión de esta sonda se incrementa considerablemente a medida que aumenta la concentración de detergente, hasta que éste alcanza su c.m.c., valor a partir del cual la emisión del complejo permanece constante. Se planteó, por tanto, la síntesis de nuevos indicadores que contuvieran en su estructura este ligando y cuya carga global permitiera establecer la importancia de las interacciones electrostáticas sonda-detergente en los cambios experimentados en las propiedades ópticas del compuesto.

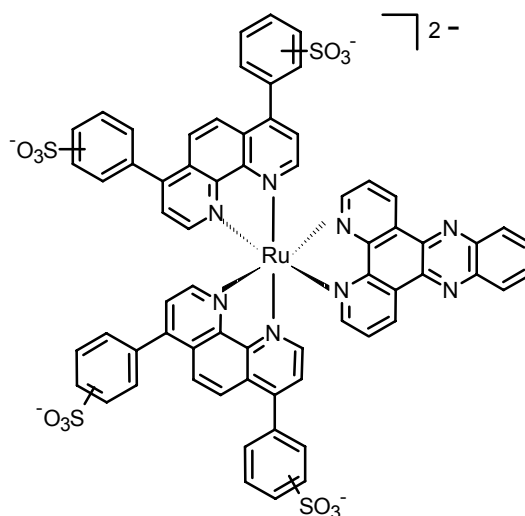
- **$[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{dppz})]^{2+}$** , [bis(1,10-fenantrolina)(dipirido[3,2-a:2',3'-c]fenazina)]rutenio(II). La fotofísica de este complejo se ha estudiado ampliamente, tanto en medio homogéneo como en presencia de DNA.<sup>181</sup> Esta sonda molecular ha demostrado ser un excelente intercalante en la doble hélice de la macromolécula, recuperando con esta unión la luminiscencia que pierde en el medio acuoso. Sin embargo, no se conoce hasta el momento su comportamiento en presencia de surfactantes, aunque es de esperar que sea similar al de su análogo  $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{dppz})]^{2+}$  en SDS.<sup>177</sup>



- **[Ru(s2b)<sub>2</sub>(dppz)]<sup>2+</sup>**, [bis(4,4'-disulfo-2,2'-bipiridina)(dipirido[3,2-a:2',3'-c]fenazina)]rutenio(II). La finalidad de la preparación de esta sonda aniónica es establecer la influencia de la carga y, por tanto, de las interacciones electrostáticas indicador-detergente, sobre las propiedades ópticas de estos complejos.



- **[Ru(s2d)<sub>2</sub>(dppz)]<sup>2-</sup>**, [bis(4,7-di(sulfofenil)-1,10-fenantrolina)(dipirido[3,2-a:2',3'-c]fenazina)]rutenio(II). Los ligandos auxiliares en esta molécula poseen una amplia estructura aromática en la que portan sendos grupos sulfonato, que confieren al indicador una carga global negativa. Sin embargo, la gran separación de cargas existente entre el centro metálico catiónico y los anillos sulfonados permiten a los complejos con ligandos s2d su inclusión en micelas del mismo signo.<sup>175</sup> Se trata, por tanto, de sintetizar una sonda que sea sensible a surfactantes de distinta carga. Además, cabe esperar que los ligandos difenilfenantrolina incrementen notablemente el tiempo de vida de emisión del indicador, respecto a su análogo s2b.



Además del diseño de nuevas sondas, basado en antecedentes bibliográficos, el desarrollo de indicadores debe abordar también los siguientes aspectos:

- **Viabilidad sintética** de los indicadores diseñados, estableciendo los métodos de preparación y técnicas de purificación más apropiados en función de la experiencia con complejos de Ru(II) que posee nuestro grupo de investigación.
- **Preparación** de nuevas sondas y **caracterización estructural** de las mismas, empleando para ello las técnicas disponibles y más adecuadas para la confirmación de la estructura química de cada compuesto (resonancia magnética nuclear de <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C, infrarrojo, microanálisis y espectrometría de masas).
- **Caracterización fotoquímica** en **medio homogéneo** de los indicadores: determinación de los parámetros más importantes propios de cada complejo y necesarios para la posterior evaluación de las sondas, como son las longitudes de onda máximas de absorción y emisión, los coeficientes de absorción molar de dichos máximos, su rendimiento cuántico de luminiscencia o el tiempo de vida de su estado excitado emisor. Dado que, en principio, las propiedades ópticas de estos indicadores son muy sensibles al disolvente, se realizará este estudio tanto en disolución acuosa como en medio orgánico (DMF).

- **Comportamiento** de los nuevos indicadores en **medio microheterogéneo**: se pretende establecer no sólo cómo varía la luminiscencia de los nuevos complejos en presencia de surfactantes, sino la influencia de la carga en la variación de las propiedades ópticas de las sondas. Para ello se empleará en este estudio un detergente aniónico (SDS), otro catiónico (CTAB) y uno neutro (TRITON X-100) como prototipos de cada una de las correspondientes familias de moléculas surfactantes.

La finalidad de la síntesis y posterior estudio en medio micelar de nuevos complejos de Ru(II) estriba en la selección de un indicador que, en una segunda fase y tras su adecuada inmovilización en una matriz sólida, permita la construcción de un sensor óptico de detergentes en aguas que pueda ser interrogado, por detección sensible a la fase, empleando el mismo sistema *DEMODE* desarrollado por el Grupo de Ingeniería Electrónica de T.G.I., que hemos utilizado para la monitorización con los sensores de temperatura y pH descritos en los anteriores apartados de esta Memoria.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

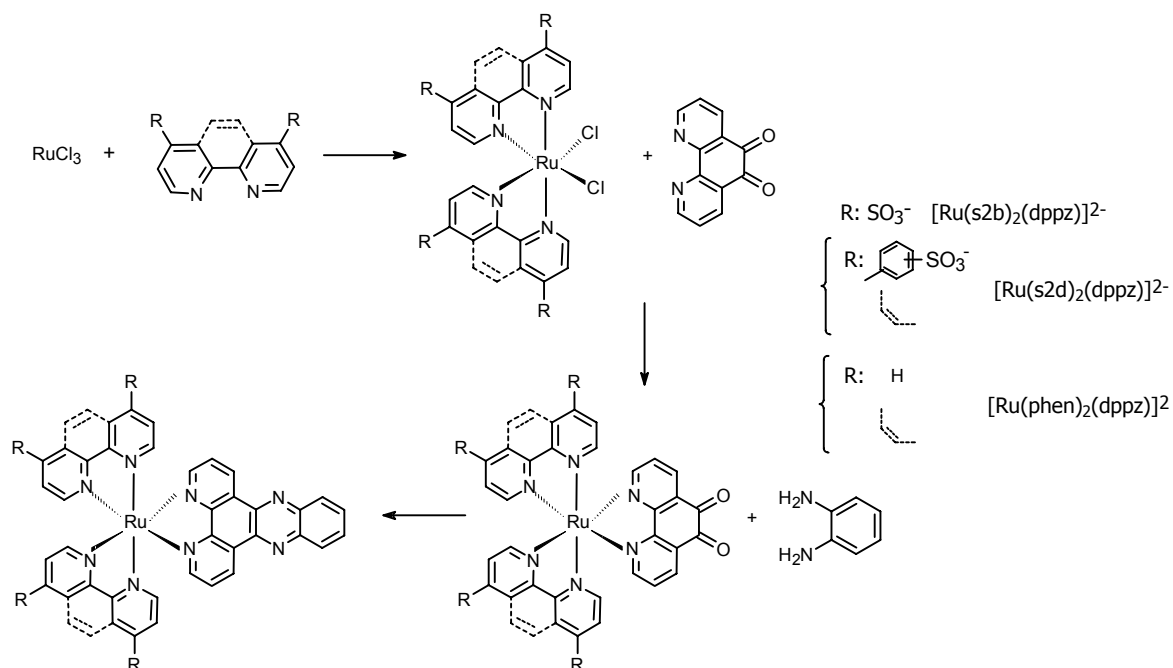
En este epígrafe de la Memoria se detallan los métodos de síntesis utilizados en la preparación de las nuevas sondas para detergentes, así como el resultado de la caracterización estructural de las mismas empleando distintas técnicas espectroscópicas. Finalmente, se describe la evaluación de las propiedades ópticas de los complejos luminiscentes de Ru(II) con ligandos poliazaheterocíclicos, tanto en medio homogéneo (agua y DMF) como en presencia de distintos detergentes. Se establecerá, de este modo, la influencia de las moléculas de agua en la luminiscencia de los indicadores, así como la interacción de los mismos con surfactantes aniónicos, catiónicos y neutros.

### 4.1. SÍNTESIS, PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DE LOS INDICADORES.

La síntesis del indicador **[Ru(phen)<sub>2</sub>(dppz)]<sup>2+</sup>** se llevó a cabo según el procedimiento descrito en la bibliografía, en el que el ligando principal (dppz) se forma en un último paso de síntesis por condensación de *o*-fenilendiamina con la fenantrolinaquinona (pq) que forma parte de un complejo heteroléptico previamente sintetizado ([Ru(phen)<sub>2</sub>(pq)]<sup>2+</sup>).<sup>184</sup> La baja solubilidad del ligando dppz, debido a la gran hidrofobicidad que le confiere su extensa estructura aromática, dificulta su incorporación directa por reacción con el bisquelatocomplejo precursor. Los dos indicadores aniónicos se prepararon siguiendo el mismo protocolo de síntesis, introduciendo las correspondientes modificaciones (disolvente, método de purificación) condicionadas por la carga global de estos compuestos.

---

<sup>184</sup> Goss, C. A. y Abruña, H. D., *Inorg. Chem.*, **1985**, 24, 4263.



#### 4.1.1. LIGANDOS.

El ligando **5,6-dioxo-1,10-fenantrolina**, denominado *fenantrolinaquinona* o abreviadamente *pq*, se obtuvo por oxidación de 5-amino-1,10-fenantrolina en una mezcla de ácido sulfúrico concentrado y ácido nítrico fumante (apartado 5.2.1., *Parte Experimental*) El reactivo aminado de partida había sido sintetizado previamente por formar parte de uno de los complejos de Ru(II) evaluados como potenciales sondas de pH (ver apartados 5.2.1 y 6.2.1 del *Optodo de pH*).

El espectro **IR** de la *fenantrolinaquinona* preparada muestra, además de las bandas características de los anillos aromáticos, una banda a  $1686\text{ cm}^{-1}$  propia de la tensión de enlace del grupo carbonilo perteneciente a una estructura o-quinónica.<sup>128</sup>

Uno de los datos más concluyentes para la confirmación estructural de este compuesto es la aparición de una señal a valores de campo alto correspondiente a los carbonos carbonílicos en el espectro de  $^{13}\text{C-RMN}$  (tabla 32).

La pureza del sólido obtenido se demuestra asimismo con la desaparición del singlete a 6.10 ppm atribuido a los protones amínicos del reactivo de partida en el espectro de  $^1\text{H-RMN}$ . La alta simetría de la molécula da lugar a una reducción en el número de señales observadas en el espectro en relación a las que exhibe el amino derivado (tabla 32).

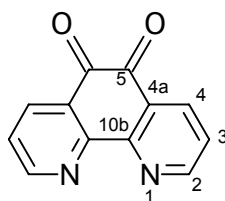
**Tabla 32.** Desplazamientos químicos de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ -RMN de los compuestos 5-amino-1,10-fenantrolina (5-NH<sub>2</sub>p) y 5,6-dioxo-1,10-fenantrolina (pq), en DMSO-d<sub>6</sub>.

$^1\text{H-RMN}$ / ppm	H2	H9	H4	H7	H5	H6	H3	H8	NH <sub>2</sub>
5-NH <sub>2</sub> p <sup>a</sup>	8.99	8.63	8.63	7.98	----	6.81	7.44	7.70	6.10
pq		8.91		8.31	----	----		7.59	----

$^{13}\text{C-RMN}$ / ppm	C2	C9	C10a	C10b	C4	C7	C4a	C6a	C5	C6	C3	C8
5-NH <sub>2</sub> p <sup>a</sup>	149.3	144.8	140.5	146.2	132.7	130.8	121.8	130.5	142.6	101.7	122.0	123.1
pq		154.4		152.4		135.7		129.1		177.8		125.3

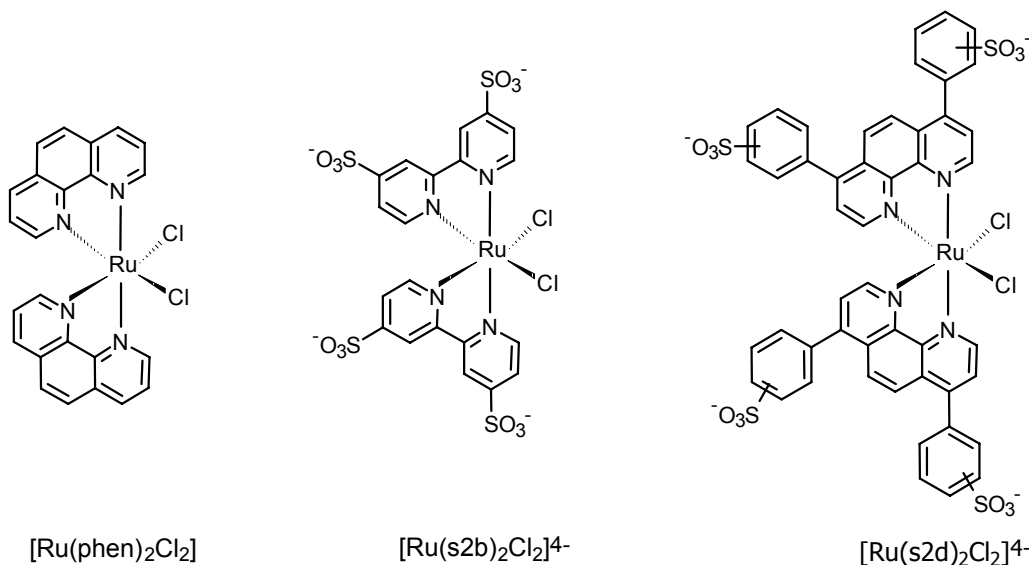
a) Apartado 5.2.1. (Optodo de pH).



#### 4.1.2. BISQUELATO COMPLEJOS DE Ru(II).

Los ligandos auxiliares que quelatan el metal se introducen en el ión complejo por calentamiento a reflujo de los mismos con tricloruro de rutenio en presencia de cloruro de litio, el cual evita que el proceso evolucione hasta la formación del trisquelatocomplejo homoléptico.<sup>148</sup> En la *Parte experimental y Discusión de resultados* del optodo de pH se describe la preparación de los bisquelatocomplejos a partir de los cuales se han sintetizado tanto las sondas

para pH, como los complejos heterolépticos de Ru(II) que han sido evaluados en presencia de detergentes.



La inestabilidad en disolventes nucleófilos que muestran los dicloro-bisquelatocomplejos de Ru(II), unida a la escasa solubilidad que presentan los biscomplejos neutros, impiden la caracterización de los mismos por RMN. Por ello, únicamente se confirmó su pureza por CCF, ya que estos compuestos, al contrario que los correspondientes trisquelatocomplejos homolépticos que pueden formarse como subproducto de reacción, no emiten luz al ser irradiados a 366 nm.

#### 4.1.3. COMPLEJOS HETEROLÉPTICOS DE Ru(II) CON dppz.

En anteriores capítulos de esta Memoria se ha descrito de forma general la síntesis de los complejos heterolépticos de Ru(II) (*Resultados y discusión*, *Optodo de pH*), haciendo especial hincapié en la importancia de la purificación de estos indicadores, dada la alta sensibilidad de los métodos espectroscópicos con los que



van a ser posteriormente evaluados. A continuación se discuten las modificaciones introducidas en los protocolos generales para preparar los indicadores posteriormente evaluados como potenciales sondas para detergentes.

**A) [Bis(1,10-fenantrolina)(dipirido[3,2-a:2',3'-c]fenazina)]rutenio(II),  
[Ru(phen)<sub>2</sub>(dppz)]<sup>2+</sup>**

La síntesis de este complejo heteroléptico de Ru(II) aparece descrita en la bibliografía,<sup>185</sup> por lo que en su preparación se siguió dicho protocolo (ver *Parte Experimental*, apartado 5.2.3.). En una primera etapa, se hace reaccionar la *fenantrolinaquinona*, cuya síntesis se ha discutido anteriormente, con el correspondiente bisquelatocomplejo de partida. El aislamiento del producto del medio hidroalcohólico de reacción se consigue por intercambio del anión cloruro, con el que el complejo es soluble en el disolvente, por hexafluorofosfato, provocando así la precipitación del complejo quinónico en el crudo de reacción. En este caso, la purificación del sólido obtenido ([Ru(phen)<sub>2</sub>(pq)](PF<sub>6</sub>)<sub>2</sub>) (pq: 5,6-dioxo-1,10-fenantrolina) es relativamente sencilla, dado que los dos reactivos de partida son neutros y, por tanto, el producto precipitado no presenta impurezas observables por CCF. A pesar de ello, se llevó a cabo una reprecipitación del mismo de acetonitrilo/éter con el fin de asegurar su pureza.

Una vez sintetizado el complejo precursor, el ligando objetivo *dppz* se obtuvo por condensación de *o-fenilendiamina* con la *fenantrolinaquinona* quelatada al rutenio, conduciendo al indicador deseado ([Ru(phen)<sub>2</sub>(dppz)](PF<sub>6</sub>)<sub>2</sub>) con un alto rendimiento de reacción. La facilidad de autorreacción de las  $\alpha$ -diaminas aromáticas primarias para formar el correspondiente anillo de *fenazina* hace que sea necesaria la recristalización del reactivo de partida como paso previo a su condensación con la quinona (apartado 5.2.3., *Parte experimental*).

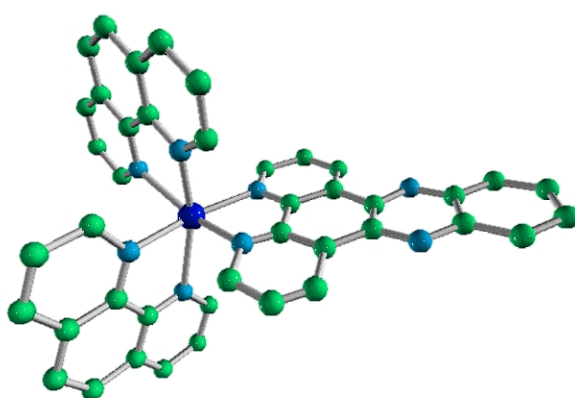
La banda más significativa del espectro **IR** del complejo [Ru(phen)<sub>2</sub>(pq)](PF<sub>6</sub>)<sub>2</sub> corresponde a la tensión de enlace característica del grupo carbonilo (1686 cm<sup>-1</sup>), banda que desaparece tras la formación del ligando *dppz*.

A pesar de la simetría de la molécula, en los espectros de <sup>1</sup>H-RMN de ambos complejos registrados en acetonitrilo deuterado, se observa que los

---

<sup>185</sup> Hiort, C., Lincoln, P. y Nordén, B., *J. Am. Chem. Soc.*, **1993**, 115, 3448.

protones de los anillos de fenantrolina más próximos a los ligandos *pq* y *dppz* (A) aparecen apantallados con respecto a los protones más lejanos (D), debido al efecto de anisotropía magnética que provocan las corrientes de anillo de ambos ligandos, cuya densidad electrónica es superior a la de los ligandos auxiliares.<sup>132</sup> Por otra parte, la extensa estructura aromática del ligando *dppz* conduce a una anisotropía magnética de anillo que provoca el importante desapantallamiento de los protones 4 y 7 del anillo con respecto al desplazamiento químico que éstos muestran en el ligando phen coordinado al átomo de Ru(II).



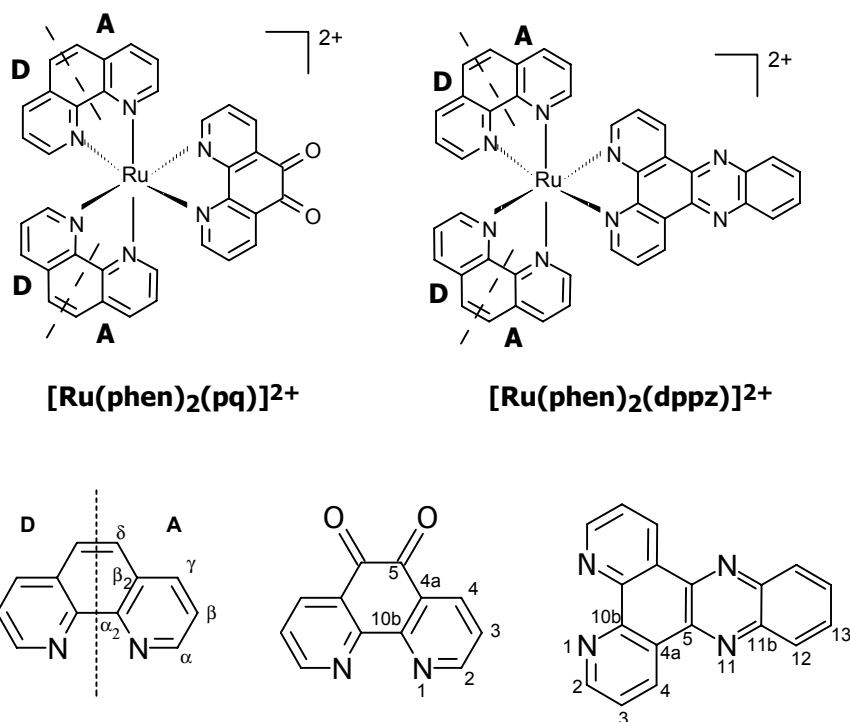
**Tabla 33.** Asignación de las señales que muestran en el espectro de  $^1\text{H-RMN}$  los complejos  $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{pq})](\text{PF}_6)_2$  y  $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{dppz})](\text{PF}_6)_2$  disueltos en acetonitrilo deuterado. Se recogen también en la tabla los desplazamientos químicos de los protones de los ligandos *pq* y phen libres (en  $\text{DMSO-d}_6$ ).

$^1\text{H-RMN}$ / ppm	H4,7	H2,9	H13,14	H12,15	H3,8			
$[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{pq})]^{2+}$ <sup>a</sup>	8.49	7.92	----	----	7.50			
$[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{dppz})]^{2+}$ <sup>a</sup>	9.59	8.25	8.44	8.11	7.69			
<i>pq</i> <sup>b</sup>	8.31	8.91	----	----	7.59			
$^1\text{H-RMN}$ / ppm	H $\gamma$		H $\alpha$		H $\delta$		H $\beta$	
	D	A	D	A	D	A	D	A
$[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{pq})]^{2+}$ <sup>a</sup>	8.71	8.60	8.35	7.92	8.29	8.27	7.83	7.61
$[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{dppz})]^{2+}$ <sup>a</sup>	8.64	8.63	8.13	8.05	8.28		7.76	7.65
phen <sup>b,c</sup>	8.61		9.26		7.88		8.12	

c)  $\text{CD}_3\text{CN}$ .

d)  $\text{DMSO-d}_6$ .

e) Ref. 130.



La señal a 176.4 ppm que se observa en el espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN del complejo quinónico, asignada al carbono carbonílico, desaparece tras la formación del ligando *dppz*, confirmando la pureza de este indicador. En ambos espectros se observa, asimismo, la duplicación de las señales propias de los ligandos auxiliares (*phen*), apantallándose las más próximas a los ligandos *pq* y *dppz* al igual que ocurría en el espectro de  $^1\text{H}$ -RMN. El desplazamiento químico de los carbonos de la *phen* en similar en ambos complejos, siendo los  $\alpha^A$  los únicos que se distinguen en los dos indicadores, apantallándose en mayor medida los más cercanos al ligando *dppz* ya que la anisotropía de anillo creada por éste es mucho mayor.

Tabla 34. Desplazamientos químicos de  $^{13}\text{C}$ -RMN de los complejos sintetizados y los ligandos libres.

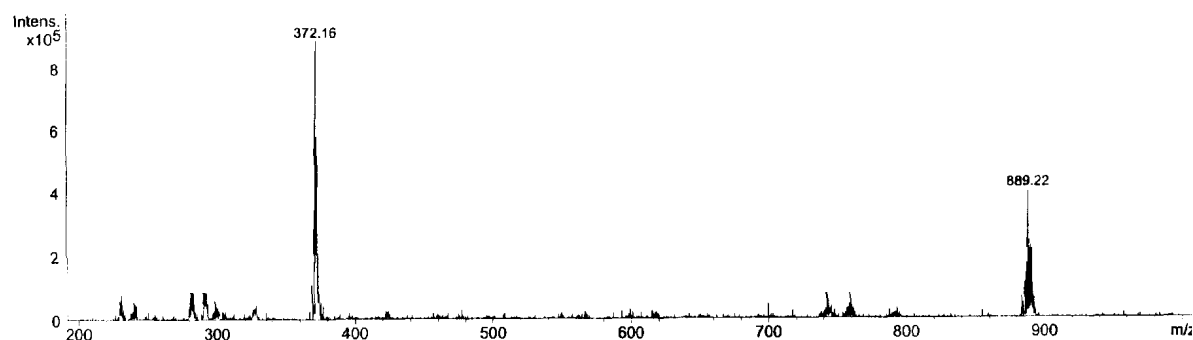
$^{13}\text{C}$ -RMN / ppm	C=O	C4	C10b	C13	C12	C5	C3	C2	C4a	C11b
$[\text{Ru}(\text{L})_2(\text{pq})]^{2+ \text{ a}}$	176.4	136.8	157.6	----	----	----	129.5	158.0	131.6	----
$[\text{Ru}(\text{L})_2\text{dppz}]^{2+ \text{ a}}$	----	137.9	151.8	132.0	130.6	141.0	128.2	155.2	134.4	148.8
<b>pq</b> <sup>a</sup>	177.8	135.7	152.4	----	----	----	125.3	154.4	129.1	----

$^{13}\text{C}$ -RMN / ppm	$\text{C}\gamma$		$\text{C}\alpha$		$\text{C}\delta$	$\text{C}\beta$		$\text{C}\alpha 2$		$\text{C}\beta 2$	
	D	A	D	A		D	A	D	A	D	A
$[\text{Ru}(\text{L})_2(\text{pq})]^{2+ \text{ a}}$	154.3	153.8	138.3	138.1	129.1	127.0	148.7	148.5	132.1	132.1	
$[\text{Ru}(\text{L})_2\text{dppz}]^{2+ \text{ a}}$	154.2	153.9	137.9	133.4	129.0	126.9	127.0	148.9	143.7	132.0	131.7
<b>L: phen</b> <sup>b,c</sup>	136.0		149.8		126.5	123.8	145.4		128.3		

- a)  $\text{CD}_3\text{CN}$ .  
b)  $\text{DMSO-d}_6$ .  
c) Ref. 131

Por último, el **microanálisis** del indicador  $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{dppz})](\text{PF}_6)_2$  y el resultado de la **espectrometría de masas** por ionización con electropulverización, realizada para este compuesto disuelto en metanol confirman asimismo la pureza del indicador. En este espectro, registrado con polaridad **positiva**, aparecen únicamente dos picos, correspondientes al ion molecular del complejo dicatiónico (372) y con pérdida de un anión  $\text{PF}_6^-$  (889).

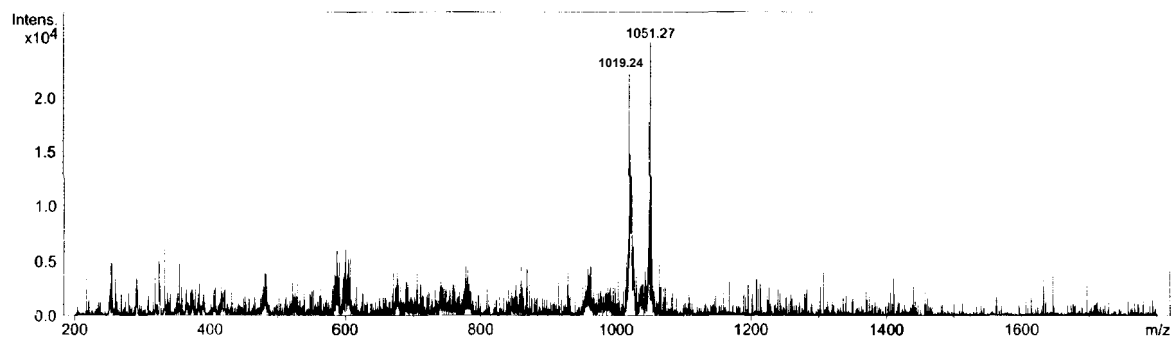


**B) [Bis(4,4'-disulfo-2,2'-bipiridina)(dipirido[3,2-a:2',3'-c]fenazina)]rutenio(II), [Ru(s2b)<sub>2</sub>(dppz)]<sup>2-</sup>.**

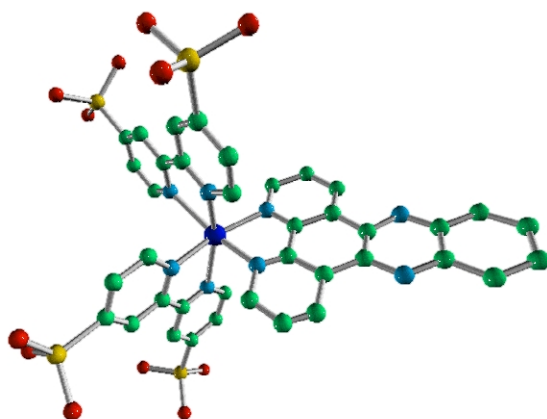
Los complejos de Ru(II) de naturaleza aniónica siguen procedimientos de síntesis similares a sus homólogos catiónicos, en los que generalmente se sustituye el disolvente y los métodos de purificación en función de las características estructurales de cada sonda. Los dos indicadores aniónicos se sintetizaron de forma paralela por calentamiento a reflujo del ligando *pq* con el correspondiente bisquelatocomplejo precursor. En este caso, el aislamiento del complejo con *pq* se llevó a cabo por precipitación en el crudo de reacción con una mezcla acetona/éter, ya que la carga global negativa que presenta el producto impide su precipitación con *hexafluorofosfato amónico*. A pesar de que el espectro de <sup>1</sup>H-RMN del complejo [Ru(s2b)<sub>2</sub>(pq)]<sup>2-</sup> no presentaba suficiente resolución como para poder asignar las señales correspondientes a cada protón, el compuesto no mostró indicios de contener impurezas por CCF, por lo que se decidió continuar con el siguiente paso de síntesis.

Finalmente, tras la condensación del complejo quinónico con *o-fenilendiamina*, se obtuvo el indicador [Ru(s2b)<sub>2</sub>(dppz)]<sup>2-</sup> aunque de nuevo el gran número de señales que aparecen como multipletes en su espectro de <sup>1</sup>H-RMN, junto con la baja resolución del mismo, que no permite observar los acoplamientos a largas distancias, impidieron la confirmación estructural del compuesto empleando esta técnica.

La **espectrometría de masas** con ionización por electropulverización (EM-ESI) es especialmente útil para confirmar la formación de este tipo de compuestos, cuyo espectro de resonancia resulta generalmente complicado. En el espectro de masas del complejo en metanol, registrado con polaridad **negativa**, aparecen los picos correspondientes al ion molecular del indicador con un catión litio (1019) y con una molécula de disolvente y un catión Li<sup>+</sup> (1051), probablemente procedente de la síntesis del bisquelatocomplejo de partida, que requiere la presencia de grandes cantidades de cloruro de litio para evitar la evolución del proceso con formación del trisquelatocomplejo.



Por último, los datos del **microanálisis** del sólido obtenido, en el que los valores experimentales se ajustan a lo esperado con la adición de moléculas de agua y metanol de cristalización, junto con la desaparición de la tensión del enlace carbonílico que aparece en el espectro **IR** del complejo precursor, corroboran la formación del complejo buscado.



**C) [Bis(4,7-di(sulfofenil)-1,10-fenantrolina)(dipirido[3,2-a:2',3'-c]fenazina)] rutenio(II), [Ru(s2d)<sub>2</sub>(dppz)]<sup>2-</sup>.**

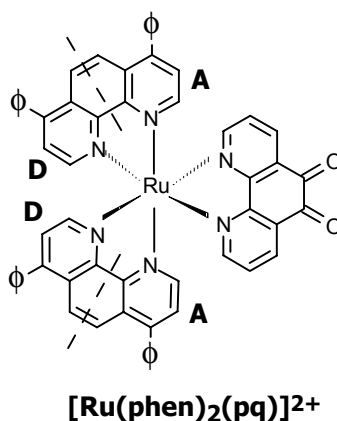
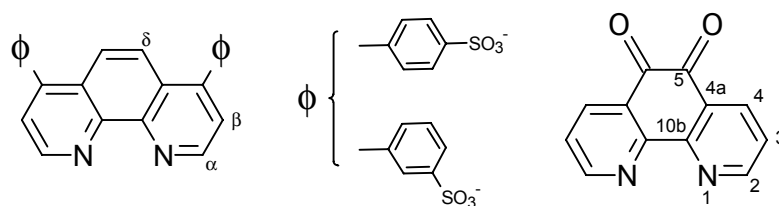
La preparación de este indicador resultó especialmente complicada debido a que el bisquelatocomplejo precursor arrastra una impureza difícil de eliminar, [Ru(s2d)<sub>3</sub>]<sup>4+</sup>, cuyo elevado rendimiento cuántico de emisión en agua constituye una importante interferencia para la posterior evaluación de la sonda en medio micelar.

El complejo [Ru(s2d)<sub>2</sub>(pq)]<sup>2-</sup> se purificó por cromatografía rápida en columna de LH-Sephadex, empleando una mezcla metanol/tolueno para su elución y comprobando por CCF la pureza del producto extraído. Con la polaridad de este eluyente no se consiguió un excelente rendimiento de aislamiento, pero sí el suficiente producto puro para su caracterización estructural.

**Tabla 35.** Desplazamientos químicos de <sup>1</sup>H-RMN del complejo [Ru(s2d)<sub>2</sub>(pq)]<sup>2-</sup>, disuelto en D<sub>2</sub>O. Se recoge también la asignación de las señales correspondientes al ligando libre pq y al complejo homólogo catiónico.

<sup>1</sup> H-RMN / ppm	H4,7	H2,9	H3,8
[Ru(phen) <sub>2</sub> (pq)] <sup>2+</sup> <sup>a</sup>	8.49	7.92	7.50
[Ru(s2d) <sub>2</sub> (pq)] <sup>2-</sup> <sup>b</sup>	8.74	7.70	7.95
pq <sup>c</sup>	8.31	8.91	7.59

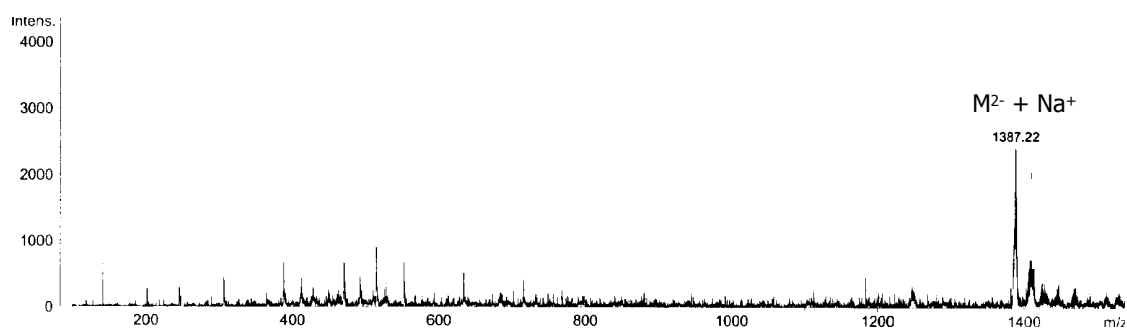
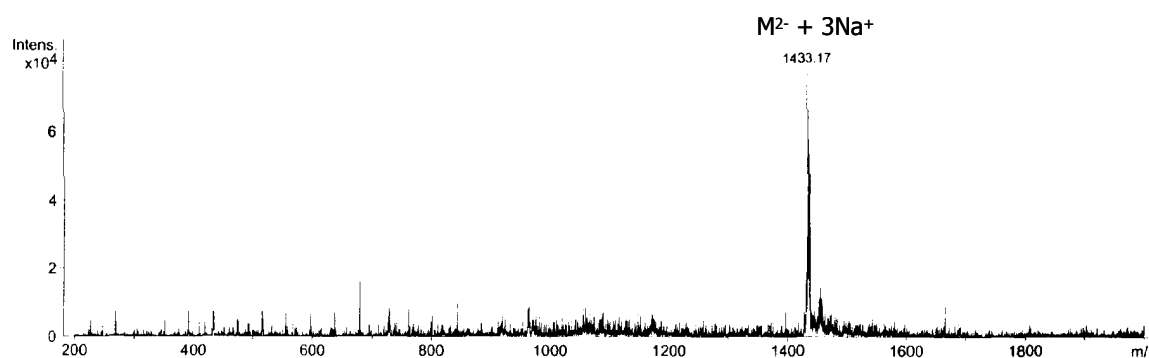
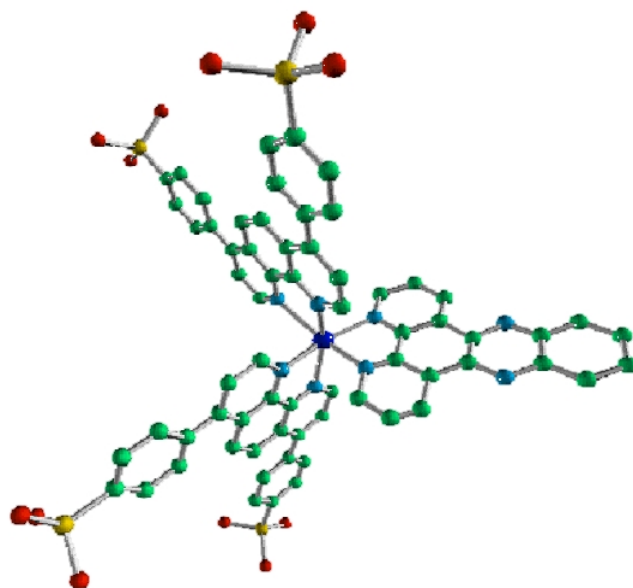
- a) CD<sub>3</sub>CN.  
b) D<sub>2</sub>O.  
c) DMSO-d<sub>6</sub>.



El ligando sulfonado que se utiliza como reactivo de partida para sintetizar este indicador se comercializa como mezcla inseparable de isómeros *m*- y *p*-, lo que complica la resolución de los espectros de **<sup>1</sup>H-RMN** de este tipo de complejos, donde se observa, además, una duplicación de las señales correspondientes a los dos ligandos s2d, atribuible de nuevo al efecto de la anisotropía magnética que provocan las corrientes de anillo. Por este motivo únicamente se han asignado en la tabla 35 las señales correspondientes al ligando pq, claramente diferenciadas en el espectro.

Aunque se llevaron a cabo numerosos intentos para eliminar la impureza arrastrada hasta el producto final, **[Ru(s2d)<sub>3</sub>]<sup>4-</sup>**, mediante cromatografía en columna empleando como fase sólida DEAE-Sephadex (dietilaminoetil, resina catiónica) y LH-Sephadex con distintas mezclas eluyentes, únicamente la cromatografía en capa fina preparativa proporcionó resultados positivos. Aún así, el espectro de **<sup>1</sup>H-RMN** de este complejo heteroléptico resulta imposible de resolver, debido a la gran cantidad de señales que aparecen como multipletes solapados y a la baja resolución del espectro, que impide observar los acoplamientos a larga distancia. Por otro lado, los datos del **microanálisis elemental** realizado del sólido extraído de la placa cromatográfica, únicamente pudieron ajustarse a los valores teóricos calculados para el complejo añadiendo grandes cantidades de gel de sílice y ácido acético, a pesar de haber filtrado convenientemente el disolvente con el que se realizó la extracción de la fase sólida. El ajuste del microanálisis puede realizarse considerando que la carga del anión complejo queda compensada con 2 iones sodio o, alternativamente, que los cuatro grupos sulfonatos poseen su propio contraión sodio y la carga del rutenio se compensa con dos cloruros. El resultado de la **espectrometría de masas** por ionización con electropulverización (ESI) no es concluyente ya que, a pesar de que el espectro muestra el pico correspondiente al ion molecular del complejo con un catión sodio (*m/z*) cuando se registró con polaridad negativa y con 3 Na<sup>+</sup> al registrarse con polaridad positiva (*m/z*<sup>+</sup>), es relativamente común que la muestra tome iones en el proceso de electropulverización.





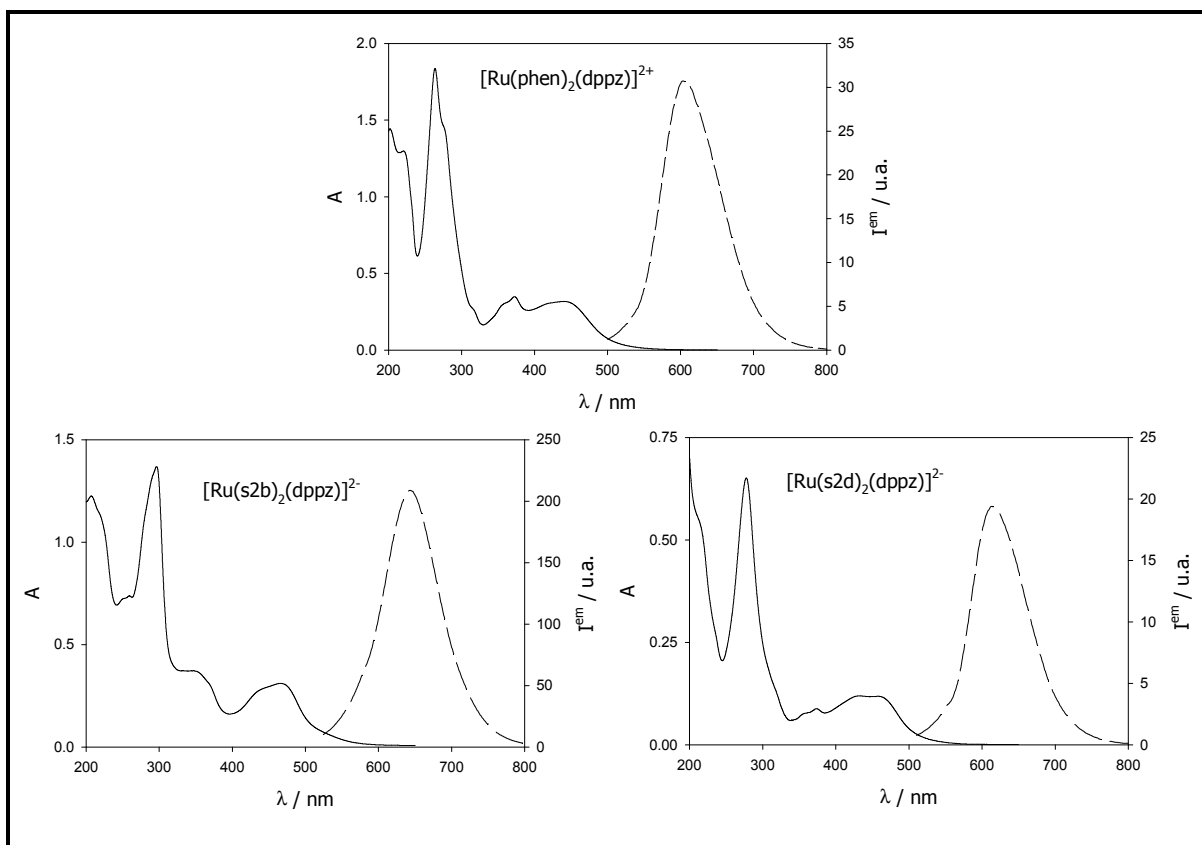
## 4.2. CARACTERIZACIÓN DE LOS INDICADORES LUMINISCENTES EN DISOLUCIÓN.

### 4.2.1. PARÁMETROS ESPECTROSCÓPICOS.

Tras la confirmación estructural de los nuevos complejos de Ru(II) sintetizados, se registraron espectros de absorción UV-VIS y emisión de luminiscencia de los tres indicadores en disolución acuosa y en *dimetilformamida* anhidra, con objeto de determinar las longitudes de onda máximas características de cada luminóforo en ambos disolventes y establecer la influencia del medio prótico sobre las propiedades espectroscópicas de los mismos.

Los **espectros de absorción** electrónica de estos indicadores (figura 77) muestran intensas bandas en la región ultravioleta (< 300 nm), propias de tránsitos  $\pi \rightarrow \pi^*$  intraligando. La conjugación aromática más extendida en el ligando *dppz* da lugar a que dichas transiciones electrónicas aparezcan desplazadas batocrómicamente para este compuesto (350-375 nm), respecto a las que se observan para los ligandos de tipo bipyridinas o fenantrolinas. La estructura vibracional de estas bandas, que caracteriza a los complejos con *dppz* (particularmente en disolventes polares apróticos, ya que en los próticos desaparece debido a la interacción soluto-disolvente, ampliamente descrita para compuestos aromáticos polinucleares),<sup>73,186</sup> se pierde en el indicador  $[\text{Ru}(\text{s2b})_2(\text{dppz})]^{2-}$  por solapamiento con bandas de absorción  $\pi \rightarrow \pi^*$  propias de la bipyridina sulfonada.<sup>72</sup> Asimismo, se observa en todos ellos las bandas de transferencia de carga metal-ligando ( $d \rightarrow \pi^*$ , MLCT) responsables del color rojo-anaranjado que exhiben estos complejos. El efecto -K de los grupos sulfonato sobre los anillos aromáticos se traduce en la estabilización de sus orbitales  $\pi^*$ , lo que da lugar a un desplazamiento batocrómico de los máximos MLCT observados en los complejos sulfonados. Este efecto es mucho más acusado en el ligando s2b que en el s2d, debido al alejamiento del grupo electroatractor de los nitrógenos heterocíclicos quelatados (figura 77, tabla 36).

<sup>186</sup> Rao, C. N. R., *Espectroscopía Ultravioleta y Visible*, Alhambra, Madrid, 1970; pp. 25 y 266.



**Figura 77.** Espectros de absorción (—) y emisión (- -) de las tres sondas para detergentes sintetizadas, en disoluciones acuosas termostalizadas (25.0 °C) y equilibradas al aire (20, 15 y 5 μM, para los complejos con ligandos phen, s2b y s2d, respectivamente).

La excitación de los luminóforos en el máximo de la transición MLCT que todos ellos muestran en el visible da lugar a **espectros de emisión** con una única banda ( $\pi^* \rightarrow d$ ), sin estructura fina, cuyo máximo se sitúa a valores de longitud de onda superiores en los dos complejos provistos de grupos  $\text{SO}_3^-$  en la periferia. El desplazamiento hacia el rojo de la emisión del indicador con s2b con respecto al s2d confirma la mayor estabilización del orbital  $\pi^*$  por efecto electroatractor de los grupos sulfonato en el primero. La dependencia de los máximos de emisión con el medio se debe a la estructura dipolar del estado excitado emisor, que se estabiliza por solvatación en mayor o menor grado en función del disolvente.

Los **rendimientos cuánticos de emisión** de los complejos sintetizados (tabla 36), indican la débil luminiscencia que muestran estos indicadores en disolución acuosa, donde las moléculas de agua desactivan eficazmente el estado excitado emisor (apartado 2.1.2., *Antecedentes, Optodo de detergentes*).<sup>183</sup> En

dimetilformamida anhidra, sin embargo, la emisión de luz se incrementa considerablemente en todos los casos, aspecto deseable teniendo en cuenta que estas sondas deben ser sensibles a los cambios en el entorno provocados por la presencia de surfactantes en el medio.

**Tabla 36.** Principales parámetros fotofísicos de los tres luminóforos sintetizados con un ligando *dipiridofenazina*, en agua y dimetilformamida anhidra.

Indicador	D	$\lambda_{\text{abs}}^{\text{máx}} / \text{nm} (\epsilon / \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1})^{\text{a}}$	$\lambda_{\text{em}}^{\text{máx}} / \text{nm}^{\text{b}}$	$\Phi^{\text{c}}$
[Ru(phen) <sub>2</sub> (dppz)] <sup>2+</sup>	H <sub>2</sub> O	221 (65600), 263 (90400), 276(h), 316(h), 355 (h), 372 (18000), 423 (h), 439 (16600)	603 <sup>d</sup>	≤ 0.002 <sup>d</sup>
	DMF	318(h), 356(h), 371, 426(h), 445	641	0.022
[Ru(s2b) <sub>2</sub> (dppz)] <sup>2-</sup>	H <sub>2</sub> O	206 (78300), 259 (46300), 296 (84500), 349 (22700), 439(h), 467 (18900)	644	0.008
	DMF	296, 357(h), 432 (h), 461	650	0.020
[Ru(s2d) <sub>2</sub> (dppz)] <sup>2-</sup>	H <sub>2</sub> O	232 (h), 277 (119500), 311(h), 360(h), 374 (14800), 432 (20000), 456 (h)	613	0.003
	DMF	282, 320(h), 357(h), 372, 434, 464	640	0.022

a) ± 1 nm, 5 % error estimado en  $\epsilon$  (n = 3), h: hombro.

b) ± 1 nm, valores sin corregir por la respuesta instrumental.

c) 25.0 °C, desoxigenando con argón. Típicamente, 5 % de error (n = 5).

d) Ver texto.

En la bibliografía se ha descrito que el complejo [Ru(phen)<sub>2</sub>(dppz)]<sup>2+</sup> no muestra ninguna emisión en agua.<sup>180,187</sup> Sin embargo, en el espectro de emisión de este complejo en dicho disolvente, recogido con la máxima apertura de rendijas que permite el equipo (15/20, respectivamente, en los canales de excitación y emisión), se ha observado una débil emisión en torno a 600 nm. Esto puede atribuirse a la presencia de una pequeña impureza de [Ru(phen)<sub>3</sub>]<sup>2+</sup>, subproducto de reacción en la síntesis del complejo con *dppz*, cuyo relativamente elevado rendimiento cuántico en agua permite que se observe su luminiscencia a pesar de encontrarse en concentración mínima. No obstante, tanto el microanálisis como el espectro de masas por ionización con electropulverización realizado de este compuesto, no detectan la presencia de dicha impureza (m/z = 321, ver apartado 4.1.3. de esta *Discusión de resultados*). Por otro lado, un intento por registrar la cinética de desactivación de la luminiscencia del indicador

$[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{dppz})]^{2+}$  en agua condujo a resultados negativos, ya que la intensidad de emisión procedente de la disolución es insuficiente para poder recoger la curva de extinción. Esta técnica, de alta sensibilidad, permite detectar impurezas luminiscentes en muy baja concentración y, dado que el complejo  $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$  exhibe un  $\tau$  de 530 ns en agua,<sup>188</sup> se estableció que la sonda sintetizada poseía el suficiente grado de pureza como para continuar su estudio en medio micelar.

#### 4.2.2. INFLUENCIA DE LA CONCENTRACIÓN EN LAS PROPIEDADES ÓPTICAS DE LOS INDICADORES.

Con objeto de confirmar la ausencia de fenómenos de autoasociación del indicador en disolución acuosa para comparar con los resultados de los experimentos realizados en presencia de tensioagentes, se registraron los espectros de absorción y emisión de los complejos de Ru(II) en concentración creciente de indicador. A pesar de la repulsión electrostática que tiene lugar entre moléculas de igual carga, es posible que se produzca el apilamiento de ligandos *dppz* entre distintas moléculas de indicador como consecuencia de interacciones hidrofóbicas que se establezcan favorecidas por la extensa estructura aromática de este ligando. Esta agregación impediría la aproximación de las moléculas de agua hasta los nitrógenos heterocíclicos de la *fenazina*, observándose un aumento inespecífico de la emisión no atribuible a la presencia de agentes surfactantes en el medio. Es fundamental, por tanto, asegurar que no se produce autoasociación en las condiciones en las que se realizaron los estudios con detergentes, ya que esto constituiría una importante fuente de error para el futuro optosensor.

En la figura 78 se recoge el aumento lineal de la absorbancia en el máximo de la banda MLCT de los tres indicadores preparados, a medida que se incrementa la concentración de los mismos, no observándose por tanto desviaciones de la *Ley de Lambert-Beer* a concentraciones inferiores a  $10^{-4}$  M. La

---

<sup>187</sup> Hartshorn, R. M. y Barton, J. K., *J. Am. Chem. Soc.*, **1992**, *114*, 5919.

emisión de los complejos, por el contrario, se muestra sensible a la concentración de luminóforo en el mismo intervalo, presentando una desviación de la linealidad para concentraciones superiores a  $\sim 10 \mu\text{M}$ , donde la emisión del complejo es menor de lo esperado. La variación observada, sin embargo, se debe simplemente al denominado *efecto de filtro interno*, fenómeno según el cual la presencia de gran cantidad de moléculas absorbentes en la disolución evita que todas ellas puedan ser excitadas por la fuente de luz y, en consecuencia, solo una parte de los luminóforos muestra su emisión.<sup>10</sup> Está perfectamente descrito en la bibliografía que la variación de la luminiscencia con la concentración del emisor obedece a la siguiente expresión:

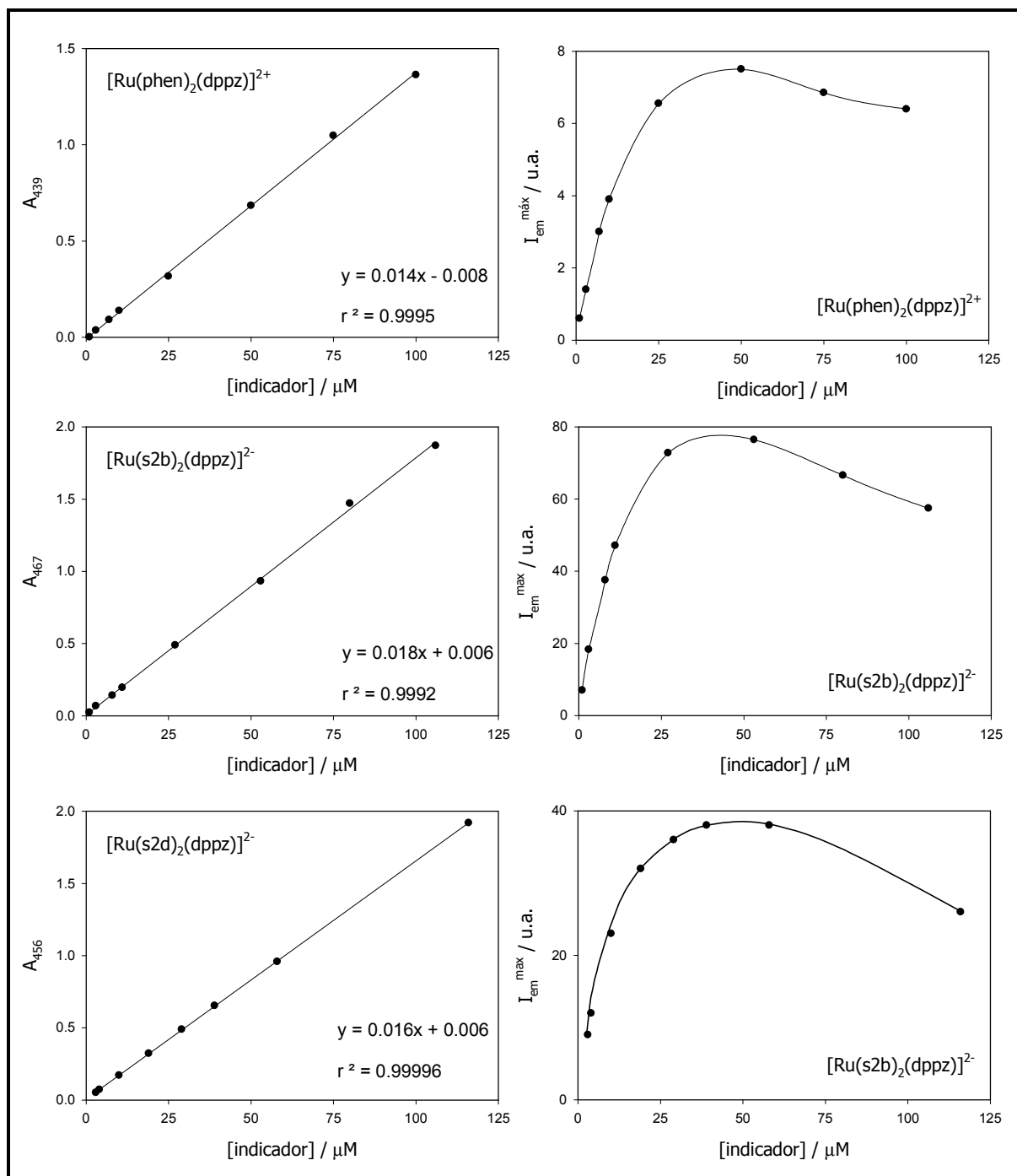
$$I_{\lambda} = K\varepsilon_{\lambda} \left( \chi - \frac{\chi^2}{2!} + \frac{\chi^3}{3!} - \dots \right) \Phi_{em} \quad (35)$$

donde  $K$  es una constante del instrumento utilizado,  $\varepsilon$  es el coeficiente de absorción molar a la  $\lambda$  de excitación,  $\Phi$  es el rendimiento cuántico de emisión y  $\chi$  es la concentración de luminóforo. Tal expresión sólo es lineal cuando la concentración de éste es suficientemente baja.

El efecto observado **no** es atribuible a una posible **agregación** de la sonda, ya que en ese caso la emisión aumentaría por encima de lo esperado, debido a la protección de los átomos de nitrógeno del ligando fenazina, como así se ha detectado para complejos de Ru(II) con dibenzo[h,j]dipirido[3,2-a:2',3'-c]fenazina, *ddz*.<sup>189</sup>

<sup>188</sup> Pyle, A. M., Rehmann, J. P., Meshoyrer, R., Kumar, C. V., Turro, N. J., y Barton, J. K., *J. Am. Chem. Soc.*, **1989**, *111*, 3051.

<sup>189</sup> Jiménez, E., *Tesis Doctoral*, Universidad Complutense de Madrid, en curso.



**Figura 78.** Variación, en función de la concentración, de la absorbancia en el máximo que los tres indicadores muestran en el visible (MLCT) en disolución acuosa. Se muestra, asimismo, la variación de la intensidad de luminiscencia registrada en sus respectivos máximos cuando los complejos se excitan en el máximo de su banda MLCT (disoluciones equilibradas al aire, a 25.0 °C).

### 4.3. CARACTERIZACIÓN DE LOS INDICADORES EN MEDIO MICELAR.

Los estudios realizados con distintos complejos luminiscentes de Ru(II) en medio micelar revelan que los cambios observados en sus propiedades ópticas se deben a las interacciones electrostáticas (atracción/repulsión) que se establecen entre la sonda y el surfactante y a la hidrofobicidad de los ligandos aromáticos, que facilitan la incursión de los complejos iónicos en el interior de las micelas.<sup>175</sup> Los hábitos de las curvas obtenidas al representar la emisión de estos complejos frente a la concentración del agente tensioactivo están determinados por la combinación de dichas interacciones.<sup>190</sup> A estos dos efectos se une la presencia en la muestra de oxígeno molecular, el cual desactiva con distinta eficacia la emisión del indicador libre y unido al surfactante.

Con objeto de establecer el comportamiento en medio microheterogéneo de las nuevas sondas sintetizadas, una vez caracterizadas en disolución, se prepararon disoluciones de las mismas en las que se mantuvo constante la concentración del complejo y se varió la cantidad de tensioagente añadido a la muestra hasta superar su concentración micelar crítica (ver apartado 5.3.1., *Parte Experimental*). A continuación se describe el resultado del estudio realizado por medidas de absorbancia e intensidad de luminiscencia con los tres indicadores en presencia de surfactantes de distinta naturaleza.

#### 4.3.1. SURFACTANTE ANIÓNICO: SDS.

Se escogió el *docecilsulfato sódico* (*laurilsulfato sódico* o SDS,  $n\text{-C}_{12}\text{H}_{25}\text{OSO}_3^- \text{Na}^+$ ) como representante de los tensioagentes aniónicos, presentes en la mayoría de los productos de limpieza y cosméticos. Este compuesto está formado por una larga cadena hidrocarbonada terminada en un grupo sulfato, el cual confiere a la molécula la estructura anfifílica necesaria para provocar la formación de micelas a partir de una concentración de surfactante dada (c.m.c = 8 mM).<sup>157</sup>

A pesar de que la hidrofobicidad de los ligandos permite que las sondas iónicas puedan introducirse (al menos parcialmente) en el interior de las micelas, son las uniones electrostáticas las que facilitan el acercamiento indicador-

---

<sup>190</sup> García-Fresnadillo, D. y Orellana, G., *Helv. Chim. Acta*, **2001** (en prensa).



surfactante y, por tanto, la interacción de complejos de Ru(II) con SDS estará favorecida cuando los luminóforos sean catiónicos.

- **[Ru(phen)<sub>2</sub>(dppz)]<sup>2+</sup>**

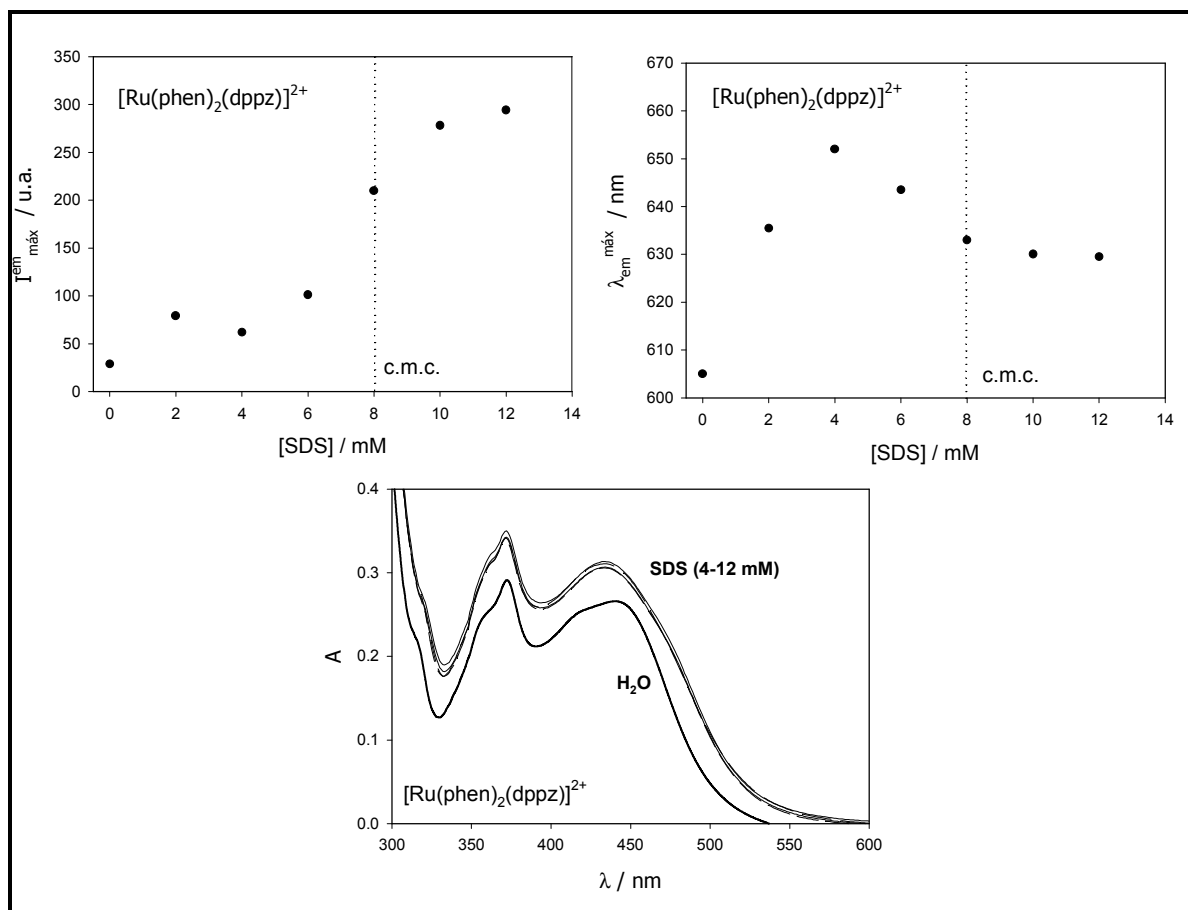
En las disoluciones preparadas con este complejo de Ru(II) catiónico en presencia de SDS se observa precipitación de la sonda para las concentraciones de surfactante por debajo de su concentración micelar crítica ensayadas (2 y 4 mM). Cuando la cantidad de detergente no es suficiente para que sus moléculas formen micelas se produce la eficaz formación de pares iónicos entre el dodecilsulfato y la sonda. El gran volumen del dodecilsulfato con respecto al cloruro inicial disminuye enormemente la solubilidad del compuesto de coordinación en el medio acuoso. La precipitación del indicador a valores bajos de concentración de SDS se ha observado también con el complejo [Ru(bpy)<sub>3</sub>]<sup>2+</sup><sup>191</sup> y [Ru(bpy)<sub>2</sub>(dppz)]<sup>2+</sup>, este último únicamente para [SDS] < 0.5 mM.<sup>177</sup> A medida que aumenta la concentración del tensioagente se produce la asociación de sus moléculas formando micelas, impidiendo la formación de pares iónicos individuales con el indicador y, por tanto, evitando la precipitación del complejo. La atracción electrostática entre ambas moléculas facilita el acercamiento del indicador a las micelas y la eventual incorporación del ligando *dppz* en la cavidad hidrófoba creada por las mismas, protegiendo así a la molécula de la desactivación provocada por la presencia de moléculas de agua en el medio.

La variación de la luminiscencia (intensidad y  $\lambda^{\text{em}_{\text{max}}}$ ) del complejo [Ru(phen)<sub>2</sub>(dppz)]<sup>2+</sup> con la concentración de SDS (figura 79) parece indicar dicho comportamiento, ya que se advierte un aumento considerable de la luminiscencia del indicador por encima de la c.m.c. del detergente. Además, el aumento de la emisión del luminóforo a concentraciones inferiores a la c.m.c. teórica del surfactante en agua indica que se forman agregados de complejo rodeados de moléculas de SDS, que actúan protegiendo del efecto del agua al indicador y, por tanto, aumentando su luminiscencia.<sup>175a</sup> La emisión recogida en la región inicial en la que se produce la precipitación de la sonda es muy variable, debido al estado metaestable de la disolución que contiene ambos componentes. Por otro lado, en los espectros UV-VIS registrados se observa un desplazamiento

---

<sup>191</sup> Baxendale, J. H. y Rodgers, M. A. J., *J. Phys. Chem.*, **1982**, 86, 4906.

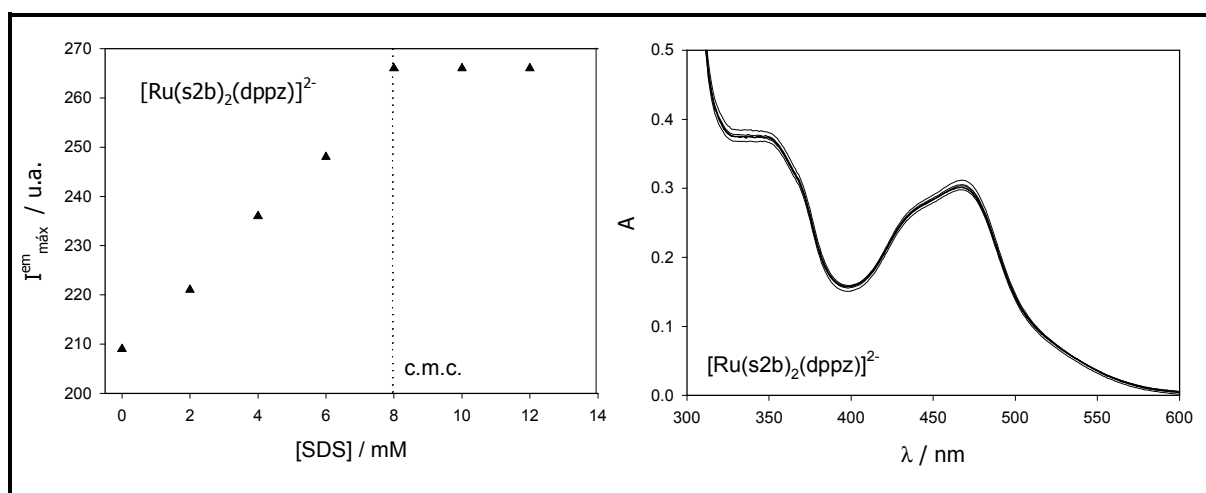
hipercrómico de las bandas de absorción en medio microheterogéneo, atribuible probablemente a un efecto de difusión de luz originado por las moléculas de SDS presentes en la disolución, no corregido a pesar de añadir igual cantidad de surfactante disuelto en agua en la cubeta de referencia. El aumento de la absorbancia no puede atribuirse a un cambio en la hidrofobicidad del medio, ya que esto originaría el efecto contrario (menor absorción), así como cambios en la estructura fina de las bandas  $\pi \rightarrow \pi^*$  de la molécula, como se ha observado, por ejemplo, tras introducirse esta sonda en la cavidad hidrófoba de la doble hélice de DNA.<sup>181</sup>



**Figura 79.** Intensidad (izquierda) y longitud de onda máxima de luminiscencia (derecha) mostrada por el indicador  $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{dppz})]^{2+}$  ( $25 \mu\text{M}$ ) en presencia de dodecilsulfato sódico (SDS), tras ser excitado en el máximo del MLCT. Se muestra también la variación que se produce en la región visible del espectro de absorción de la sonda. La línea punteada marca la concentración micelar crítica del surfactante (8 mM). Las medidas se realizaron con disoluciones acuosas equilibradas al aire y termostatizadas a  $25.0 \text{ }^\circ\text{C}$ .

- **[Ru(s2b)<sub>2</sub>(dppz)]<sup>2-</sup>**

Al sustituir los dos ligandos fenantrolina por bipyridinas sulfonadas el complejo adopta una carga formal negativa que impide la unión electrostática de la sonda al surfactante aniónico. Esto dificulta el acercamiento del indicador a las micelas y, por tanto, la intercalación del ligando *dppz* hacia el interior de las mismas, por lo que no se advierten cambios significativos en el espectro de absorción ni en la longitud de onda máxima de emisión del luminóforo con la concentración creciente de surfactante. Sin embargo, el registro de la emisión de luz procedente de estas disoluciones revela un ligero aumento (aprox. 25%) de la luminiscencia de esta sonda a medida que se incrementa la cantidad de SDS presente en el medio (figura 80). Esto indica que las repulsiones electrostáticas se ven en cierta medida compensadas por las interacciones hidrofóbicas que se producen entre el extenso ligando aromático del complejo (*dppz*) y la larga cola hidrocarbonada del surfactante, dando lugar a agregados premicelares que pueden provocar un aumento en la constante dieléctrica, viscosidad y rigidez del medio, con la consecuente reducción de la desactivación no radiativa por relajación vibracional de la sonda e induciendo, por tanto, el aumento de la emisión del luminóforo. Tras la formación de micelas de SDS, ya no se incrementa la luminiscencia del complejo [Ru(s2b)<sub>2</sub>(dppz)]<sup>2-</sup>.

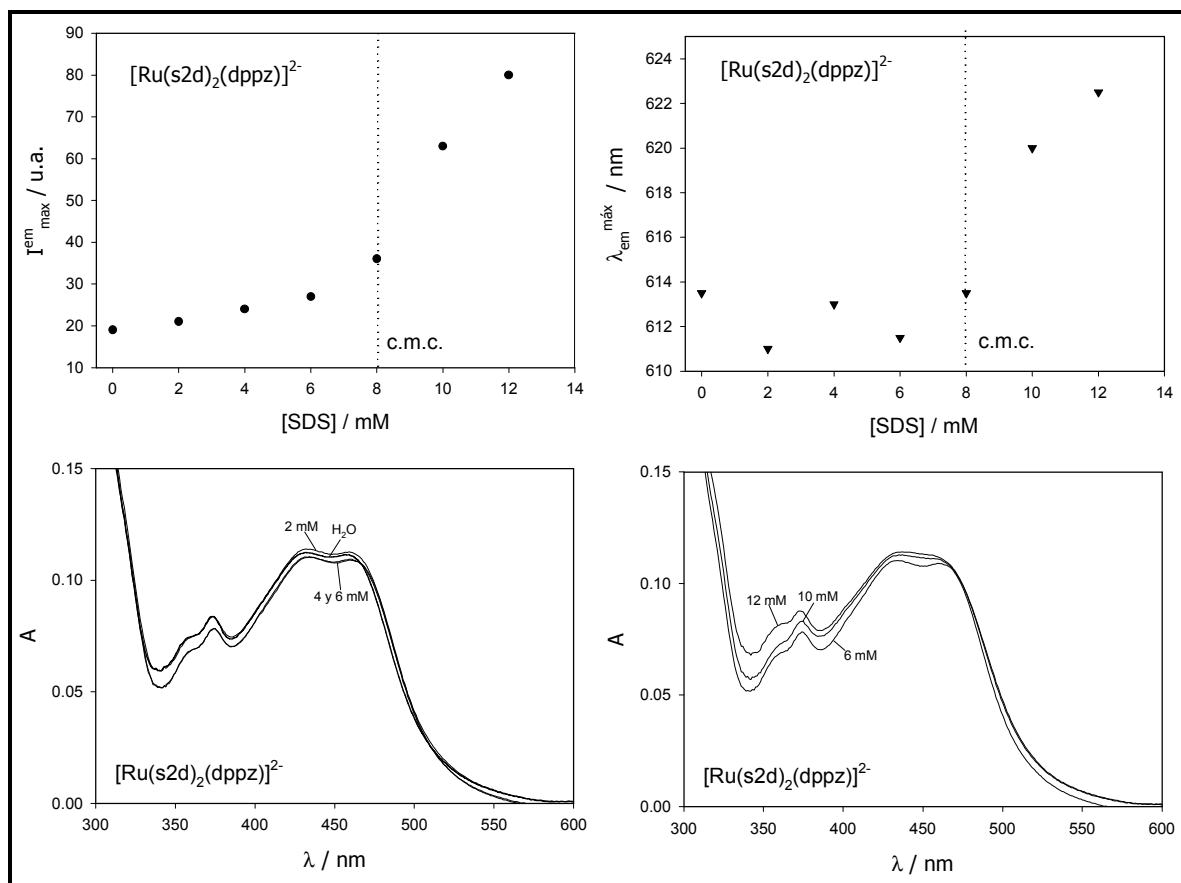


**Figura 80.** Efecto provocado por el surfactante SDS en las propiedades espectroscópicas del complejo [Ru(s2b)<sub>2</sub>(dppz)]<sup>2-</sup>. La concentración de luminóforo se mantuvo constante durante el experimento (18  $\mu\text{M}$ ), incrementando en cada una de las disoluciones evaluadas (termostatizadas a 25.0 °C y equilibradas al aire) la concentración del detergente. No se observaron cambios en la  $\lambda_{\text{em}}^{\text{máx}}$ .

- **[Ru(s2d)<sub>2</sub>(dppz)]<sup>2-</sup>**

A pesar de la carga global negativa que exhibe este complejo de Ru(II), su comportamiento en medio micelar no es comparable al del indicador aniónico anteriormente descrito, debido a que al estar soportados los grupos sulfonato sobre ligandos más voluminosos se produce una gran separación de cargas entre el centro catiónico metálico y los anillos sulfonados. Esto permite el acercamiento de la sonda a las micelas gracias a la atracción electrostática que tiene lugar entre la cabeza polar aniónica de las mismas y el centro catiónico del complejo, interacción favorecida probablemente por la hidrofobicidad del ligando *dppz*.

Al contrario de lo que sucedía con el complejo [Ru(s2b)<sub>2</sub>(dppz)]<sup>2-</sup>, el incremento registrado en la emisión del indicador que contiene s2d es muy superior cuando se forman las micelas ya que en este caso el complejo es capaz de aproximar la región catiónica de su molécula a las cabezas polares de la micela, permitiendo la penetración del ligando *dppz* en la cavidad interna de la misma que protege así al complejo de la desactivación inducida por las moléculas de agua. El hecho de que el incremento observado en la emisión no se estabilice para concentraciones elevadas del detergente podría indicar cambios estructurales en la micela con el aumento de la concentración del surfactante.<sup>175c</sup> Para concentraciones por encima de la c.m.c, se observa asimismo un ligero aumento de la absorbancia de la sonda, acompañado de un desplazamiento hacia el rojo de la banda de emisión del complejo, lo que parece confirmar que el indicador [Ru(s2d)<sub>2</sub>(dppz)]<sup>2-</sup> consigue acceder al interior de la micela (figura 81).



**Figura 81.** Variación registrada en los espectros de absorción y emisión del complejo  $[\text{Ru}(\text{s2d})_2(\text{dppz})]^{2-}$  en disolución acuosa ( $8 \mu\text{M}$ ) cuando se expone el indicador a distintas concentraciones de un surfactante aniónico (SDS). Las medidas se realizaron con disoluciones acuosas equilibradas al aire y termostalizadas a  $25.0 \text{ }^\circ\text{C}$ .

### 4.3.2. SURFACTANTE CATIÓNICO: CTAB.

El estudio de la variación que se produce en las propiedades ópticas de los tres complejos de Ru(II) sintetizados por su interacción con detergentes catiónicos se realizó añadiendo a las disoluciones acuosas de los indicadores cantidades crecientes de *bromuro de hexadeciltrimetilamonio* (*cetiltrimetilamonio*, CTAB,  $n\text{-C}_{16}\text{H}_{33}\text{N}^+(\text{CH}_3)_3 \text{Br}$ ) hasta superar su concentración micelar crítica ( $\text{cmc} = 0.92 \text{ mM}$ ),<sup>157</sup> valor a partir del cual las moléculas de surfactante se encuentran en la disolución formando agregados micelares.

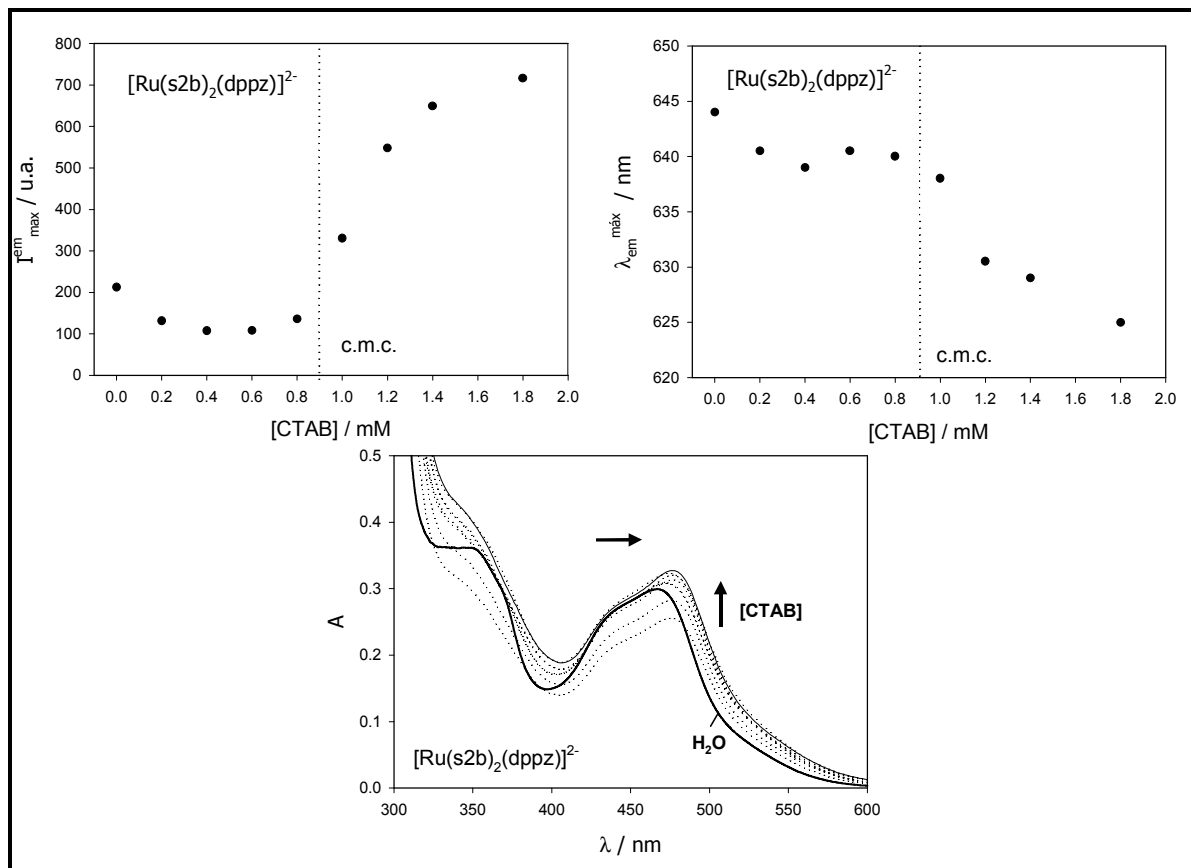
El complejo  $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{dppz})]^{2+}$  no muestra cambio alguno en sus espectros de absorción y emisión por la presencia de este tensioagente en

concentraciones comprendidas entre 0 y 1.4 mM. La naturaleza catiónica de ambas especies impide un acercamiento del indicador a las micelas. En este caso la hidrofobicidad del ligando principal no es capaz de competir con las fuertes repulsiones indicador-surfactante que se establecen, las cuales consiguen alejar al luminóforo de la cavidad generada por las cadenas apolares del detergente.

- **[Ru(s2b)<sub>2</sub>(dppz)]<sup>2-</sup>**

Al contrario que el complejo anterior, esta sonda aniónica interacciona fuertemente con el surfactante catiónico, como se deduce del cambio registrado tanto en su espectro de absorción como en su intensidad de luminiscencia con la presencia de moléculas de CTAB. A pequeñas concentraciones de este tensioagente (0.2 mM, figura 81), se observa una disminución importante en el coeficiente de absorción molar y un desplazamiento batocrómico de las bandas asignadas como tránsitos  $\pi \rightarrow \pi^*$  de los ligandos sulfonados y  $d \rightarrow \pi^*$  de transferencia de carga metal-ligando (MLCT), efecto acompañado de un descenso en la cantidad de luz emitida por la sonda, debido probablemente a la disminución observada en la absorción a la longitud de onda donde se excita el complejo. Por otra parte, los agregados premicelares sonda-surfactante que parecen formarse inicialmente por debajo de la c.m.c. generalmente no emiten, o bien, poseen un rendimiento cuántico de emisión inferior, debido a fenómenos de autodesactivación que se producen como consecuencia del apilamiento de las moléculas de indicador, lo que justificaría también el descenso de la luminiscencia observado.

A medida que aumenta la concentración del detergente se advierte un aumento en la absorbancia de dichas bandas hasta que se alcanza la c.m.c., valor a partir del cual apenas se aprecian cambios en el espectro de absorción. Además, con la formación de las micelas se produce un aumento significativo (7 veces) en la emisión del luminóforo por lo que se deduce que el ligando *dppz* de las moléculas de complejo consigue introducirse eficazmente en las micelas protegiendo sus nitrógenos heterocíclicos no quelatados de la desactivación por el agua (figura 82).

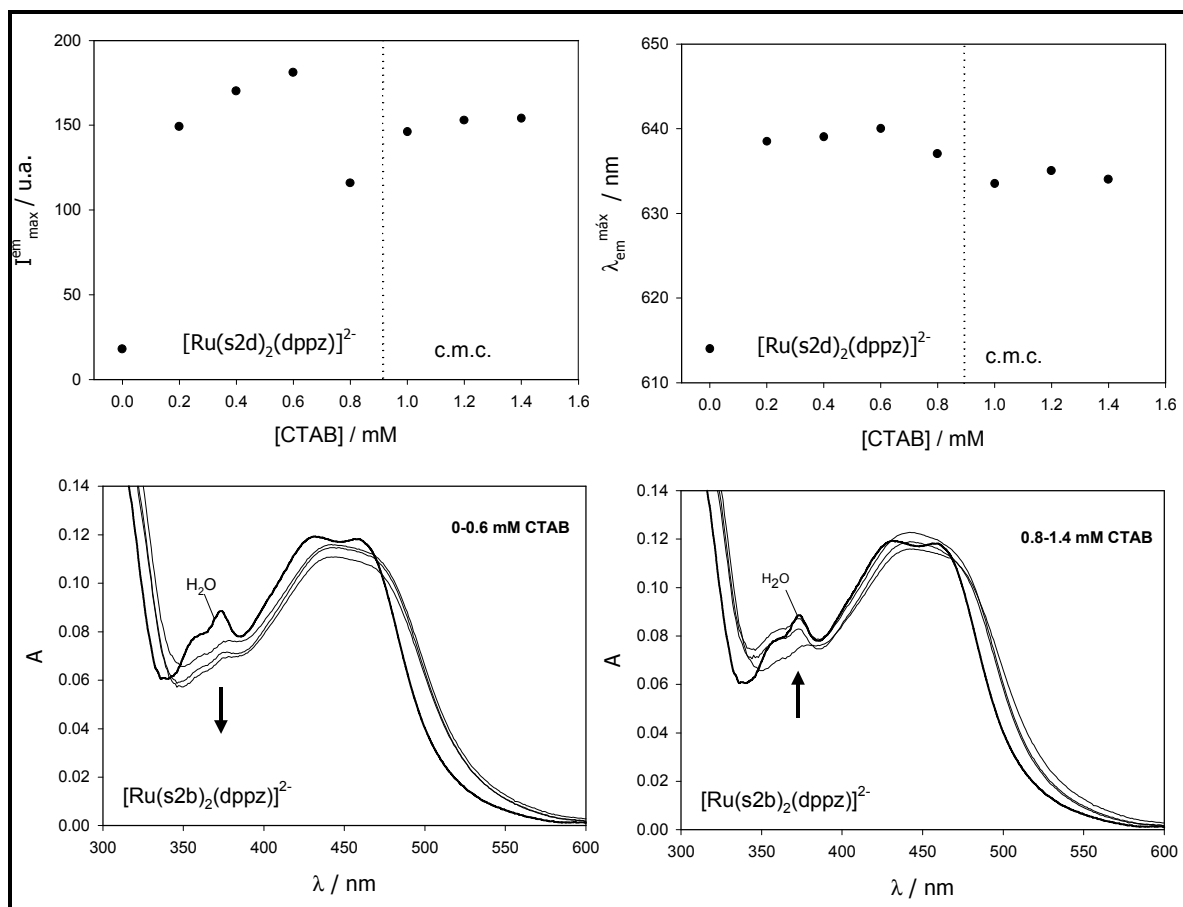


**Figura 82.** Intensidad máxima de luminiscencia y espectros de absorción del indicador  $[\text{Ru}(\text{s2b})_2(\text{dppz})]^{2-}$  en disolución acuosa equilibrada al aire ( $18 \mu\text{M}$ ,  $25.0 \text{ }^\circ\text{C}$ ) y en presencia de distintas cantidades de CTAB.

- **$[\text{Ru}(\text{s2d})_2(\text{dppz})]^{2-}$**

De nuevo, el coeficiente de absorción molar de las bandas que exhibe este indicador en la región visible del espectro electromagnético disminuye inicialmente cuando se añade este surfactante catiónico en concentración por debajo de su c.m.c. (figura 83), lo que indica que probablemente se forman agregados de complejo de Ru rodeados por moléculas de surfactante. Sin embargo, a diferencia de lo que ocurre con el complejo con bipyridinas sulfonadas como ligandos auxiliares, la formación de estos agregados conlleva un aumento importante en la emisión del compuesto (9 veces). Probablemente esto se deba a que el volumen estérico del contraión impide el acercamiento de las moléculas de agua hasta el luminóforo, ya que cuando la concentración de surfactante se aproxima a su c.m.c. se advierte una brusca caída en la emisión registrada para, a medida que se forman los agregados micelares recuperar dicha emisión. Esto

significa que con la formación de las micelas el complejo pierde momentáneamente su protección, pero la posterior atracción electrostática a las mismas facilita la inclusión del ligando *dppz* en su cavidad hidrófoba, con el consecuente aumento en la emisión. Paralelamente, la absorción del complejo, que al principio decrece con la formación de los agregados premicelares, aumenta a partir de la c.m.c. del surfactante, confirmando la intercalación del ligando hidrófobo en la micela (figura 83).

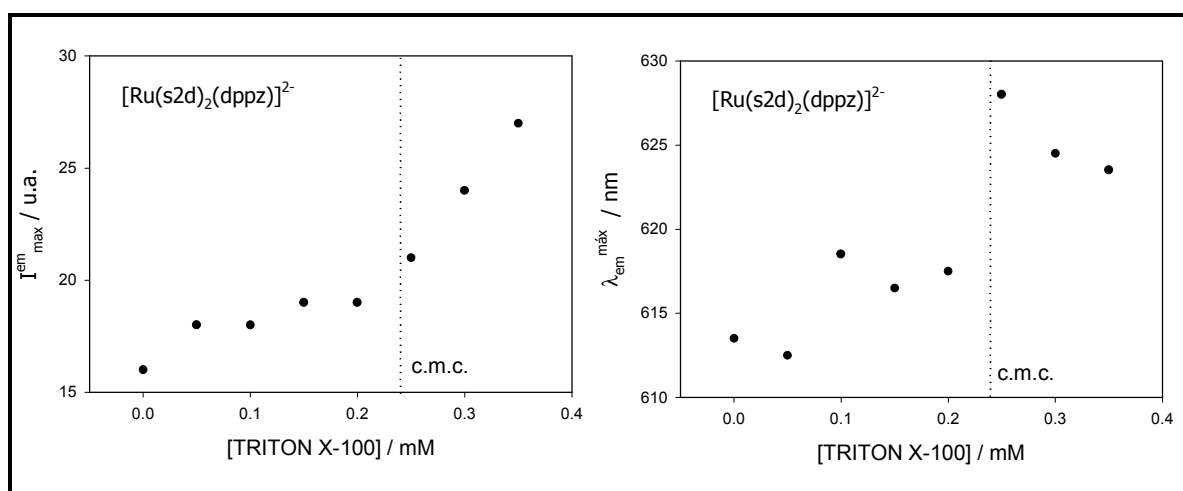


**Figura 83.** Variación de las propiedades ópticas del indicador  $[\text{Ru}(\text{s}2\text{b})_2(\text{dppz})]^{2-}$  en disolución acuosa equilibrada al aire (8  $\mu\text{M}$ ) al añadir al medio cantidades crecientes de *bromuro de cetiltrimetilamonio* (CTAB). Los espectros de emisión se registraron a 25.0 °C, excitando la sonda en el máximo de su banda MLCT.



### 4.3.3. SURFACTANTE NEUTRO: TRITON X-100.

El tensioagente elegido para comprobar si se produce interacción entre las sondas sintetizadas y un detergente sin carga fue el *octilfenoxi-polietoxietanol* (Triton X-100,  $(\text{CH}_3)_3\text{C}-\text{CH}_2-\text{C}(\text{CH}_2)_2-\text{C}_6\text{H}_4-\text{O}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{H}$ ,  $n = 9-10$ ). Las micelas que forma este surfactante poseen dos regiones distintas: (a) un corazón central relativamente exento de agua formado por los grupos fenilo y las cadenas alifáticas y (b) una región exterior parcialmente húmeda debido a la hidratación de los grupos etoxi polares.<sup>175c,e</sup> Los experimentos llevados a cabo registrando los espectros de emisión de los tres indicadores inicialmente en agua y, posteriormente, añadiendo cantidades crecientes del detergente hasta superar su cmc ( $0.24 \text{ mM}$ )<sup>157</sup> revelaron que la luminiscencia de los complejos  $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{dppz})]^{2+}$  y  $[\text{Ru}(\text{s2b})_2(\text{dppz})]^{2-}$  es insensible a la presencia de las moléculas del surfactante en el medio. Únicamente el indicador más voluminoso,  $[\text{Ru}(\text{s2d})_2(\text{dppz})]^{2-}$  muestra un ligero aumento en su emisión cuando se alcanza la c.m.c. del Triton X-100 (figura 84). En ausencia de interacciones electrostáticas sonda-detergente, la fortaleza de unión del indicador a la micela aumenta a medida que lo hace la hidrofobicidad de los ligandos quelatantes y, por tanto, sólo el complejo con los dos ligandos auxiliares de estructura aromática más extendida consigue aproximarse a la micela, aunque el pequeño incremento observado en su luminiscencia indica que con esta interacción no se consigue la eficaz intercalación del ligando *dppz* en el interior de la misma.



**Figura 84.** Intensidad máxima de emisión del complejo  $[\text{Ru}(\text{s2d})_2(\text{dppz})]^{2-}$  ( $8 \mu\text{M}$ ) en disoluciones acuosas, equilibradas al aire y termostatizadas a  $25.0 \text{ }^\circ\text{C}$ , con distintas cantidades de TRITON X-100.

#### 4.3.4. TIEMPO DE VIDA DE EMISIÓN DE LOS INDICADORES EN MEDIO MICELAR.

Finalmente, se ha registrado la cinética de desactivación de la luminiscencia de los indicadores en presencia de los tres detergentes evaluados, en concentración superior a su c.m.c., con objeto de conocer cómo varía el tiempo de vida de emisión de los indicadores en medio micelar. La baja intensidad de emisión que exhiben los tres luminóforos en ausencia de agentes surfactantes impidió la evaluación de los mismos en agua. Únicamente el complejo con bipyridinas sulfonadas,  $[\text{Ru}(\text{s2b})_2(\text{dppz})]^{2-}$ , permitió determinar su  $\tau$  en este disolvente, a pesar del bajo rendimiento cuántico de emisión que muestra también esta sonda cuando no está protegida de la desactivación por las moléculas de agua del medio (tabla 36).

La curva de extinción de la luminiscencia del indicador  $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{dppz})]^{2+}$  en presencia de SDS se ajustó necesariamente a una cinética biexponencial, lo que indica la presencia de dos especies emisoras en la disolución. Una de ellas, cuya contribución relativa no supera el 2% exhibe un tiempo de vida muy próximo al descrito en la bibliografía para el trisquelatocomplejo homoléptico  $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$  en disolución acuosa (530 ns).<sup>188</sup> La presencia de una pequeña cantidad de impureza de este complejo en la sonda con un ligando *dppz* justificaría la muy débil emisión recogida para este último en agua, cuando en la literatura se señala la ausencia de emisión del complejo en este medio. El segundo tiempo de vida encontrado corresponde probablemente a moléculas de indicador que han conseguido acceder al interior de las micelas de SDS, protegiéndose así de la desactivación provocada por las moléculas de disolvente (tabla 37).

Por su parte, el complejo  $[\text{Ru}(\text{s2b})_2(\text{dppz})]^{2-}$  mostró asimismo dos tiempos de vida de emisión en agua, siendo el minoritario el correspondiente, por comparación con datos bibliográficos, al  $[\text{Ru}(\text{s2b})_3]^{2-}$ .<sup>192</sup> El  $\tau$  asignado al complejo, muestra un ligero aumento en presencia de micelas de SDS debido, como se explicó en epígrafes anteriores, a que la hidrofobicidad del ligando *dppz* no consigue superar en este caso la repulsión electrónica que se genera al poseer el

---

<sup>192</sup> Anderson, S., Constable, E. C., Seddon, K. R., Turp, J. E., Baggott, J. E. y Pilling, M. J., *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, **1985**, 2247.

luminóforo y el surfactante la misma carga. Sin embargo, cuando el detergente añadido a la disolución es catiónico, la interacción electrostática permite el acercamiento de la sonda a las micelas provocando, con la inserción del ligando dppz en el interior de las mismas, un aumento significativo del tiempo de vida de emisión del complejo (94 a 250 ns, tabla 37). Por otra parte, además del  $\tau$  asignado a la impureza, en este medio se recoge un tiempo de vida más corto que corresponde probablemente a aquellas moléculas de indicador que no han conseguido acceder a la región más hidrófoba de la micela.

Por último, la cinética de extinción de la emisión del indicador  $[\text{Ru}(\text{s2d})_2(\text{dppz})]^{2-}$  requirió un ajuste triexponencial en presencia tanto del detergente aniónico como el catiónico. En ambos casos, excluyendo un tercer  $\tau$  (950 ns) atribuible a una pequeña cantidad de  $[\text{Ru}(\text{s2d})_3]^{4-}$  presente también en esta sonda, se observaron dos tiempos de vida de emisión cuyas contribuciones varían dependiendo de la carga de las micelas formadas en el medio. Así, el  $\tau$  mayoritario en disolución de SDS corresponde a la sonda libre, debido a que la repulsión electrostática sonda-detergente impide un mayor acercamiento del indicador a la micela. Sin embargo, cuando el surfactante es catiónico (CTAB) la contribución del  $\tau$  correspondiente a las moléculas de complejo que acceden a la micela aumenta como consecuencia de la atracción que se produce entre moléculas de carga contraria, que facilita el acercamiento de la sonda hasta el detergente.

**Tabla 37.** Tiempos de vida de emisión ( $\pm 5\%$ ) de los complejos sintetizados en disoluciones acuosas, equilibradas al aire y termostatazadas a 25.0 °C y en presencia de distinta concentración de SDS y CTAB. Se recoge asimismo el  $\tau$  de los correspondientes trisquelato complejos homoléticos en agua.

	$[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{dppz})]^{2+}$		$[\text{Ru}(\text{s2b})_2(\text{dppz})]^{2+}$			$[\text{Ru}(\text{s2d})_2(\text{dppz})]^{2+}$		
	$\tau_1 / \text{ns} (\%)^a$	$\tau_2 / \text{ns} (\%)$	$\tau_1 / \text{ns} (\%)$	$\tau_2 / \text{ns} (\%)$	$\tau_3 / \text{ns} (\%)$	$\tau_1 / \text{ns} (\%)$	$\tau_2 / \text{ns} (\%)$	$\tau_3 / \text{ns} (\%)$
<b>H<sub>2</sub>O</b>	--- <sup>b</sup>		94 (96)		480 (4)	--- <sup>b</sup>		
<b>12 mM SDS</b>	79 (98)	541 (2)	115 (95)		480 (5)	31 (86)	141 (13)	950 (1)
<b>1.4 mM CTAB</b>	--- <sup>b</sup>		61 (31)	250 (55)	480 (14)	41 (35)	122 (62)	950 (3)
<b>RuL<sub>3</sub> (H<sub>2</sub>O)</b>	L: phen 530 ns <sup>188</sup>		L:s2b 480 ns <sup>192</sup>			L:s2d 950 ns <sup>c</sup>		

- a) Factores preexponenciales,  $\alpha_i$ , en %  
 b) Intensidad de emisión insuficiente para recoger la curva de extinción.  
 c) Determinado a partir del trisquelatocomplejo homolético previamente sintetizado en nuestro grupo de investigación.<sup>72</sup>

El estudio llevado a cabo con los tres indicadores sintetizados en presencia de detergentes aniónicos, catiónicos y neutros ha permitido establecer la influencia de la carga y la hidrofobicidad de los ligandos en las interacciones sonda-surfactante de esta naturaleza. La posterior inmovilización de los complejos en un soporte polimérico adecuado permitirá evaluar, en un futuro próximo, la potencialidad de estos compuestos para constituir la fase sensible de un optodo de detergentes. Los cambios observados en los tiempos de vida de emisión (y sus contribuciones relativas) obtenidos para las sondas en medio micelar prevén que dicho optodo podrá ser interrogado, por detección sensible a la fase, con el equipo desarrollado en el seno de este Proyecto por la empresa T.G.I..

## 5. PARTE EXPERIMENTAL.

A continuación, se describen los procedimientos de síntesis, reactivos, disolventes y otros materiales empleados en la preparación de los complejos de Ru(II) cuya luminiscencia en disolución acuosa se ha evaluado en presencia de distintos detergentes, con objeto de establecer su validez como sondas de surfactantes. Asimismo, se detallan los resultados de las distintas técnicas empleadas para la confirmación estructural de los nuevos indicadores, así como los métodos y equipos utilizados en la posterior determinación de los parámetros fotoquímicos de mayor interés característicos de cada luminóforo, tanto en medio homogéneo como en presencia de los tensioagentes.

### 5.1. REACTIVOS Y MATERIALES UTILIZADOS.

- **Indicadores sintetizados**

- [bis(4,4'-disulfo-2,2'-bipiridina)(dipirido[3,2-a:2',3'-c]fenazina)]rutenio(II), **[Ru(s2b)<sub>2</sub>(dppz)]<sup>2-</sup>**.
- [bis(1,10-fenantrolina)(dipirido[3,2-a:2',3'-c]fenazina)]rutenio(II), **[Ru(phen)<sub>2</sub>(dppz)]<sup>2+</sup>**.
- [bis(4,7-di(sulfofenil)-1,10-fenantrolina)(dipirido[3,2-a:2',3'-c]fenazina)]rutenio(II), **[Ru(s2d)<sub>2</sub>(dppz)]<sup>2-</sup>**.

(ver descripción detallada de los tres complejos en los *Objetivos* de este sensor)

- **Disolventes**

- Acetona (Lichrosolv, Merck, HPLC).
- Acetonitrilo (SDS, HPLC).
- Acetonitrilo-d<sub>3</sub> (Merck o Scharlau, > 99.8% D).
- Ácido acético glacial (Panreac, químicamente puro).
- Ácido nítrico fumante (Fluka, 100%).
- Ácido sulfúrico concentrado (Panreac, 96%).
- Agua purificada, obtenida de un sistema Milli-Q (Millipore).
- Amoníaco (Panreac, para análisis).
- Cloroformo (Panreac, para análisis).
- Éter dietílico (Panreac, HPLC, > 98% y SDS, para análisis).
- Dimetilsulfóxido-d<sub>6</sub> (Merck, Uvasol<sup>®</sup>, > 99.8% D).
- *N,N*-Dimetilformamida seca (Panreac, máx. 0.01% de agua).

- Etanol absoluto (*Panreac*, UV/IR, 99.8%).
  - Metanol (*Lichrosolv*, *Merck*, gradiente o *SDS*, HPLC).
  - Metanol-d<sub>4</sub> (*Scharlau* o *SDS*, > 99.8%).
  - *n*-Propanol (*Scharlau*, purísimo).
  - Tolueno (*SDS*, puro, para análisis).
- **Reactivos empleados en la síntesis de los indicadores**
    - Tricloruro de rutenio trihidratado (*Aldrich*).
    - 1,10-Fenantrolina monohidratada (*Merck*, para análisis).
    - 5-Nitro-1,10-fenantrolina (*Sigma*, anhidra).
    - Paladio sobre carbono al 10% (*Fluka*, purísimo).
    - Monohidrato de hidrazina (*Fluka*, > 99%).
    - *Batofenantrolina* disulfonada, 4,7-di(sulfofenil)-1,10-fenantrolina, s2d (*Fluka*, 99%).
    - *o*-Fenilendiamina (*Scharlau*, purísima).
    - Hidróxido sódico (*Quimipur*).
    - Cloruro de litio (*Panreac*).
- **Reactivos empleados en la purificación de los indicadores**
    - Placas analíticas de gel de sílice para CCF (*Merck 60 F<sub>254</sub>*, 0.2 mm de espesor de capa).
    - Placas preparativas de gel de sílice para CCF (*Merck 60*, 20 × 20 cm, 0.5 mm de espesor de capa).
    - Arena de mar (*Panreac*, químicamente pura).
    - Sulfato sódico escoriforme (*Panreac*, purísimo).
    - Hexafluorofosfato amónico (*Fluka*, > 98%).
    - DEAE-Sephadex A-50 (*Sigma*).
    - Sephadex LH-20 (*Pharmacia*).
- **Gases**
    - Ar (P-48, *Praxair*).
- **Surfactantes**
    - *Dodecilsulfato sódico*, (*SDS*, > 99%, *Sigma*).  
 $n\text{-C}_{12}\text{H}_{25}\text{OSO}_3^-, \text{Na}^+$
    - *Bromuro de hexadeciltrimetilamonio*, (*CTAB*, 99 %, *Sigma*).

$n\text{-C}_{16}\text{H}_{33}\text{N}^+(\text{CH}_3)_3, \text{Br}^-$

- *Octilfenoxi-polietoxietanol*, (*Triton X-100*, *Sigma*).  
 $(\text{CH}_3)_3\text{C}-\text{CH}_2-\text{C}(\text{CH}_2)_2-\text{C}_6\text{H}_4-\text{O}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{H}$ ,  $n = 9-10$

- **Otros materiales y aparatos utilizados**

- Placas filtrantes (*Afora*, poro 4).
- Tamices moleculares (*Scharlau*, 3 Å y *SDS*, 4 Å).
- Filtros de fibra de vidrio (*Macherey-Nagel*, MN 85/90, Ø 5.5 cm).
- Estufa modelo 3608-1 (*Lab-line instruments*), conectada a una bomba de vacío (*Edwards*, ~0.1 mbar).
- pHmetro (*WPA*, electrodo *WTW SENTIX 62*, ± 0.01 unidades de pH).
- Liofilizador *CRIODOS-50* (*Telstar*,  $2.5 \times 10^{-4}$  mbar, -45 °C).
- Filtros coloreados de corte (530 y 590 nm, 90% de transmitancia a partir de  $\lambda_{\text{corte}} + 60$  nm) (*Oriel*).
- Cubetas de cuarzo de absorbancia y fluorescencia de 1 cm de paso óptico (*Hellma*).
- Cubeta de cuarzo de fluorescencia de 1 cm de paso óptico provista de un tubo de vidrio con llave *rotaflo* de PTFE para desoxigenar muestras.
- Baños termostáticos
  - h) *Polyscience* 9105 ± 0.5 °C (precisión), resolución 0.1 °C.
  - i) *Polyscience* 9001 ± 0.25 °C (precisión), resolución 0.01 °C.
  - j) *Haake* D8-GH ± 1 °C (precisión), resolución 0.1 °C.

- **Equipos**

- Espectrofotómetro UV-VIS *Cary-3 Bio* (*Varian*).
- Espectrofluorímetro *LS50-B* (*Perkin-Elmer*).
- Espectrómetro para medidas de emisión con resolución temporal por TC-SPC, modelo *FL-900* (*Edinburgh Instruments*).

## 5.2. PROCEDIMIENTOS DE SÍNTESIS.

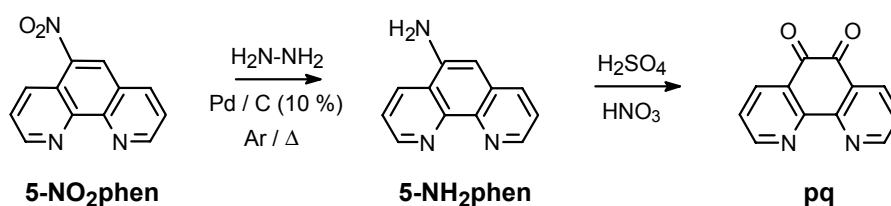
Los tres nuevos complejos de Ru(II) sintetizados poseen como ligando principal una molécula de *dipirido[3,2-a:2',3'-c]fenazina* (*dppz*), cuyos nitrógenos heterocíclicos no quelatados son los responsables de los cambios que tienen lugar en la luminiscencia del indicador en función de la polaridad del medio. Este ligando no se incorporó como tal para formar los trisquelatocomplejos heterolépticos, sino que se obtuvo en un paso final de síntesis por condensación de *o*-fenilendiamina con el ligando *fenantrolinaquinona* (*pq*) que forma parte de un complejo previo de Ru(II). Por otro lado, como ligandos auxiliares en las sondas, se introdujeron sendos anillos de *1,10-fenantrolina* (*phen*), *4,7-di(sulfofenil)-1,10-fenantrolina* (*s2d*) y *4,4'-disulfo-2,2'-bipiridina-* (*s2b*), siendo los dos primeros comerciales y el último preparado según el procedimiento descrito con anterioridad en la *Parte experimental* del optodo de pH (ver epígrafe 6.2.2.).

Los protocolos de síntesis que se detallan a continuación, están basados en la experiencia previa que posee nuestro grupo de investigación con compuestos similares,<sup>72,73,76</sup> así como en procedimientos que figuran en la bibliografía.

### 5.2.1. SÍNTESIS DE LIGANDOS.

- **Preparación de 5,6-dioxo-1,10-fenantrolina (*fenantrolinaquinona, pq*).**

La fenantrolinaquinona se obtuvo por oxidación de la 5-amino-1,10-fenantrolina siguiendo el procedimiento descrito en la literatura para fenantrolinas activadas.<sup>193</sup> El ligando aminado de partida, a su vez, había sido sintetizado previamente a partir del nitroderivado precursor para formar parte de una de las sondas de pH desarrolladas. Su preparación y posterior caracterización experimental se describen, por tanto, en la parte experimental de dicho sensor óptico (apartado 6.2.1.).



<sup>193</sup> Dickerson, J. E. y Summers, L. A., *Aust. J. Chem.*, **1970**, 23, 1023.



Se disolvieron 2.3 mmol de 5-amino-1,10-fenantrolina en 2.3 mL de ácido sulfúrico concentrado, enfriando el matraz de reacción durante el proceso con un baño de hielo. A continuación, se añadió sobre la disolución anterior 1.4 mL de ácido nítrico fumante, calentando la mezcla a 120 °C durante 3 h, transcurridas las cuales se dejó enfriar el sistema a temperatura ambiente para verter después el contenido del matraz sobre ~10 g de hielo. La disolución ácida, inicialmente de color verdoso, se alcalinizó seguidamente con hidróxido sódico 10 N, adquiriendo un color anaranjado tras conseguir el pH deseado (6.5). Finalmente, se extrajo el producto con cloroformo (4 × 25 mL), secando sobre sulfato sódico las fases orgánicas y eliminando después a presión reducida el disolvente. El sólido resultante se recristalizó de metanol, obteniendo así 5,6-dioxo-1,10-fenantrolina en forma de cristales amarillos. Su pureza se comprobó por CCF, empleando como eluyente una mezcla etanol/amoníaco 40:1 (v/v).

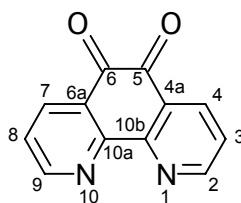
RENDIMIENTO: 74% (pq).

#### □ CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL

**IR** (KBr),  $\nu/\text{cm}^{-1}$ : 3030 ( $\nu_{\text{C-H}}$  arom.), 1686 ( $\nu_{\text{C=O}}$ ), 1576, 1560, 1458, 1414 ( $\nu_{\text{C=C}}$ ,  $\nu_{\text{C=N}}$  arom.), 741 ( $\delta_{\text{C-H}}$  arom.).

**$^1\text{H-RMN}$**  (DMSO- $d_6$ ),  $\delta/\text{ppm}$ : 8.91 (dd, H<sub>2,9</sub>), 8.31 (dd, H<sub>4,7</sub>), 7.59 (dd, H<sub>3,8</sub>).

$J_{2,3} = J_{8,9} = 4.7$  Hz,  $J_{3,4} = J_{7,8} = 7.8$  Hz,  $J_{2,4} = J_{7,9} = 1.8$  Hz.



**$^{13}\text{C-RMN}$**  (DMSO- $d_6$ ),  $\delta/\text{ppm}$ : 177.8 (C=O), 154.4 (C<sub>2,9</sub>), 152.4 (C<sub>10a,10b</sub>), 135.7 (C<sub>4,7</sub>), 129.1 (C<sub>4a,6a</sub>), 125.3 (C<sub>3,8</sub>).

### 5.2.2. SÍNTESIS DE BISQUELATOCOMPLEJOS DE Ru(II).

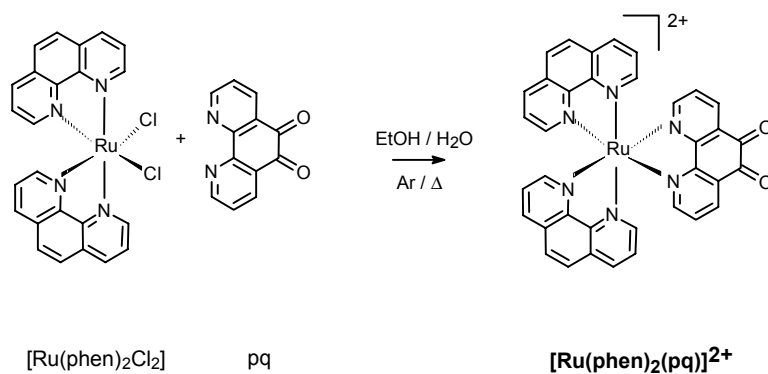
La preparación de complejos heterolépticos de Ru(II) comienza con la síntesis de los bisquelatocomplejos correspondientes en los que el metal se encuentra coordinado a los dos ligandos auxiliares del futuro indicador. Los tres complejos homolépticos precursores de las sondas para detergentes se emplearon previamente en la síntesis de los luminóforos que constituyen la fase sensible de los optodos de pH evaluados y, por tanto, su preparación también se describe en epígrafes anteriores de esta Memoria (6.2.2., *Optodo de pH*).

### 5.2.3. SÍNTESIS DE TRISQUELATOCOMPLEJOS DE Ru(II) CON dppz.

Para obtener las tres moléculas objetivo es necesario sintetizar primero un complejo heteroléptico de Ru(II) con un ligando de tipo quinónico, el cual da lugar al ligando *dppz* por condensación con *o*-fenilendiamina:

#### A) Preparación de $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{pq})]^{2+}$ .

Esta molécula, precursora del complejo objetivo, se obtuvo por calefacción a reflujo de  $\text{Ru}(\text{phen})_2\text{Cl}_2$  con la *fenantrolinaquinona* sintetizada, en medio hidroalcohólico y atmósfera inerte:<sup>184</sup>



Se calentó, en baño de agua, 0.84 mmol del bisquelatocomplejo de partida junto con 0.93 mmol de fenantrolinaquinona, disueltos en 30 mL de una mezcla etanol/agua (1:1, v/v). Transcurridas 5 h en las que la evolución de la reacción se siguió por CCF (*n*-propanol/ácido acético/agua, 7:3:4, v/v), se dejó enfriar el matraz de reacción y se añadió sobre la mezcla unas gotas de una disolución saturada de hexafluorofosfato amónico, precipitando un sólido de color marrón-verdoso. El producto se filtró por succión en placa porosa, se disolvió en acetonitrilo y se reprecipitó con eter dietílico, dejándolo secar finalmente a vacío durante 24 h (0.1 mbar).

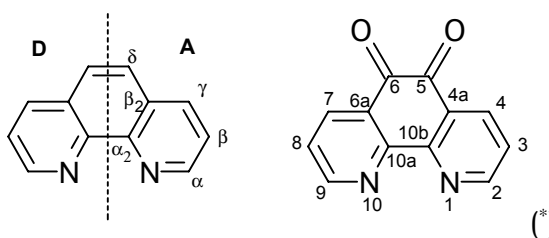
RENDIMIENTO: 90% [Ru(phen)<sub>2</sub>(pq)](PF<sub>6</sub>)<sub>2</sub>.

#### □ CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL.

**IR** (KBr),  $\nu/\text{cm}^{-1}$ : 3050 ( $\nu_{\text{C-H}}$  arom.), 1686 ( $\nu_{\text{C=O}}$ ), 1600-1400 ( $\nu_{\text{C=C}}$ ,  $\nu_{\text{C=N}}$  arom., varias bandas), 840 ( $\nu_{\text{P-F}}$ , muy intensa).

**<sup>1</sup>H-RMN** (CD<sub>3</sub>CN),  $\delta/\text{ppm}$ : 8.71 (dd, 2H <sub>$\gamma^{\text{D}}$</sub> ), 8.60 (dd, 2H <sub>$\gamma^{\text{A}}$</sub> ), 8.49 (dd, 2H<sub>4,7</sub>), 8.35 (dd, 2H <sub>$\alpha^{\text{D}}$</sub> ), 8.29 (s, 2H <sub>$\delta^{\text{D}}$</sub> ), 8.27 (s, 2H <sub>$\delta^{\text{A}}$</sub> ), 7.92 (dd, 2H <sub>$\alpha^{\text{A}}$</sub>  y 2H<sub>2,9</sub>), 7.83 (dd, 2H <sub>$\beta^{\text{D}}$</sub> ), 7.61 (dd, 2H <sub>$\beta^{\text{A}}$</sub> ), 7.50 (dd, 2H<sub>3,8</sub>).

$J_{\alpha,\beta^{\text{A}}} = J_{\alpha,\beta^{\text{D}}} = 5.4$  Hz,  $J_{\beta,\gamma^{\text{A}}} = J_{\beta,\gamma^{\text{D}}} = 8.3$  Hz,  $J_{\alpha,\gamma^{\text{A}}} = 1.46$ ,  $J_{\alpha,\gamma^{\text{D}}} = 1.2$ ,  $J_{2,3} = 5.6$  Hz,  $J_{3,4} = 8.1$  Hz,  $J_{2,4} = 1.5$ .

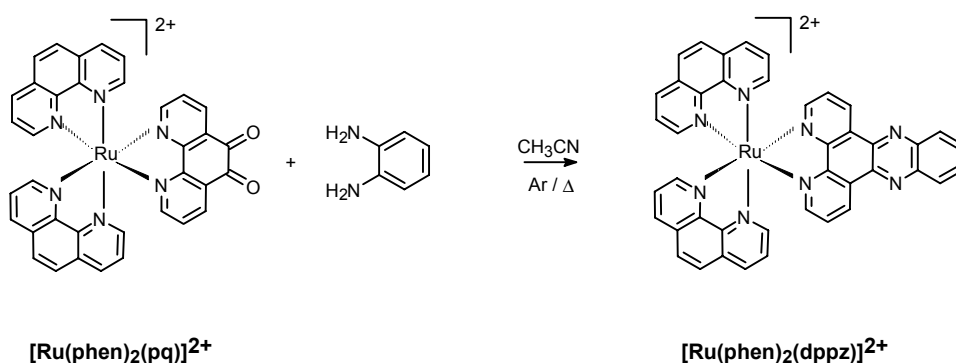


**<sup>13</sup>C-RMN** (CD<sub>3</sub>CN),  $\delta/\text{ppm}$ : 176.4 (2C=O), 158.0 (2C<sub>2,9</sub>), 157.6 (2C<sub>10a,10b</sub>), 154.3 (2C <sub>$\gamma^{\text{D}}$</sub> ), 153.8 (2C <sub>$\gamma^{\text{A}}$</sub> ), 148.7 (2C <sub>$\alpha^{\text{D}}$</sub> ), 148.5 (2C <sub>$\alpha^{\text{A}}$</sub> ), 138.3 (2C <sub>$\alpha^{\text{D}}$</sub> ), 138.1 (2C <sub>$\alpha^{\text{A}}$</sub> ), 136.8 (2C<sub>4,7</sub>), 132.1 (2C <sub>$\beta^{\text{D}}$</sub> ), 132.1 (2C <sub>$\beta^{\text{A}}$</sub> ), 131.6 (2C<sub>4a,6a</sub>), 129.5 (2C<sub>3,8</sub>), 129.1 (4C <sub>$\delta$</sub> ), 127.0 (4C <sub>$\beta$</sub> ).

\* A pesar de que el ligando phen libre es simétrico, sus protones se diferencian en el complejo en función de la proximidad al ligando principal, dppz (ver figura 3D en *Discusión de resultados*).

**B) Preparación de  $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{dppz})]^{2+}$ .**

El ligando *dppz* se obtuvo finalmente por condensación del complejo heteroléptico de Ru(II) anteriormente sintetizado, con *o*-fenilendiamina, adaptando para ello el procedimiento de síntesis descrito en la bibliografía por C. Hiort et al.<sup>185</sup>



Se calentó, a reflujo y en atmósfera inerte, 0.76 mmol de  $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{pq})](\text{PF}_6)_2$  junto con 3.05 mmol de *o*-fenilendiamina, previamente recristalizada de tolueno, disueltos en 15 mL de acetonitrilo. Tres horas después del inicio de la reacción se detuvo la calefacción y se vertió, sobre el crudo a temperatura ambiente, 100 mL de éter dietílico, precipitando en ese momento un sólido de color rojo que se filtró con succión en placa porosa y se lavó con abundante éter, dejándolo secar finalmente durante 24 h a vacío (0.1 mbar). Al igual que con el resto de complejos de Ru(II) sintetizados, tanto la evolución de la reacción como la comprobación preliminar de la pureza del sólido obtenido se realizó por CCF, utilizando como eluyente la mezcla *n*-propanol/ácido acético/agua (7:3:4, v/v).

RENDIMIENTO: 91%  $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{dppz})](\text{PF}_6)_2$ .

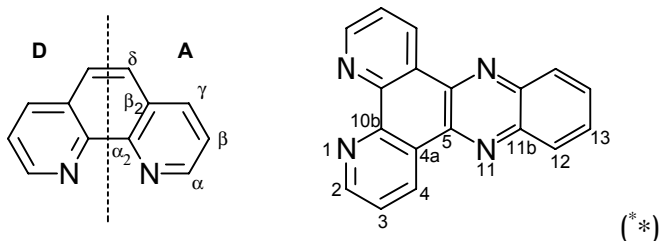
*Nota: Con objeto de aumentar la solubilidad del nuevo indicador sintetizado en agua, para su posterior caracterización en disolución, se intercambió el anión  $\text{Cl}^-$  por  $\text{PF}_6^-$  de una fracción del sólido obtenido. Para ello se hizo pasar el mismo, disuelto en una mínima cantidad de acetonitrilo, a través de una columna de DEAE-Sephadex A50, eluyéndolo con abundante agua y liofilizando después la fase acuosa.*

## □ CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL

**IR** (KBr),  $\nu/\text{cm}^{-1}$ : 3040 ( $\nu_{\text{C-H}}$  arom.), 1600-1400 ( $\nu_{\text{C=C}}$ ,  $\nu_{\text{C=N}}$  arom., varias bandas), 840 ( $\nu_{\text{P-F}}$ , muy intensa).

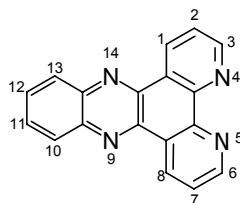
**$^1\text{H-RMN}$**  ( $\text{CD}_3\text{CN}$ ),  $\delta/\text{ppm}$ : 9.59 (dd, 2H<sub>4</sub>), 8.64 (dd, 2H <sub>$\gamma^{\text{D}}$</sub> ), 8.63 (dd, 2H <sub>$\gamma^{\text{A}}$</sub> ), 8.44 (dd, 2H<sub>13</sub>), 8.28 (s, 4H <sub>$\delta$</sub> ), 8.25 (dd, 2H<sub>2</sub>) 8.13 (dd, 2H <sub>$\alpha^{\text{D}}$</sub> ), 8.11 (d, 2H<sub>13</sub>), 8.05 (dd, 2H <sub>$\alpha^{\text{A}}$</sub> ), 7.76 (dd, 2H <sub>$\beta^{\text{D}}$</sub> ), 7.69 (dd, 2H<sub>3</sub>), 7.65 (dd, 2H <sub>$\beta^{\text{A}}$</sub> ).

$J_{\alpha,\beta^{\text{A}}} = J_{\alpha,\beta^{\text{D}}} = 5.4 \text{ Hz}$ ,  $J_{\beta,\gamma^{\text{A}}} = J_{\beta,\gamma^{\text{D}}} = 8.3 \text{ Hz}$ ,  $J_{\alpha,\gamma^{\text{A}}} = J_{\alpha,\gamma^{\text{D}}} = J_{\alpha',\gamma'} = 1.2$ ,  $J_{\alpha',\beta'} = 5.1 \text{ Hz}$ ,  $J_{\beta',\gamma'} = 8.1 \text{ Hz}$ ,  $J_{12,13} = 6.6 \text{ Hz}$ ,  $J_{13,14} = 3.4 \text{ Hz}$ .



**$^{13}\text{C-RMN}$**  ( $\text{CD}_3\text{CN}$ ),  $\delta/\text{ppm}$ : 155.2 (2C<sub>2</sub>), 154.2 (2C <sub>$\gamma^{\text{D}}$</sub> ), 153.9 (2C <sub>$\gamma^{\text{A}}$</sub> ), 151.8 (2C<sub>10b</sub>), 148.9 (2C <sub>$\alpha_2^{\text{D}}$</sub> ), 148.8 (C<sub>11b</sub>), 143.7 (2C <sub>$\alpha_2^{\text{A}}$</sub> ), 141.0 (2C<sub>5</sub>), 137.9 (2C<sub>4</sub>), 137.9 (2C <sub>$\alpha^{\text{D}}$</sub> ), 134.4 (2C<sub>4a</sub>), 133.4 (2C <sub>$\alpha^{\text{A}}$</sub> ), 132.0 (2C <sub>$\beta_2^{\text{A}}$</sub> ), 132.0 (2C<sub>13</sub>), 131.7 (2C <sub>$\beta_2^{\text{D}}$</sub> ), 130.6 (2C<sub>12</sub>), 129.0 (4C <sub>$\delta$</sub> ), 128.2 (2C<sub>3</sub>), 126.9 (2C <sub>$\beta^{\text{D}}$</sub> ), 126.9 (2C <sub>$\beta^{\text{A}}$</sub> ).

\* \* Aunque la numeración asignada al ligando *dppz* no es la correcta<sup>194</sup> en la caracterización estructural se empleará la que aparece en la figura, con objeto de facilitar la comparación de los desplazamientos químicos entre ligandos en la *discusión de resultados*.



<sup>194</sup> Fernández, E. y Fariña, F., *Nomenclatura de la Química Orgánica*, CSIC-RSEQ, Madrid, 1987.

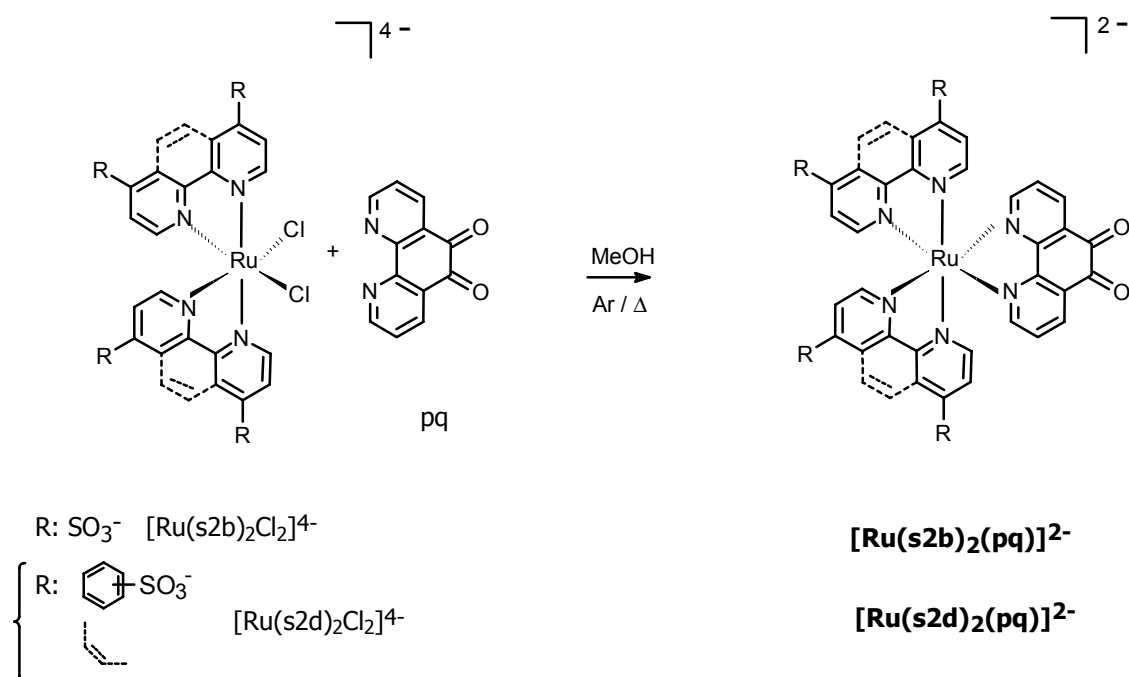
**Microanálisis:**

	C	H	N
- % experimental	48.80	2.54	10.84
- % calculado para $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{dppz})](\text{PF}_6)_2$ :	49.30	2.74	10.86

**EM-ESI** ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ),  $m/z$ : 372 ( $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{dppz})]^{2+}$ ), 889 ( $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{dppz})](\text{PF}_6)^+$ )

**C) Preparación de  $[\text{Ru}(\text{s2d})_2(\text{pq})]^{2-}$  y  $[\text{Ru}(\text{s2b})_2(\text{pq})]^{2-}$ .**

La síntesis de los dos complejos de Ru(II) sulfonados se llevó a cabo de forma paralela debido a la similitud en su estructura, siguiendo para ambos los procedimientos de síntesis y purificación que se describen a continuación:



En un matraz esférico provisto de agitación magnética, se disolvieron 0.39 mmol del bisquelatocomplejo sulfonado de partida junto con 0.48 mmol de *fenantrolinaquinona* en 50 mL de metanol. Tras aislar el sistema bajo atmósfera de argón, se calentó a reflujo durante 24 h, siguiendo la evolución del proceso por CCF (*n*-propanol/ácido acético/agua, 7:3:4, v/v). Sobre el crudo de reacción, enfriado a temperatura ambiente, se añadieron 150 mL de una mezcla acetona/éter (9:1, v/v), filtrando (placa de poro 4) con succión el sólido

precipitado. Finalmente, se lavó el producto con abundante cloroformo y se secó a vacío durante 24 h (0.1 mbar).

RENDIMIENTO: 75% ( $[\text{Ru}(\text{s2b})_2(\text{pq})]^{2-}$ ).

El complejo  $[\text{Ru}(\text{s2d})_2(\text{pq})]^{2-}$  se purificó finalmente por cromatografía rápida en columna, adsorbiendo el producto sobre LH-sephadex y empleando como eluyente metanol/tolueno (9:1, v/v).

#### □ CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL

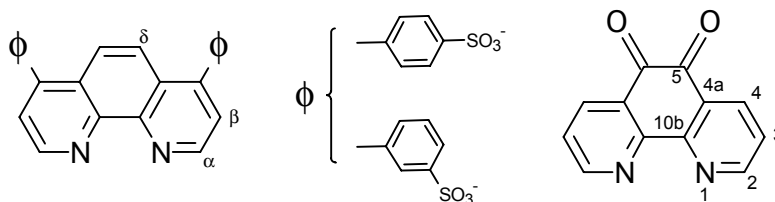
##### • $[\text{Ru}(\text{s2b})_2(\text{pq})]^{2-}$

**IR** (KBr),  $\nu/\text{cm}^{-1}$ : 3050 ( $\nu_{\text{C-H}}$  arom.), 1690 ( $\nu_{\text{C=O}}$ ), 1600-1400 ( $\nu_{\text{C=C}}$ ,  $\nu_{\text{C=N}}$  arom., varias bandas).

##### • $[\text{Ru}(\text{s2d})_2(\text{pq})]^{2-}$

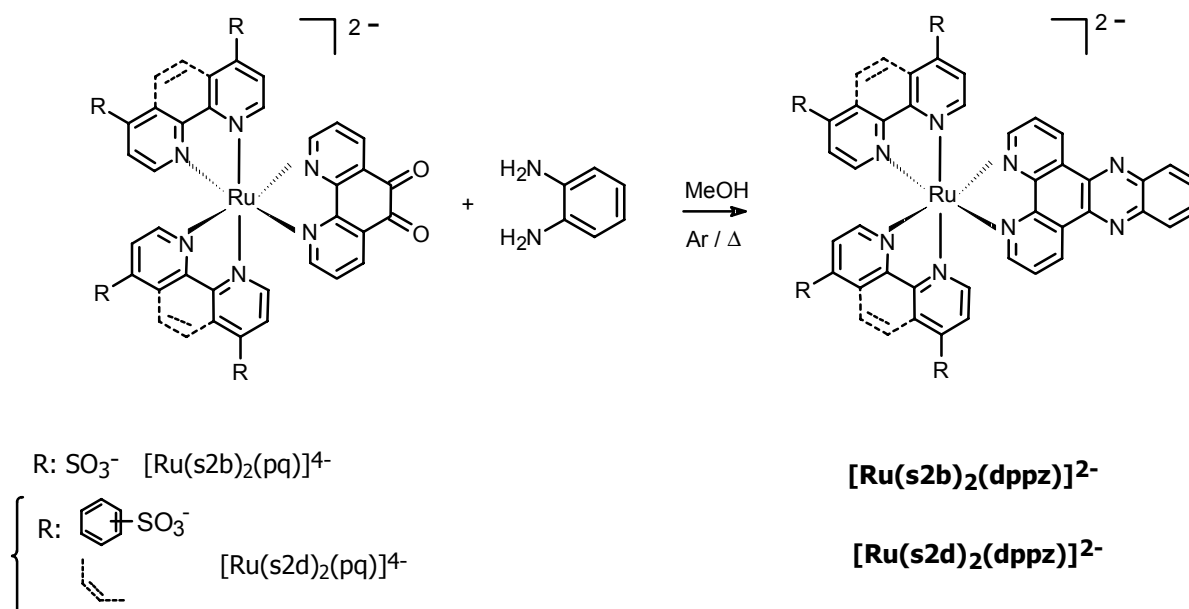
**IR** (KBr),  $\nu/\text{cm}^{-1}$ : 3045 ( $\nu_{\text{C-H}}$  arom.), 1685 ( $\nu_{\text{C=O}}$ ), 1600-1400 ( $\nu_{\text{C=C}}$ ,  $\nu_{\text{C=N}}$  arom., varias bandas).

**$^1\text{H-RMN}$**  ( $\text{D}_2\text{O}$ ),  $\delta/\text{ppm}$ : 9.78 (d), 9.73 (d), 9.44 (d), 9.36 (d), 9.25 (d), 8.78 (dd), 8.74 (dd), 8.60 (dd), 8.56 (dd), 8.54 (s), 8.06-7.93 (m), 7.71 (dd), 7.70 (d), 7.69 (d), 7.59 (t), 7.27 (dd), 7.22 (dd).  
 $J_{\alpha,\beta} = 5.86 \text{ Hz}$ ,  $J_{4,3} = 8.3 \text{ Hz}$ ,  $J_{2,3} = 5.4 \text{ Hz}$ ,  $J_{2,4} = 1.5 \text{ Hz}$ .



**D) Preparación de  $[\text{Ru}(\text{s2d})_2(\text{dppz})]^{2-}$  y  $[\text{Ru}(\text{s2b})_2(\text{dppz})]^{2-}$ .**

Las dos sondas aniónicas potencialmente sensibles a los surfactantes del medio, se obtuvieron finalmente por condensación del correspondiente complejo de Ru(II) provisto de un ligando de tipo quinona con *o*-fenilendiamina:<sup>185</sup>



Se calentaron durante 3 h, a reflujo y en atmósfera inerte, 0.27 mmol de  $[\text{RuL}_2\text{pq}]^{2-}$  junto con 0.87 mmol de *o*-fenilendiamina, previamente recristalizada de tolueno, disueltos en 15 mL de metanol. Transcurrido el tiempo de reacción, se dejó enfriar el matraz y se añadió al crudo 100 mL de éter dietílico, produciéndose la precipitación del producto deseado. El sólido obtenido se lavó repetidas veces con éter y se secó después a vacío durante 24 h (0.1 mbar), comprobando su pureza por CCF (*n*-propanol/ácido acético/agua, 7:3:4, v/v).

El complejo  $[\text{Ru}(\text{s2d})_2(\text{dppz})]^{2-}$  se purificó finalmente, tras descartar numerosos métodos con resultados negativos, por CCF preparativa, utilizando para ello la misma mezcla de elución empleada para el seguimiento de la reacción. El compuesto puro se extrajo finalmente de la fase sólida con metanol, eliminando después a presión reducida el disolvente y secando a vacío el indicador durante 24 h (0.1 mbar). El complejo análogo con bipyridina disulfonada no se purificó tras la precipitación con éter, ya que no se apreció la presencia de impurezas por CCF.



RENDIMIENTO: 90%  $[\text{Ru}(\text{s2b})_2(\text{dppz})]^{2-}$ .

70%  $[\text{Ru}(\text{s2d})_2(\text{dppz})]^{2-}$ .

### □ CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL

#### $[\text{Ru}(\text{s2b})_2(\text{dppz})]^{2-}$

**IR** (KBr),  $\nu/\text{cm}^{-1}$ : 3045 ( $\nu_{\text{C-H}}$  arom.), 1600-1400 ( $\nu_{\text{C=C}}$ ,  $\nu_{\text{C=N}}$  arom., varias bandas), 1220 ( $\nu_{\text{as}} \text{SO}_3^-$ ) y 1060 ( $\nu_{\text{si}} \text{SO}_3^-$ ).

#### **Microanálisis:**

	C	H	N
- % experimental	39.92	3.77	9.92
- % calculado para $[\text{Ru}(\text{s2b})_2(\text{dppz})\text{Li}_2] \cdot 6\text{H}_2\text{O} \cdot 1\text{CH}_3\text{OH}$ :	<b>40.17</b>	<b>3.28</b>	<b>9.61</b>
- % calculado para $[\text{Ru}(\text{s2b})_2(\text{dppz})\text{LiNa}] \cdot 5\text{H}_2\text{O} \cdot 2\text{CH}_3\text{OH}$ :	40.17	3.37	9.37
- % calculado para $[\text{Ru}(\text{s2b})_2(\text{dppz})\text{Na}_2] \cdot 5\text{H}_2\text{O} \cdot 1\text{CH}_3\text{OH}$ :	39.70	3.07	9.50

**EM-ESI** ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ),  $m/z$ : 1019 ( $[\text{Ru}(\text{s2b})_2(\text{dppz})]^{2-} + \text{Li}^+$ )

1051 ( $[\text{Ru}(\text{s2b})_2(\text{dppz})]^{2-} + \text{Li}^+ + \text{MeOH}$ ).

#### $[\text{Ru}(\text{s2d})_2(\text{dppz})]^{2-}$

**IR** (KBr),  $\nu/\text{cm}^{-1}$ : 3050 ( $\nu_{\text{C-H}}$  arom.), 1600-1400 ( $\nu_{\text{C=C}}$ ,  $\nu_{\text{C=N}}$  arom., varias bandas), 1190 ( $\nu_{\text{as}} \text{SO}_3^-$ ) y 1050 ( $\nu_{\text{si}} \text{SO}_3^-$ ).

#### **Microanálisis:**

	C	H	N
- % experimental	37.39	3.93	2.77
- % calculado para $[\text{Ru}(\text{s2d})_2(\text{dppz})]\text{Na}_2 \cdot 10\text{H}_2\text{SiO}_3 \cdot 22\text{CH}_3\text{COOH}$ :			
	37.61	4.19	3.19
- % calculado para $[\text{Ru}(\text{s2d})_2(\text{dppz})]\text{Na}_4\text{Cl}_2 \cdot 9\text{H}_2\text{SiO}_3 \cdot 25\text{CH}_3\text{COOH}$ :			
	<b>37.34</b>	<b>4.21</b>	<b>3.00</b>

**EM** ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ),  $m/z$ : 1387 ( $[\text{Ru}(\text{s2d})_2(\text{dppz})]\text{Na}^-$ ).

1433 ( $[\text{Ru}(\text{s2d})_2(\text{dppz})]\text{Na}_2 + \text{Na}^+$ ).

### 5.3. CARACTERIZACIÓN EN DISOLUCIÓN DE LOS INDICADORES SINTETIZADOS.

Tras la confirmación estructural de los tres nuevos indicadores sintetizados se procedió, al igual que en el desarrollo del sensor óptico de pH, a la determinación de los parámetros fotofísicos más importantes que caracterizan a estos complejos de Ru(II) en disolución: longitudes de onda máximas de absorción y emisión, rendimientos cuánticos de luminiscencia y tiempos de vida de desexcitación electrónica. Como disolvente se emplearon agua y dimetilformamida anhidra, para poder establecer la influencia del primero en las propiedades ópticas exhibidas por estos compuestos.

Por otro lado, teniendo en cuenta la tendencia a la autoasociación que presentan los complejos con un ligando *dppz* debido a la extensa estructura aromática que exhibe esta molécula, se evaluó la dependencia con la concentración de la absorbancia y la luminiscencia de las sondas. Esto permite establecer las concentraciones máximas de trabajo, por debajo de las cuales se puede asegurar que los fenómenos ópticos observados en presencia de surfactantes se deben exclusivamente a los mismos y no a la agregación de los compuestos.

A continuación, se describen las condiciones experimentales con las que se llevó a cabo la caracterización espectroscópica y fotofísica de las sondas para detergentes sintetizadas:

- Los **espectros de absorción UV-VIS** se registraron en un espectrofotómetro Cary-3 Bio de *Varian*, con una velocidad de barrido de 120 nm/min y tomando lecturas cada 1 nm.
- Los **coeficientes de absorción molar ( $\epsilon$ )** característicos de cada indicador en agua y DMF, se determinaron experimentalmente a partir de la absorbancia correspondiente a los máximos de absorción UV-VIS de tres disoluciones de concentración perfectamente conocida ( $< 30 \mu\text{M}$ ) preparadas por pesada directa ( $\pm 0.01 \text{ mg}$ ).
- Los **máximos de emisión** se obtuvieron a partir de los correspondientes espectros recogidos en un espectrofluorímetro LS50-B de *Perkin-Elmer*, termostatazando el portacubetas a  $25.0 \text{ }^\circ\text{C}$  y utilizando una velocidad de barrido

de 120 nm/min. Para ello, las sondas se excitaron en el máximo de absorción que exhiben en el visible (MLCT), utilizando un filtro coloreado de corte a 530 nm para aislar la emisión de la luz procedente de la lámpara. Las rendijas empleadas para el registro de los espectros se adaptaron en cada caso a la concentración de indicador, con objeto de evitar la saturación del detector.

- Los **rendimientos cuánticos de emisión ( $\Phi_{em}$ )** se determinaron a partir de disoluciones termostatzadas (25.0 °C) de absorbancia conocida (< 0.1 a la longitud de onda de excitación) y desoxigenadas con Ar durante un mínimo de 30 minutos. Se registraron cinco espectros de emisión de cada disolución en el espectrofotómetro LS50-B, recogiendo el área bajo la curva de todos ellos y utilizando como referencia Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup> ( $\Phi_{em} = 0.042 \pm 0.002$ ; método de Parker y Rees).<sup>150</sup> En el cálculo de  $\Phi_{em}$  se realizaron las correcciones correspondientes debidas a la distinta absorbancia de las disoluciones y sus índices de refracción, cuando se emplearon distintos disolventes para la muestra y el patrón (ecuación 34).<sup>151</sup>

- Los **tiempos de vida de emisión ( $\tau$ )** se obtuvieron mediante la técnica de conteo de fotones individuales correlacionados temporalmente (TC-SPC) recogiendo para ello las cinéticas de desactivación de la luminiscencia de los complejos en disoluciones desoxigenadas con Ar y termostatzando el portacubetas del espectrómetro (FL-900, de *Edinburgh Instruments*) a 25.0 °C. Se seleccionó 358 nm como longitud de onda de excitación, pulsando la lámpara de descarga de nitrógeno a 40 KHz y utilizando un filtro de corte de 570 o 590 nm.

- Para establecer la concentración máxima a partir de la cual se produce la **autoagregación** de los indicadores, se prepararon 8 disoluciones acuosas de cada complejo en agua, de concentraciones comprendidas entre 100 y 1  $\mu$ M y se registró el espectro de absorción y emisión de cada una de ellas en las mismas condiciones experimentales (disoluciones equilibradas al aire, misma apertura de rendijas, 25.0 °C). De la representación gráfica de la absorbancia y la intensidad de emisión a una longitud de onda dada frente a la concentración de la sonda, se obtuvo el intervalo de linealidad propio de cada indicador que permitió determinar la concentración óptima de trabajo.

### 5.3.1. VARIACIÓN DE LAS PROPIEDADES ÓPTICAS DE LOS INDICADORES EN PRESENCIA DE SURFACTANTES.

Con objeto de establecer cómo varía en disolución acuosa la absorbancia y la luminiscencia de los tres indicadores sintetizados, cuando son expuestos a un detergente, se prepararon 8 disoluciones con cada uno de los complejos, en las que se mantuvo constante la concentración de la sonda, modificando la cantidad de tensioagente presente en cada una de las disoluciones. Para ello, se eligieron tres surfactantes en representación de los detergentes aniónicos (*dodecilsulfato sódico*, abreviadamente **SDS**, c.m.c. = 8 mM), catiónicos (*bromuro de hexadeciltrimetil amonio*, **CTAB**, c.m.c. = 0.92 mM) y neutros (*octilfenoxipolietoxietanol*, **Triton X-100**, c.m.c. = 0.24 mM).<sup>157</sup>

El registro de la emisión que muestra cada uno de los indicadores en presencia de los surfactantes se llevó a cabo en un espectrofluorímetro LS50 B de Perkin-Elmer. Dada la baja intensidad de emisión que los luminóforos muestran en el medio acuoso se seleccionó la apertura máxima en las rendijas de los monocromadores de excitación y emisión del equipo (15/20 nm, respectivamente). Asimismo, se escogió como longitud de onda de excitación el máximo de absorción de la banda de transferencia de carga metal-ligando (MLCT) que todos ellos presentan en la región visible del espectro electromagnético en disolución acuosa. Paralelamente, se registró el espectro de absorción de todas las disoluciones (CARY 3) con el fin de estudiar los cambios que se producen en las principales bandas que exhiben estos indicadores, fundamentalmente en la región visible del espectro. Para ello se colocó en la cubeta de referencia una disolución acuosa con la misma cantidad de tensioactivo que en la muestra. La tabla 38 recoge la concentración de las sondas (constante) durante los experimentos, así como el intervalo de concentraciones de cada uno de los surfactantes evaluados. El ajuste de los microanálisis elementales realizados de las sondas a posteriori reveló que las concentraciones reales empleadas en este estudio eran inferiores a las seleccionadas inicialmente con los pesos moleculares teóricos (25  $\mu$ M en todos los casos).

La cinética de desactivación de la luminiscencia de las sondas en presencia de los distintos surfactantes se llevó a cabo mediante la técnica TC-SPC en el espectrofotómetro FL-900 de *Edinburgh Instruments*, empleando en este caso

como fuente de excitación un *led* azul centrado a 450 nm (Nanoled-05 blue, IBH, Glasgow, Reino Unido) y un filtro de corte de 530 nm.

**Tabla 38.** Complejos de Ru(II) cuyo luminiscencia ha sido evaluada en presencia de distintos detergentes. Se recogen las concentraciones reales de cada uno de ellos, así como el intervalo de concentraciones empleado con cada tensioactivo.

indicador	[indicador] / $\mu\text{M}$	surfactante	[surfactante] / $\mu\text{M}$
$[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{dppz})]^{2+}$	25	SDS	0–12
$[\text{Ru}(\text{s2b})_2(\text{dppz})]^{2-}$	18	CTAB	0–1.8
$[\text{Ru}(\text{s2d})_2(\text{dppz})]^{2-}$	8	TRITON X-100	0–0.35



## 6. CONCLUSIONES (*optodo de detergentes*).

Se la llevado a cabo la evaluación preliminar de varios complejos luminiscentes de Ru(II) como potenciales sondas de surfactantes en aguas. Los resultados de este estudio se recogen, a modo de resumen, en los siguientes puntos:

- Se han **sintetizado** tres complejos heterolépticos de Ru(II), dos de ellos desconocidos hasta la fecha. En todos, el ligando clave es una molécula de *dipiridofenazina* (**dppz**), cuyos nitrógenos heterocíclicos no quelatados al metal son los responsables de la variación de las propiedades ópticas de estos indicadores en medio micelar. La introducción de fenantrolina (**phen**), sulfobipiridina (**s2b**) y di(sulfofenil)fenantrolina (**s2d**), como ligandos auxiliares ha permitido la preparación de sondas con diferente carga global, con objeto de evaluar el efecto de las interacciones electrostáticas indicador-detergente en los cambios observados en la luminiscencia de los compuestos.
- En los tres casos, el ligando dppz se obtuvo en un último paso de síntesis por condensación de *o-fenilendiamina* con *fenantrolinaquinona*, la cual formaba parte de un complejo de Ru(II) en el que previamente se habían incorporado los dos ligandos auxiliares (phen, s2b o s2d).
- Se han determinado los principales **parámetros fotoquímicos** que caracterizan a cada uno de los indicadores **en medio homogéno** (disolución acuosa): máximos de absorción (439-459, MLCT) y coeficientes de absorción molar (16600-20000 l mol<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>, MLCT), longitud de onda máxima de emisión (600-650 nm) y rendimiento cuántico de luminiscencia (0.002-0.008). Esta caracterización se realizó asimismo en *dimetilformamida* anhidra, lo que permitió establecer la influencia del disolvente en las propiedades ópticas de los complejos.
- Se han registrado los espectros de **absorción y emisión** de los tres indicadores en disoluciones acuosas de distinta **concentración** (1-100 μM). Ninguno de ellos mostró desviaciones de la Ley de Lambert-Beer. Sin embargo, la luminiscencia registrada reveló que se produce **efecto de filtro interno** para concentraciones de sonda superiores a 15 μM, donde la representación gráfica de la intensidad de emisión en función de la concentración se desvía

de la linealidad. En ningún caso se advirtió un aumento de la emisión de luz mayor de lo esperado para la cantidad de indicador disuelta, por lo que se puede afirmar que no se produce la **agregación** o apilamiento de las moléculas de indicador en la disolución, ya que en esta situación se evitaría la exposición de los nitrógenos heterocícllos de la fenazina al medio acuoso, con el consiguiente incremento en la intensidad de luminiscencia.

- Se ha evaluado la variación que experimenta la absorción y luminiscencia de los tres indicadores en disolución en presencia de un surfactante aniónico (**SDS**, 0-12 mM), catiónico (**CTAB**, 0-1.8 mM) y neutro (**TRITON X-100**, 0-0.35 mM). De este estudio se concluye que las propiedades ópticas de los luminóforos se modifican en mayor grado cuando se establecen interacciones electrostáticas favorables sonda-tensioagente. Asimismo se ha comprobado que, aunque el indicador y el detergente posean la misma carga, es posible la interacción entre ambos si los ligandos que quelatan al rutenio son lo suficientemente hidrófobos. A continuación se resume el efecto de cada uno de los surfactantes estudiados sobre la luminiscencia de los indicadores:
  - **[Ru(phen)<sub>2</sub>(dppz)]<sup>2+</sup>**: La escasísima emisión que exhibe este complejo catiónico en agua se ve considerablemente incrementada ( $I/I_0 = 11$ )\* en presencia del surfactante aniónico (**SDS**). Por el contrario, sus propiedades ópticas no se modifican cuando se añade a la disolución un detergente catiónico o neutro. Por lo tanto, son las interacciones *electrostáticas* sonda-surfactante las que posibilitan la inserción del ligando dppz en la cavidad hidrófoba de la micela, protegiéndose así de la desactivación por las moléculas de agua presentes en el medio.
  - **[Ru(s2b)<sub>2</sub>(dppz)]<sup>2-</sup>**: La naturaleza aniónica de este luminóforo es responsable del fuerte incremento observado en su emisión en presencia de **CTAB** en concentración superior a su cmc ( $I/I_0 = 7$ ). El tensioagente aniónico, SDS, asimismo, provoca un ligero aumento en la emisión de luz recogida por el detector ( $I/I_0 = 1.3$ ) probablemente debido a la interacción hidrófoba entre el ligando *dppz* del complejo y la larga cola hidrocarbonada del detergente. En presencia del surfactante neutro, Triton X-100, no se

---

\*  $I_0$ : intensidad de emisión en agua;  $I$ : intensidad máxima en presencia de surfactante en concentración superior a su c.m.c..



aprecian variaciones significativas en los espectros de absorción y emisión de la sonda.

- **[Ru(s2d)<sub>2</sub>(dppz)]<sup>2-</sup>**: La gran separación de cargas existente entre la región aniónica de la molécula y el centro metálico catiónico, debido al volumen estérico de los ligandos que soportan los grupos sulfonato, hace que la luminiscencia de esta sonda sea sensible tanto a detergentes de igual carga como catiónicos. El incremento en la emisión procedente del complejo en disoluciones de **SDS** se observa desde muy bajas concentraciones de surfactante añadido, aunque es a partir de su cmc cuando se aprecia una variación mayor ( $I/I_0 = 4$ ). Esto indica que la región catiónica del complejo es capaz de aproximarse a las micelas de SDS permitiendo la incorporación del ligando dppz al interior de las mismas. Con el bromuro de cetiltrimetilamonio (**CTAB**), por el contrario, el complejo forma inicialmente pares iónicos de gran tamaño e hidrofobicidad que impiden el acercamiento de las moléculas de aguas hasta el ligando principal y, en consecuencia, aumenta la emisión de la sonda, luminiscencia que disminuye bruscamente con la ruptura del par iónico al formarse la micela y vuelve a recuperarse al asociarse el complejo a la misma, con la posterior intercalación del ligando dppz en su interior ( $I/I_0 = 9$ ). Este es el único indicador de los investigados cuya emisión aumenta con moléculas de Triton X-100 en el medio, aunque dicho incremento es moderado ( $I/I_0 = 1.8$ ).

En definitiva, del estudio realizado se concluye que los tres complejos de Ru(II) sintetizados, convenientemente inmovilizados en soportes sólidos adecuados, pueden constituir la fase sensible de un sensor óptico de detergentes aniónicos ( $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{dppz})]^{2+}$ ) o catiónicos ( $[\text{Ru}(\text{s2b})_2(\text{dppz})]^{2-}$  y  $[\text{Ru}(\text{s2d})_2(\text{dppz})]^{2-}$ , siendo éste último el más sensible. Evaluaciones más exhaustivas de estas sondas determinarán la generalidad de estos resultados, particularmente seleccionando un soporte polimérico apropiado y si el optodo construido puede ser interrogado adecuadamente por detección sensible a la fase con el equipo optoelectrónico fabricado por T.G.I..



## TÉCNICAS Y EQUIPOS EMPLEADOS.

### 1. TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS.

Las **cromatografías en capa fina** (CCF), empleadas en el seguimiento de las reacciones de síntesis y en la evaluación preliminar de la pureza de los productos, se realizaron sobre placas de gel de sílice (Merck 60 F<sub>254</sub>), con un espesor de capa de 0.2 mm. En la purificación del indicador [Ru(s2d)<sub>2</sub>(dppz)]<sup>2-</sup> se utilizaron placas preparativas de dimensiones 20 × 20 cm y 0.5 mm de espesor de capa. Como eluyente de los complejos de Ru(II) sintetizados se empleó una mezcla *n*-propanol/ácido acético/agua en proporciones 7:3:4 (v/v/v).

Las **cromatografías rápidas en columna** se llevaron a cabo empleando como fase estacionaria gel de dextrano (Sephadex<sup>®</sup>) funcionalizado, CM (carboximetil) con complejos catiónicos y LH (lipofílico) para complejos aniónicos. La elución del compuesto adsorbido en la primera (CM) se realizó utilizando como fase móvil disoluciones de cloruro sódico de fuerza iónica creciente. La sal se eliminó posteriormente por extracción del complejo con metanol frío tras liofilizar las fracciones acuosas reunidas que contenían producto puro. Con dextrano lipofílico se emplearon como eluyente metanol, tolueno, mezcla de ambos o disoluciones acuosas de hidróxido sódico.

El **intercambio de contraión** hexafluorofosfato por cloruro, necesario en ocasiones para aumentar la solubilidad de los complejos de Ru(II) en agua, se realizó en columna cromatográfica de Sephadex<sup>®</sup> DEAE (dietilaminoetil), eluyendo el producto con agua después de cargarlo en la parte superior de la fase estacionaria disuelto en acetonitrilo/agua (1:1, v/v).

### 2. MICROANÁLISIS.

Los **microanálisis** de los nuevos complejos de Ru(II) sintetizados se realizaron en el C.A.I. de Microanálisis de la Universidad Complutense de Madrid.

### 3. ESPECTROSCOPIA DE ABSORCIÓN INFRARROJA.

Los **espectros de infrarrojo** (IR) de las muestras (sólidas) se registraron en pastilla de bromuro potásico (*Merck*, Uvasol®), utilizando para ello equipos Perkin Elmer 781 y Shimadzu FTIR 8300.

### 4. ESPECTROSCOPIA DE RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR.

Los espectros de **resonancia magnética nuclear** de  $^1\text{H}$  a 200 MHz y de  $^{13}\text{C}$  a 50 MHz se obtuvieron en un espectrómetro Bruker AM-200 (C.A.I. de RMN de la UCM). Alternativamente, se realizaron espectros de  $^1\text{H}$ -RMN a 300 MHz en un espectrómetro Varian VXR-300S, perteneciente a dicho C.A.I..

Los desplazamientos químicos ( $\delta$ , en partes por millón, ppm) se determinaron en relación al tetrametilsilano o utilizando la señal del disolvente como referencia. En la asignación de las señales se han empleado las siguientes abreviaturas: s, singlete; sa, singlete ancho; d, doblete; t, triplete y m, multiplete.

### 5. ESPECTROMETRÍA DE MASAS.

Los **espectros de masas** de los trisquelatocomplejos de Ru(II) preparados se realizaron empleando la técnica ESI (ionización por electropulverización), en la que se produce una ionización suave de la muestra, sin fragmentación. El producto, disuelto en metanol u otro disolvente polar, se inyecta (250  $\mu\text{L}$ ) hasta un capilar donde una diferencia de potencial produce la nebulización e ionización de la muestra. Los iones entran al analizador, un selector de masas cuadrupolar acoplado a continuación, el cual detecta fundamentalmente el pico molecular del compuesto al que con frecuencia se adsorben otras especies presentes en el medio ( $[\text{M}]^+$ ,  $[\text{M}+\text{nH}]^{m+}$ ,  $[\text{M}+\text{nNa}]^{m+}$ ,  $[\text{M}+\text{n}(\text{disolvente})]^{m+}$ ...)

El registro de los espectros se llevó a cabo en un equipo Esquire-LC de Bruker (Bremen, Alemania) del C.A.I. de Espectrometría de Masas de la U.C.M.

## 6. VOLTAMETRÍA CÍCLICA.

Las **voltamperometrías cíclicas** se registraron en un equipo *BAS100* (*Bioanalytical Systems*), manejado con el software *bas100w 2*. Se prepararon disoluciones 0.1 M del electrolito soporte (hexafluorofosfato de tetrabutilamonio) en acetonitrilo, previamente secado durante dos semanas sobre tamices moleculares de 3 Å, y en ellas se disolvieron los indicadores evaluados en concentración 0.5 mM, secados previamente en una estufa de vacío durante 48 h (40 °C, 0.1 mbar). Antes de registrar los voltamperogramas, se desoxigenaron las disoluciones con argón durante, al menos, 15 minutos, manteniendo durante toda la medida el paso del gas inerte.

Para obtener los **potenciales de semionda** ( $E_{1/2}$ ) de los trisquelatocomplejos de Ru(II) se empleó un sistema de tres electrodos: un electrodo de trabajo de carbono vitrificado, un electrodo de referencia (Ag/AgNO<sub>3</sub> 0.01 M en acetonitrilo con electrolito soporte) y un contraelectrodo de hilo de platino. El electrodo de referencia y las disoluciones de medida se interconectaron con un disco de vidrio *vycor*<sup>®</sup> poroso. La velocidad de barrido seleccionada para los distintos experimentos fue 200 mV/s. Todos los potenciales de semionda se calcularon en relación al pico de oxidación del complejo de Ru(II) como referencia ([Ru(bpy)<sub>3</sub>](PF<sub>6</sub>)<sub>2</sub>,  $E^{3+/2+} = 1.260$  V vs ENH)<sup>152</sup> a partir de las curvas de voltamperometría suavizadas y aplicando la ecuación 35, en la que  $E_p^{Red}$  es el potencial del pico catódico (en el sentido de la reducción),  $E_p^{Ox}$  el potencial del pico anódico (en el sentido de la oxidación):<sup>153</sup>

$$E_{1/2} = \frac{E_p^{Red} + E_p^{Ox}}{2} \quad (32)$$

## 7. ESPECTROSCOPIA DE ABSORCIÓN ULTRAVIOLETA-VISIBLE.

Los **espectros de absorción UV-VIS** (200-650 nm) se registraron con un espectrofotómetro Varian Cary-3 Bio, tomando lecturas cada 1 nm y empleando una velocidad de barrido de 120 nm/min. La adquisición de datos y control del instrumento se realizó mediante un ordenador. Todas las medidas se llevaron a cabo a temperatura ambiente (23 ± 2 °C).

## 8. ESPECTROSCOPIA DE EMISION EN ESTADO ESTACIONARIO.

Para el registro de los **espectros de emisión** y el seguimiento temporal (*time drive*) de la intensidad de luminiscencia de las fases sensibles preparadas se utilizó un espectrofluorímetro LS 50B de Perkin-Elmer, equipado con un tubo fotomultiplicador de respuesta extendida al rojo Hamamatsu R928, que dispone de una red de difracción tanto en la emisión como en la excitación. Los espectros (sin corregir por la respuesta instrumental) se registraron mediante un ordenador empleando una velocidad de barrido de 120 nm/min. Alternativamente, se utilizó un espectrofluorímetro LS 5 de Perkin-Elmer dotado del mismo fotomultiplicador y controlado por un computador Perkin-Elmer 3600 Data Station.

## 9. ESPECTROSCOPIA DE EMISION CON RESOLUCION TEMPORAL.

Las medidas de **emisión con resolución temporal** se realizaron empleando dos técnicas diferentes: conteo de fotones individuales correlacionados con el tiempo (*TC-SPC*) y medidas de luminiscencia por detección sensible a la fase. Esta última técnica y el equipo desarrollado por la empresa T.G.I. y Grupo Interlab para llevar a cabo este tipo de medidas se describen con detalle en un capítulo completo de esta Memoria (*Detección sensible a la fase. Sistema DEMODE*).

El registro de la cinética de extinción de la luminiscencia de los complejos de Ru(II) sintetizados, mediante la técnica TC-SPC, se realizó en un espectrómetro Edinburgh Instruments FL-900, equipado con una lámpara de descarga en nitrógeno (N-55, *Air Liquide*) a baja presión (0.40 bar) pulsada a 40 KHz (20 KHz para valores de  $\tau$  superiores a 5  $\mu$ s) y con una separación de electrodos de 1.5 mm.<sup>#</sup> Como detector, este sistema emplea un tubo fotomultiplicador Hamamatsu R955 de respuesta extendida, enfriado con un Peltier a -21 °C. Para cinéticas cuyo tiempo de vida es superior a 200 ns, el equipo se conectó a un generador de retrasos externo Ortec 416 A. Edinburgh Instruments suministra junto con el equipo un programa de control, adquisición y procesado de datos, que permite la

---

<sup>#</sup> Eventualmente se empleó como fuente de excitación un LED azul cuyo máximo de emisión se encuentra a 450 nm (Nanoled-05 blue, IBH, Glasgow, Reino Unido) o un láser de diodo azul-violeta, centrado a 405 nm y con un ancho espectral de 0.5 nm (Nanoled-07, IBH.). En ambos casos, las fuentes de diodo se pulsaron a 220 KHz para tiempos de vida de emisión inferiores a 4  $\mu$ s.

determinación de los tiempos de vida de emisión mediante el ajuste de los datos experimentales (intensidad de emisión frente al tiempo) a una curva exponencial (o suma de exponenciales) según la siguiente expresión matemática:

$$I(t) = \sum_i \alpha_i \exp(-t / \tau_i) \quad (8)$$

donde  $I(t)$  es la intensidad de emisión dependiente del tiempo,  $\alpha_i$  representa la contribución de cada función exponencial en la cinética de desactivación registrada y  $\tau_i$  su tiempo de vida de desexcitación asociado. El procesado de datos que realiza el programa se basa en un ajuste por mínimos cuadrados mediante un algoritmo no lineal de Marquardt, con deconvolución por la respuesta instrumental en la medida de tiempos de vida inferiores a 30 ns.<sup>195</sup> El programa informático permite fijar algunos (o todos) los tiempos de vida, pero no así los factores preexponenciales. Como criterio de ajuste se utilizaron, habitualmente, los residuos ponderados (*weighted residuals*) y el valor de  $\chi^2$  (ecuación 36).

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^n W_i [y(t_i) - Y(t_i)]^2 \quad (36)$$

donde  $W_i$  es el factor de pesada,  $n$  el número total de puntos,  $y(t)$  los puntos experimentales e  $Y(t)$  la función de ajuste calculada por el equipo. En caso de duda, se acudió a la función de autocorrelación y el parámetro Durbin-Watson.<sup>195</sup>

---

<sup>195</sup> O'Connor, D. V. y Phillips, D., *Time-Correlated Single Photon Counting*, Academic Press, Londres (Reino Unido), 1984, 36-52.





## **PRÓLOGO**

\* Decisión nº 1110/94/CE. *Diario oficial de las Comunidades Europeas*, nºL 126/1, 18-Mayo-**1994**.

## **ANTECEDENTES GENERALES**

1. Valcárcel, M. y Luque de Castro, M. D., a) *Analyst*, **1993**, 118. b) "Flow-through Chemical Sensors". *Techniques and Instrumentation in Analytical Chemistry*, vol 16. Elsevier Science, Amsterdam, Holanda, **1994**.
2. Wolfbeis, O. S., *Fresenius J. Anal. Chem.*, **1990**, 337, 522.
3. Wolfbeis, O. S., *Fiber Optic Chemical Sensors and Biosensors*, CRC Press, Boca Raton, Florida (EE.UU.), **1991**, vol I y II.
4. Cámara, C. Moreno-Bondi, M. C. y Orellana, G., *Chemical Sensing with Fiberoptic Devices*, en *Biosensors with Fiberoptics*, Wise, D. L. y Wingard, L. B. (eds.), Humana Press, Clifton, Nueva Jersey (EE.UU.), **1991**, cap. 2, 29.
5. Skoog, D. A. y Leary, J. J. *Análisis Instrumental* (4ª ed) McGraw-Hill, Madrid, España, **1994**.
6. Nakamura, S. y Fasol, G., *The Blue Laser Diode*, Springer, Berlín (Alemania), **1997**; p. 215.
7. Svelto, O., *Principles of Lasers* (4ª ed), Plenum, Nueva York (EE.UU.), **1998**.
8. Yeh, C., *Handbook of Fiberoptics. Theory and Applications*, Academic Press, Nueva York (EE.UU.), **1990**.
9. Dereniak, E. L. y Crowe, D. G., *Optical Radiation Detectors*, Wiley, Nueva York (EE.UU.), **1984**.
10. Lakowicz, J. R., *Principles of Fluorescence Spectroscopy* (2ª ed.), Kluwer Academic/Plenum Publishers, Nueva York (EE.UU.), **1999**; cap. 4 y 5.
11. Lübbers, D. W., *Fluorescence Based Optical Sensors*, en *Advances in Biosensors*, vol. 2, JAI Press LTD., Londres (Reino Unido), **1992**; pp. 215-260.
12. Stern, O. y Volmer, M., *Physik. Z.*, **1919**, 20, 183.
13. Lakowicz, J. R., Castellano, F. N., Dattelbaum, J. D., Tolosa, L., Rao, G. y Gryczynski, I., *Anal. Chem.*, **1998**, 70, 5115.
14. Stryer, L., *Ann. Rev. Biochem.*, **1978**, 47, 819.
15. a) Cámara, C., Moreno, M. C. y Faraldos, M., *Analisis*, **1988**. 16, 87. b) Bright, F. V., Poirier, G. E., y Hieftje, G. M., *Talanta*, **1988**, 35, 113. c) Sharma, A. y Wolfbeis, O. S., *Proc. SPIE-Int. Soc. Opt. Eng.* **1989**, 990, 116. d) Lin, Z. H. y Burgess L. W., *Anal. Chem.*, **1994**, 66, 2544. e) Zhou, X. J. y Arnold, M. A., *Anal. Chim. Acta*, **1995**, 304, 147.

16. a) Orellana, G., Moreno, M. C., de Dios, C., García, A. A. y Gómez, A. M., *Sensor Óptico Luminiscente*, Pat. Española ES2065268 (sol. nº 9300938). b) Orellana, G., Gómez, A. M., de Dios, C., García, A. A. y Moreno, M. C., *Anal. Chem.*, **1995**, 67, 2231.
17. Wolfbeis, O. S., Reisfeld, R. y Oehme, I., *Sol-gels and chemical sensors*, en *Structure and Bonding*, vol. 85, Springer-Verlag, Berlín (Alemania), **1996**; pp. 52-98.
18. Wenying, X, McDonough, R. C., Langsdorf, B., Demas, J. N. y DeGraff, B. A., *Anal. Chem.*, **1994**, 66, 4133.
19. Peppas, N. A., *Preparation, Methods and Structures of Hydrogels*, CRC Press, Boca Raton, Florida (EE.UU.), **1986**.
20. Klainer, S. M., Thomas, J. R. y Francis, J. C., *Sens. Actuators B*, **1993**, 11, 81.
21. Paris, J. P. y Brandt, W. W., *J. Am. Chem. Soc.*, **1959**, 81, 5001.
22. Orellana, G., Quiroga, M. L. y de Dios, C., *Trends Inorg. Chem.*, **1993**, 3, 109.
23. Seddon, E. A. y Seddon, K. R., *The Chemistry of Ruthenium*, en *Topics in Inorganic and General Chemistry*, vol. 19, Clark, R. J. H. (ed.), Elsevier, Amsterdam (Holanda), **1984**; pp. 1173-1260.
24. Juris, A., Balzani, V., Barigelletti, S., Campagna, S., Belser, P. y Von Zelewsky, A., *Coord. Chem. Rev.*, **1998**, 84, 85.
25. Watts, R. J., *J. Chem. Educ.*, **1983**, 60, 834.
26. Orellana, G. y Braun, A. M., *J. Photochem. Photobiol.*, **1989**, 48, 277.
27. Pfeil, A., *J. Am. Chem. Soc.*, **1971**, 93, 5395.
28. García-Fresnadillo, D., Georgiadou, Y., Orellana, G., Braun, A. M. y Oliveros, E., *Helv. Chim. Acta*, **1996**, 79, 1222.
29. Van Houten, J. y Watts, R. J., *J. Am. Chem. Soc.*, **1976**, 98, 4853.
30. Orellana, G., Quiroga, M. L. y Braun, A. M., *Helv. Chim. Acta*, **1987**, 70, 2073.
31. Orellana, G., García-Fresnadillo, D., Marazuela, M. D., Moreno-Bondi, M. C., Delgado, J. y Sicilia J. M., *Fiber-optic Chemical Sensors: from molecular engineering to environmental analytical chemistry in the field*, en *Monitoring of Water Quality*, Colin, F. y Quevauviller, P. (eds.), Elsevier Science, Amsterdam (Holanda), **1998**; pp. 103-115.
32. Hoffman, M. Z., Boletta, F., Moggi, L., y Hug, G. L., *J. Phys. Chem. Ref. Data*, **1989**, 18, 219.
33. a) Orellana, G., Kirsch-De Mesmaeker, A., Barton, J. K. y Turro, N. J., **1991**, 54, 499. b) Knapp, C., Lecompte, J. P., Kirsch-De Mesmaeker, A. y Orellana, G., *Photochem. Photobiol.*, **1996**, 36, 67. c) Chow, C. S. y Barton, J. K., *Meth. Enzymol.*, **1992**, 212, 219.

## **DETECCIÓN SENSIBLE A LA FASE. SISTEMA DEMODE**

34. Carraway, E. R., Demas, J. N., DeGraff, B. A. y Bacon, J. R., *Anal. Chem.*, **1991**, 63, 332.
35. Delgado, J., Tesis Doctoral, Universidad Complutense de Madrid, **2000**.
36. Xavier, M. P., Tesis Doctoral, Universidad Complutense de Madrid, **2001**.
37. Bedoya, M., Tesis Doctoral, Universidad Complutense de Madrid, en curso.

## **OPTODO DE TEMPERATURA**

### **ANTECEDENTES**

38. Berghmans, F., Vos F. y Decreton, M., *IEEE Trans. Nuc. Sci.*, **1998**, 45, 1537.
39. Dybko, A., Wroblewski, W., Maciejewski, J., Romaniuk, R. y Brzozka, Z. a) *Assessment of water quality based on multiparametric fiber optic probe*, IV European Conference on Optical Chemical Sensors and Biosensors (Europt(r)ode IV), libro de resúmenes, Münster (Alemania), **1998**. b) *Fiber optic probe for drinking monitoring*, *Proc. SPIE, Chemical, Biochemical and Environmental Sensors IX*, **1997**, 3105, 361.
40. a) Changchun, L., *Proc SPIE*, **1997**, 2976, 57. b) Medlock, R. S., *Int. J. Opt. Sens.*, **1986**, 1, 43.
41. White, S. R. y Nave, S. E., *Appl. Spectrosc.*, **1999**, 53, 1138.
42. Hartog, A. H., *J. Lightwave Technol.*, **1983**, 489.
43. Feced, R., Farhadiroushan, M., Handerek, V. A. y Rogers, A. J., *IEEE Proc. Opt.*, **1997**, 144, 183.
44. Corke, M., Kersey, A. D., Jackson D. A. y Jones, J. D. C., *Electron. Lett.*, **1983**, 19, 471.
45. Choi, H. S., Taylor, H. F. y Lee, C. E., *Opt. Lett.*, **1997**, 22, 1814.
46. Corke, M., Jones, J. D. C., Kersey, A. D. y Jackson, D. A., *Dual Fabry-Perot interferometer implemented in parallel on a single mode optic fiber*, en *Tech. Digest 3<sup>rd</sup> Int. Conf. on Opt. Fibre Sensors*, San Diego (EE. UU.), *Optical Society of America*, **1985**; p. 128.
47. Cortes, R., Khomenko, A. V. y Starodumov, A. N., Arzate, N., Zenteno, L. A., *Opt. Comm.*, **1998**, 154, 268.
48. Grattan, K. T. V. y Zhang, Z. Y., *Fiber Optic Fluorescence Thermometry*, en *Topics in Fluorescence Spectroscopy*, vol. 4, Lakowicz, J. R. (ed.), Plenum Press, Nueva York (EE. UU.), **1994**; pp. 335-376.

49. Dixon, J., *Meas. Control*, **1987**, 20, 11.
50. Mordon, S., Zonde, S. y Brienetaud, J. M., *Non contact temperature measurement with a zirconium glass fiber*, en *Proc. Optical Fiber Sensors 2*, Nueva Orleans (EE. UU.), publicado por la *Optical Society of America*, **1988**; p. 502.
51. Murray, R. T., *Int. J. Opt. Sens.*, **1986**, 1, 27.
52. Zhang, Z. Y., Grattan, K. T. V. y Palmer, A. W., a) *SPIE Proc.* **1993**, 1885, 300. b) *Rev. Sci. Instrum.*, **1991**, 62, 1735. c) *Rev. Sci. Instrum.*, **1992**, 63, 3177.
53. Stufflebeam, J. H., *Appl. Spectrosc.*, **1989**, 42, 274.
54. Figueroa, I. D., El Baraka, M., Quiñones, E., Rosario, O. y Deumié, M., *Anal. Chem.*, **1998**, 70, 3974.
55. Schrum, K. F., Williams, K. F., Haerther, S. A. y Ben-Amotz, D., *Anal. Chem.* **1994**, 66, 2788.
56. Wade, S. A., Muscat, J. C., Collings, S. F. y Baxter, G. W., *Rev. Sci. Instrum.*, **1999**, 70, 4279.
57. Kober, E. M. y Meyer, T. J., *Inorg. Chem.*, **1984**, 23, 3877.
58. Lumpkin, R. S., Kober, E. M., Worl, L. A., Murtaza, Z. y Meyer, T. J., *J. Phys. Chem.*, **1990**, 94, 239.
59. Lecomte, J. P., Kirsch-De Mesmaeker, A. y Orellana, G., *J. Phys. Chem.*, **1994**, 98, 5382.
60. Demas, J. N. y DeGraff, B. A., *Anal. Chem.*, **1991**, 63, 829A.
61. Demas, J. N. y DeGraff, B. A., *Proc. SPIE*, **1992**, 1796, 71.
62. Jacquet, L. y Kirsch-De Mesmaeker, A., *J. Chem. Soc. Faraday Trans.*, **1992**, 88, 2471.
63. Podbielska, H., Andrzejewski, D., Maruszewski, K. y Strêk, W., *A novel optical fibre sensor for temperature measurements, IV European Conference on Optical Chemical Sensors and Biosensors (Europt(r)ode IV)*, libro de resúmenes, Münster (Alemania), **1998**.
64. Liebsch, G., Klimant, I. y Wolfbeis, O. S., *Adv. Materials*, **1999**, 11, 1296.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

65. Allsopp S.R., Cox, A., Kemp, T. J. y Reed, W. J., *J. Chem. Soc. Faraday Trans.*, **1978**, 1, 1275.
66. Maruszewski, K., Strommen, D. P. y Kincaid, J. R., *J. Am. Chem. Soc.*, **1993**, 115, 8345.
67. Sykora, M. y Kincaid, J. R., *Inorg. Chem.*, **1995**, 34, 5852.
68. Allen, G. H., White, R. P., Rillema, D. P. y Meyer, T. J., *J. Am. Chem. Soc.*, **1984**, 106, 2613.

69. Clarck, C. D., Hoffman, M. Z., Rillema, D. P. y Mulazzani, Q. G., *J. Photochem. Photobiol.*, **1997**, *110*, 285.
70. Demas, J. N., *Excited State Lifetime Measurements*, Academic Press, Londres (Reino Unido), **1983**; pp. 59-62.
71. Rillema, D. P., Blanton, C. B., Shaver, R. J., Jackman, D. C., Boldaji, M., Bundy, S., Worl, L. A. y Meyer, T. J., *Inorg. Chem.*, **1992**, *31*, 1600.
72. García-Fresnadillo, D., Tesis Doctoral, Universidad Complutense de Madrid, **1996**.
73. Gutiérrez-Alonso, M. C., Tesis Doctoral, Universidad Complutense de Madrid, **1996**.
74. Fried, J. R., *Polymer Science and Technology*, Prentice Hall PTR, Englewoods Cliffs, Nueva Jersey, EE.UU., **1995**; p. 278.
75. Massart, D. L., Vandeginste, B. G. M., Deming, S. N., Michotte, Y. y Kaufman, L., *Chemometrics: a textbook*, Elsevier, Amsterdam (Holanda), **1990**; pp. 33-57.

## PARTE EXPERIMENTAL

76. Orellana, G., Tesis Doctoral, Universidad Complutense de Madrid, **1988**.
77. Villeras, J. y Ramband, M., *Synthesis*, **1982**, 924.

## OPTODO DE pH

### ANTECEDENTES

75. a) Narayanan, B., Raghuraman, S. y Seow, J., *Int. Environ. Tech.*, **1998**, *8*, 36. b) Armit, C., *A study of electrodo stability*, *Int. Environ. Tech.*, **1997**, *7*, 24.
76. Cattrall, R., W., *Chemical Sensors*, Oxford. Univ. Press, Oxford (Reino Unido), **1997**; p. 22.
77. a) Covington, A. K., Bates, R. G. y Darst, R. A., *Pure Appl. Chem.*, **1985**, *57*, 531. b) b) Skoog, D. A., West, D. M., Holler, F. J., *Química Analítica*, 6ª ed., McGraw-Hill; p.142-145.
78. Janata, J., *Anal. Chem.*, **1987**, *59*, 1351.
79. Edmonds, T. E., Flatters, N. J., Jones, C. F., y Miller, J. N., *Talanta*, **1988**, *35*, 103.
80. a) Ramette, R., Culberson, C. H. y Bates, R. H., *Anal. Chem.*, **1977**, *49*, 867. b) Robert-Baldo, G. L., Morris, M. J., y Byrne, R. H., **1985**, *57*, 2564.

81. a) Orellana, G. and Moreno-Bondi, M. C., *Sensor Óptico, Patente Española* ES 2 023 593 (nº sol. 9002740, **1990**). b) Orellana, G., Moreno-Bondi, M. C., Segovia, E. y Marazuela, M. D., *Anal. Chem.*, **1992**, 64, 2210.
82. West, S. J., Ozawa, S., Seiler, K., Tan, S. S. y Simon, W., *Anal. Chem.*, **1992**, 64, 533.
83. Navas, A. y Ramos, M. C., *Sens. Actuators B*, **1997**, 38, 426.
84. Bacci, M., Baldini, F. y Scheggi, A. M., *Anal. Chim. Acta*, **1988**, 207, 343.
85. a) Chan, C.-M., Fung, C.-S., Wong, K.-Y. y Lo, W., *Analyst*, **1998**, 123, 1843. b) Chan, C.-M., Lo, W. y Wong, K.-Y., *Biosen. Bioelectron.*, **2000**, 15, 7.
86. Goldstein, S. R. y Peterson, J. I., *Adv. Bioeng.*, **1977**, 81, 1977.
87. Markle, D. R., McGuire, D. A., Goldstein, S. R., Petterson, R. E. y Watson, R. M., *A pH measurement system for use in tissue and blood, employing miniature fiber optic probes*, en *Adv. Bioeng.*, ed. Viano D. C., *Am. Soc. Mech. Eng.*, Nueva York (EE.UU.) **1981**; p. 123.
88. Tait, G. A., Young, R. B., Wilson, G. J., Steward, D. J. y MacGregor, D. C., *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **1984**, 15, H232.
89. Netto, E. J., Peterson, J. I., McShane, M. y Hampshire, V., *Sens. Actuators B*, **1995**, 29, 157.
90. Baldini, F., Bechi, P., Bracci, S., Cosi, F. y Pucciani, F., *Sens. Actuators B*, **1995**, 29, 164.
91. Hisamoto, H., Tsubuku, M., Enomoto, T., Watanabe, K., Kawaguchi, H., Koike, Y. y Suzuki, K., *Anal. Chem.*, **1996**, 68, 3871.
92. Holobar, A., Benes, R., Weigl, B. H., O'leary, P., Raspor, P. y Wolfbeis, O. S., *Anal. Meth. Inst.*, **1995**, 2, 92.
93. MacCraith, B. D., McDonagh, C. M., O'Keeffe, G., McEvoy, A. K., Butler, T. y Sheridan, F. R., *Sens. Actuators B*, **1995**, 29, 51.
94. Igarashi, S., Kuwae, K. y Yottsuyanagi, T., *Anal. Sci.*, **1994**, 10, 821.
95. a) Moreno, M. C., Martinez, A., Millán, P. y Cámara, C., *J. Molec. Struct.*, **1986**, 143, 553. b) Moreno, M. C., Jiménez, M., Pérez-Conde, C., y Cámara, C., *Anal. Chim. Acta*, **1990**, 230, 35.
96. Monici, M., Boniforti, R., Buzzigoli, G., DeRossi, D. y Nannini, A., *Proc. SPIE*, **1987**, 798, 294.
97. Boisdé, G., Blanc, F., y Pérez, J. J., *Talanta*, **1988**, 35, 75.
98. Schulman, S. G., Chen, S., Bai, F., Leiner, M. J. P., Weis, L. y Wolfbeis, O. S., *Anal. Chim. Acta*, **1995**, 304, 165.
99. Offenbacher, H., Wolfbeis, O. S. y Furlinger, E., *Sens. Actuators*, **1986**, 9, 73.
100. Zhujun, Z. y Seitz, W. R., *Anal. Chim. Acta*, **1984**, 160, 47.

101. Draxler, S. y Lippitsch, M. E., *Sens. Actuators B*, **1995**, 29, 199.
102. Browne, C. A., Tarrant, D. H., Olteanu, M. S., Mullens, J. W. y Chronister, E. L., *Anal. Chem.*, **1996**, 68, 2289.
103. Lobnik, A., Oehme, I., Murkovic, I. y Wolfbeis, O., *Anal. Chim. Acta*, **1998**, 367, 159.
104. Thomson, R. B. y Lakowicz, J. R., *Anal. Chem.*, **1993**, 65, 853.
105. Bromberg, A., Zilberstein, J., Reisinger, S., Benori, E., Silberstein, E., Zimnavoda, J., Frishman, G. y Kritzman, A., *Sens Actuators B*, **1996**, 31, 181.
106. Parker, J. W., Laksin, O., Yu, C., Lau, M.-L., Klima, S., Fisher, R., Scott, I. y Atwater, B. W., *Anal. Chem.*, **1993**, 65, 2329.
107. Bambot, S. B., Sipior, J., Lakowicz, J. R. y Rao, G., *Sens. Actuators B*, **1994**, 22, 181.
108. Lakowicz, J. R., Szmecinski, H. y Karakelle, M., *Anal. Chim. Acta*, **1993**, 272, 179.
109. Jordan, D. M., David, R. W. y Milanovich, F. P., *Anal. Chem.*, **1987**, 59, 437.
110. Price, J. M., Xu, W., Demas, J. N. y DeGraff, B. A., *Anal. Chem.*, **1998**, 70, 265.
111. Murtaza, Z., Chang, Q., Rao, G., Lin, H. y Lakowicz, J. R., *Anal. Biochem*, **1997**, 216.
112. Kosch, U., Klimant, I., Werner, T. y Wolfbeis, O. S., *Anal. Chem.*, **1998**, 70, 3892.
113. Kosch, U., Klimant, I. y Wolfbeis, O. S., *Fresenius J. Anal. Chem.*, **1999**, 364, 48.
114. de Dios, C., Tesis Doctoral, Universidad Complutense de Madrid, **1994**.
115. Grigg, R., Norbert, W., Amilaprasadh D. J., *J. Chem. Soc. Chem. Comm.*, **1992**, 18, 1300.
116. Xu, W., Mehlmann, J., Rice, J., Collins, J. E., Frasser, C. L., Demas, J. N., DeGraff, A. and Bassetti, M., *Proc. SPIE-Int. Soc. Opt. Eng.*, **1999**, 3534, 456.
117. Ayala, D., Navarro, F., Bustamante, N. y Orellana, G., *Novel Ru(II) indicators for pH measurements by intensity- and lifetime-based luminescence optosensing, Proc. Europt(r)ode V, Lyon (Fancia)*, **2000**, 61.
118. Malins, C., Glever, H. G., Keyes, T. E., Vos, J. G., Dressick, W. J. and MacCraith, B. D., *Sens. Actuators B*, **2000**, 67, 89.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

122. Homer, R. B. y Johnson, C. D., *Acid-base and complexing properties of amides*, en *The Chemistry of Amides* (PATAI), J. Zabicky (ed.), London Interscience, Londres (Reino Unido), **1970**, cap. 3.
123. Orellana, G., Moreno-Bondi, M. C., García-Fresnadillo, D. y Xavier, M. P., *Método de unión a polímeros de un compuesto indicador sensible al analito, para la fabricación de sensores ópticos y su dispositivo*, *Patente Española* ES 2 130 964 (nº sol. 9602181, **1996**).
124. Marazuela, M. D., Moreno-Bondi, M. C. y Orellana, G., *Appl. Spectrosc.*, **1998**, 52, 1314.
125. Orellana, G., de Dios, C., Moreno-Bondi, M. C., y Marazuela, M. D., *Proc. SPIE-Int. Soc. Opt. Eng.*, **1995**, 2508, 18.
126. Haga, M-A., *Inorg. Chim. Acta*, **1983**, 75, 29.
127. Krause, *Struct. Bonding*, **1987**, 67, 1.
128. Pretsch, E., Clerc, T., Seibl, J. y Simon, W., *Tablas para la elucidación estructural de compuestos orgánicos por métodos espectroscópicos*, ed. Alhambra, **1991**.
129. Nasielski-Hinkens, R. y Benedek-Vamos, *J. Chem. Soc., Perkin Trans.*, **1975**, 1, 1229.
130. Miller, J. D. y Prince, R. H., *J. Chem. Soc.*, **1965**, 4706.
131. Crook, M. J., Lewis, A. P., y McAuliffe, G. S. G., *Org. Magn. Reson.*, **1984**, 22, 388.
132. Orellana, G., Álvarez-Ibarra, C. y Santoro, J., *Inorg. Chem.*, **1988**, 27, 1025.
133. Popovych, O. y Tomkins, R. P. T., *Non aqueous solution chemistry*, Wiley, Nueva York (EE.UU.), **1981**; pp. 32-75.
134. Orellana, G., Kirsch-De Mesmaeker, A. y Turro, N. J., *Inorg. Chem.*, **1990**, 29, 882.
135. Bolger, J., Gourdon, A., Ishow, E. y Launay, J. P., *Inorg. Chem.*, **1996**, 35, 2942.
136. a) DeArmond, M. K. y Carlin, C. M., *Coord. Chem. Rev.*, **1981**, 36, 325. b) Vlcek, A. A., *Coord. Chem. Rev.*, **1982**, 43, 39.
137. Perrin, D. D. y Dempsey, B., *Buffers for pH and metal ion control*, Chapman and Hall, Londres (Reino Unido), **1974**; p. 48.
138. Boggess, R. K. y Martin, R. B., *Inorg. Chem.*, **1974**, 13, 1525.
139. Vos, J. G., *Polyhedron*, **1992**, 11, 2285.
140. Giordano, P. J., Bock, C. R. y Wrighton, M. S. , *J. Am. Chem. Soc.*, **1978**, 100, 6960.



141. Lakowicz, J. R., *Principles of Fluorescence Spectroscopy* (2<sup>a</sup> ed.), Kluwer Academic/Plenum Publishers, Nueva York (EE.UU.), **1999**; cap. 18.
142. Grinvald, A. y Steinberg, I. Z., *Anal. Biochem.*, **1974**, 59, 583.
143. Ireland, J. F. y Wyatt, P. A. H., *Adv. Phys. Org. Chem.*, **1976**, 12, 131.
144. Blair, T. L., Cynkowski, T. y Bachas, L. G., *Anal. Chem.*, **1993**, 65, 945.
145. Yaeger, H. L., en *Perfluorinated ionomer membranes*, Eisenberg, A. y Yaeger, H. L. (eds.), ACS Symposium Series 180, *American Chemical Society*, Washington D. C. (EE.UU.), **1982**; cap 4.

## PARTE EXPERIMENTAL

146. Nasielski-Hinkens, R., Benedek-Vamos, M., y Maetens, D., *J. Heterocycl. Chem.*, **1980**, 17, 873.
147. Castro, A. M., Tesis Doctoral, Universidad Complutense de Madrid, **2001**.
148. Sullivan, B. P., Salmon, D. J. y Meyer, T. J., *Inorg. Chem.*, **1978**, 17, 3334.
149. Anderson, S., Constable, E. C., Seddon, K. R. y Turp, J. E., *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, **1985**, 2247.
150. Mielenz, K. D., *Measurements of Photoluminescence*, en *Optical Radiation Measurements*, vol. 3, Grum, F. y Bartleson, C. J. (eds.), Academic Press, Nueva York (EE.UU.), **1982**.
151. Eaton, D. F., *Pure & Appl. Chem.*, **1988**, 60, 1107.
152. Belser, P. y von Zelewsky, A., *Helv. Chim. Acta*, **1980**, 63, 1675.
153. Brown y Sandifer, J. R., *Cyclic Voltametry*, en *Physical Methods of Chemistry*, vol. 2, *Electrochemical Methods*, Rositer, W., Hamilton, J. F. (eds.), Wiley, Nueva York (EE.UU.), **1986**; p. 292.
154. Perrin, D. D. y Dempsey, B., *Buffers for pH and metal ion control*, Chapman and Hall, Londres (Reino Unido), **1974**, pp. 77.
155. Albert, A. y Sergeant, E. P., *The Determination of Ionization Constants*, 3<sup>a</sup> ed., Chapman y Hall (Eds.), Nueva York (EE.UU.), **1984**; cap. 4.
156. Xavier, M. P., García-Fresnadillo, D., Moreno-Bondi, M. C. y Orellana, G., *Anal. Chem.*, **1998**, 70, 5184.

## **OPTODO DE DETERGENTES**

### **ANTECEDENTES**

157. Wandruska, R., *Crit. Rev. Anal. Chem.*, **1992**, 23, 187.
158. Wittcoff, H. A. y Reuben, B. G., *Agentes tensioactivos, en Productos químicos orgánicos industriales*, cap. 7., Limusa, Méjico, **1987**.
159. Reemtsma, T., *J. Cromatogr. A*, **1996**, 733, 473.
160. Buschman, N. y Schulz, R., *Tenside Surf. Det.*, **1993**, 30, 18.
161. Nomura, Y., Ikebukoro, K., Yokoyama, K., Takeuchi, T., Arikawa, Y., Ohno, S. y Karube, I., *Anal. Lett.*, **1994**, 27, 3095.
162. Abbott, D. C., *Analyst*, **1962**, 87, 287.
163. Agudo, M., Ríos, A. y Varcárcel, M., *Analyst*, **1994**, 119, 2097.
164. Moskvín, L. N., Simon, J., Löffler, P., Michailova, N. V. y Nicolaevna, D. N., *Talanta*, **1996**, 43, 819.
165. Kasahara, I., Hashimoto, K., Kawabe, T., Kunita, A., Magawa, K., Hata, N., Taguchi, S. y Goto, K., *Analyst*, **1995**, 120, 1803.
166. Liu, J., *Anal. Chim. Acta*, **1997**, 343, 33.
167. Casero, I., Sicilia, D., Rubio, S. y Pérez-Bendito, D., *Anal. Chim. Acta*, **1997**, 345, 75. b) Sicilia, D., Rubio, S. y Pérez-Bendito, D., *Anal. Chem.*, **1995**, 1872.
168. Epton, S. R., *Trans. Faraday Soc.*, **1948**, 44, 226.
169. Motomizu, S., Gao, Y., Uemura, K. y Ishihara, S., *Analyst*, **1994**, 119, 473.
170. Turro, N. J., Grätzl, M y Braun, A. M., *Angew. Chem.*, **1980**, 19, 675.
171. Lundgren, J. S. y Bright, F. V., *Anal. Chem.*, **1996**, 68, 3377.
172. Shakhsher, Z. M. y Seitz, W. R., *Anal. Chem.*, **1990**, 62, 1758.
173. Yang, R. H., Wang, K. M., Xiao, D., Yang, X. H. y Li, H. M., *Anal. Chim. Acta*, **2000**, 404, 205.
174. Dür, H., Dör, G., Zengerle, K., Mayer, E., Curchod, J. M. y Braun, A. M., *Nouveau J. Chim.*, **1985**, 9, 717.
175. a) Snyder, S. W., Buell, S. L., Demas, J. N. y DeGraff, B. A., *J. Phys. Chem.*, **1989**, 93, 5265. b) Snyder, S. W., S. L., Demas, J. N. y DeGraff, B. A., *Chem. Phys. Lett.*, **1988**, 145, 434. c) Mandal, K., Hauenstein, B. L., Demas, J. N. y DeGraff, B. A., *J. Phys. Lett.*, **1983**, 87, 328. d) Hauenstein, B. L., Dressick, W. J., Buell, S. L., Demas, J. N. y DeGraff, B. A., *J. Am. Chem. Soc.*,

- 1983**, 105, 4251. e) Dressick, W. K., Hauenstein, B. L., Gilbert, T. B., Demas, J. N. y DeGraff, B. A., *J. Phys. Chem.*, **1984**, 88, 3337.
176. Orellana, G., García-Fresnadillo, D., Moreno-Bondi, M. C., Marazuela, M. D., Knapp, C. y Castro, A. M., *Sensor óptico para detergentes*, Patente Española P9602182, **1996**.
177. Chambron, J. C. y Sauvage, J. P., *Chem. Phys. Lett.*, **1991**, 182, 603.
178. Kaim, W., a) *Angew. Chem.*, **1983**, 95, 201. b) *Angew. Chem. Int. Ed. Eng.*, **1983**, 22, 171. c) *Rev. Chem. Interm.*, **1987**, 8, 247.
179. a) Chambron, J. C., Sauvage, J. P., Amouyal, E. y Koffi, P., *New J. Chem.*, **1985**, 9, 527 b) Amouyal, E., Homsj, A., Chambron, J. C. y Sauvage, J. P., *J. Chem. Soc. Dalton Trans*, **1990**, 1990, 1841.
180. Nair, R. B., Cullum, B. y Murphy, C. J., *Inorg. Chem.*, **1997**, 36, 962.
181. a) Friedman, A. E., Chambron, J. C., Sauvage, J. P., Turro, N. J. y Barton, J. K., *J. Am. Chem. Soc.*, **1990**, 112, 4960. b) Lincoln, P., Broo, A. y Norden, B., *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**, 118, 2644.
182. a) Jenkins, Y., Friedman, A. E., Turro, N. J. y Barton, J. K., *Biochemistry*, **1992**, 31, 10809. b) Turro, C., Bossmann, S. H., Jenkins, Y., Barton, J. K. y Turro, N. J., *J. Am. Chem. Soc.*, **1995**, 117, 9026.
183. Olson, E. J. C., Hu, D., Hörmann, A., Jonkman, A. M., Arkin, M. R., Stemp, E. D. A., Barton, J. K. y Barbara, P. F., *J. Am. Chem. Soc.*, **1997**, 119, 11458.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

184. Goss, C. A. y Abruña, H. D., *Inorg. Chem.*, **1985**, 24, 4263.
185. Hiort, C., Lincoln, P. y Nordén, P., *J. Am. Chem. Soc.*, **1993**, 115, 3448.
186. Rao, C. N. R., *Espectroscopía Ultravioleta y Visible*, Ed. Alhambra, Madrid, **1970**, 25 y 266.
187. Hartshorn, R. M. y Barton, J. K., *J. Am. Chem. Soc.*, **1992**, 114, 5919.
188. Pyle, A. M., Rehmann, J. P., Meshoyrer, R., Kumar, C. V., Turro, N. J., y Barton, J. K., *J. Am. Chem. Soc.*, **1989**, 111, 3051.
189. Jiménez, E., Tesis Doctoral, Universidad Complutense de Madrid, en curso.
190. García-Fresnadillo, D. y Orellana, G., *Helv. Chim. Acta*, **2001** (en prensa).
191. Baxendale, J. H. y Rodgers, M. A. J., *J. Phys. Chem.*, **1982**, 86, 4906.

192. Anderson, S., Constable, E. C., Seddon, K. R., Turp, J. E., Baggott, J. E. y Pilling, M. J., *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, **1985**, 2247.

### **PARTE EXPERIMENTAL**

193. Dickerson, J. E. y Summers, L. A., *Aust. J. Chem.*, **1970**, 23, 1023.

194. Fernández, E. y Fariña, F., *Nomenclatura de la Química Orgánica*, CSIC-RSEQ, Madrid, **1987**.

### **TÉCNICAS Y EQUIPOS EMPLEADOS**

195. O'Connor, D. V. y Phillips, D., *Time-Related Single Photon Counting*, Academic Press, Londres (Reino Unido), **1984**, 36.